



HAL
open science

Étude du myélome multiple au travers de l'imagerie médicale

Valérie Pottier

► **To cite this version:**

Valérie Pottier. Étude du myélome multiple au travers de l'imagerie médicale. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01020645

HAL Id: dumas-01020645

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01020645>

Submitted on 8 Jul 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement
Le 22 MAI 2014 à Toulouse
Par Valérie Pottier
Née le 09 janvier 1984, à Vire

**Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE**

Étude du myélome multiple au travers de l'imagerie médicale.

Directeur de thèse

Madame le Docteur C. FONTAN

Membres du jury

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Madame le Professeur B. SALLERIN | Président |
| Monsieur le Docteur J.A.M. TAFANI | Juge |
| Madame le Professeur M.C. SAUX | Juge |
| Monsieur le Docteur F.DEBORDEAUX | Juge |
| Monsieur le Docteur B.HEBRAUX | Juge |

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement
Le 22 MAI 2014 à Toulouse
Par Valérie Pottier
Née le 09 janvier 1984, à Vire

**Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE**

Étude du myélome multiple au travers de l'imagerie médicale.

Directeur de thèse

Madame le Docteur C. FONTAN

Membres du jury

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Madame le Professeur B. SALLERIN | Président |
| Monsieur le Docteur J.A.M. TAFANI | Juge |
| Madame le Professeur M.C. SAUX | Juge |
| Monsieur le Docteur F.DEBORDEAUX | Juge |
| Monsieur le Docteur B.HEBRAUX | Juge |

Serment de Galien

Je jure, en présence de mes Maîtres de la Faculté, et de mes condisciples :

-d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

-d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

-de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Remerciements

J'adresse mes premiers remerciements au Dr Charlotte FONTAN, ma Directrice de thèse. Tout d'abord, un grand merci pour m'avoir fait confiance et m'avoir confié ce projet de thèse, « ton bébé », à l'issue de mon stage de fin d'études. Je te suis particulièrement reconnaissante de m'avoir fait partager ta passion pour la radiopharmacie et pour toutes les connaissances scientifiques et techniques que tu m'as apportées tout au long de ces deux dernières années d'internat. Je te remercie également pour ta disponibilité, tes conseils et surtout tes encouragements dans mes moments de doute. Enfin, merci pour ton accueil dès mon arrivée sur Toulouse et pour ton amitié qui a fait en sorte que mes soirées soient des plus sympathiques.

Je remercie également tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de lire et de juger mon travail : Docteur J.A.M. TAFANI, Professeur M.C. SAUX, le Docteur F.DEBORDEAUX, Monsieur le Docteur B.HEBRAUX, et particulièrement le Pr B. SALLERIN qui me fait l'honneur de présider mon jury.

Je tiens à remercier plus particulièrement le Dr JAM TAFANI de m'avoir accueillie dans son unité de radiopharmacie et de m'avoir permis de faire le DESC à Saclay. Merci d'avoir apporté un cadre scientifique de qualité et une convivialité hors pair à ma formation de futur radiopharmacien. Enfin merci de faire en sorte que ma présence dans cette unité continue encore.

Je remercie également les membres de l'équipe radiopharmaceutique, en particulier Mathieu et Anne-Sophie pour m'avoir initié au TEP, pour leur contribution à ma formation, leurs conseils, sans oublier leur bonne humeur au quotidien. Mathieu, merci à toi pour ces midis à l'internat où il faut le dire je t'ai quelques fois battu au knife babyfoot. Une spéciale dédicace à toi Anne So, à chaque référence bibliographique insérée, une pensée était pour toi, merci pour ton partage et pour ce gain de temps ainsi que ton initiation à la recherche animale.

Je remercie d'autre part toute l'équipe des préparateurs en pharmacie avec laquelle j'ai partagé la plupart de mon temps, en particulier les « vieux » PPH de la radiopharmacie toulousaine Fixou et Nico, merci pour votre formation à la cellule et vos conseils en ce qui concernent les marquages cellulaires. Merci pour votre bonne humeur et vos potins partagés, travailler avec vous ça n'a été que du bonheur.

Merci à Monsieur Coulais pour m'avoir initié à l'enseignement et à Fixou pour la participation aux formations IFPPH, même si à mes débuts, vous avez été la cause d'un mal de ventre incessant jusqu'au jour J.

Merci aux services de médecine nucléaire de Purpan et de Rangueil et à son personnel avec qui j'ai pu partager. Merci aussi à mes co-internes Layla, Gauthier et à mes externes !!!

Merci à mes co-internes de la pharmacovigilance toulousaine: Guillaume, Liselotte, Laurent et Mathieu. Mon p'tit MAUPIER, merci de m'avoir supportée en face de toi durant ma grossesse, la p'tite POTTER n'oubliera pas !! Une pensée pour toi Charlène qui a partagé mes joies, mes craintes, mes états d'âme de femme enceinte notamment, et ce dans la plus grande discrétion.

Un grand merci particulier à mes deux premières co-internes bordelaises, Camille et Liselotte, je pense que ce stage à Saint-André nous a liées pour un bon moment. A toi ma p'tite Liselotte, mon p'tit bouchon, merci pour ton originalité, ta folie, pour ces escapades partagées, pour ton soutien, bref tout simplement pour ton amitié depuis ce premier jour d'internat.

Je tiens de même à remercier Cécile, Michou, Béné et Ludivine, merci pour tous ces moments partagés avec vous et tous ceux à venir.

Je tiens donc à remercier les toulousains « Purpanesques » ou « Rangueillois », les bordelais, « Haut-Lévêquois », « Pellegrinistes » ou encore « Saint Andréens », pharmaciens, préparateurs, internes, externes, techniciens ou encore patients, merci à vous pour cet apprentissage d'un métier mais aussi de la vie et pour les bons moments.

Je ne serais pas sans remercier mes p'tits pharmaciens caennais avec qui j'ai tant partagé, Rachid, Mélo, Pierrob, Paul et les autres, merci pour ces délires, cette amitié, ce soutien, pour ce quotidien. Un grand merci à Mme BELJEAN LEYMARIE pour ces mois de FFI et tous ces exercices de chimie analytique, on peut dire que ça a fait la différence. Merci à Michal, Anne et Fabien pour ses révisions acharnées au sein du CHS.

Pour finir, je ne remercierai jamais assez ma famille,

Ma petite Mum, merci pour tout, pour tes valeurs et tes principes. Merci pour tes encouragements et pour m'avoir supportée tout au long de ces années scolaires.

Papa, ton envie de nous pousser vers les études à porter ses fruits, tellement qu'aujourd'hui, 30 ans, ma vie d'étudiante s'achève seulement.

Un grand merci car j'ai bien conscience que sans vous deux je n'aurais pas eu le courage nécessaire. Je vous aime fort.

Guillaume, ça y est, enfin, je quitte les bancs de l'école !!! Merci à toi frérot, pour ces moments de partage fraternel, mais aussi pour m'avoir endurcie, car oui, je pense que tu m'as appris à forger ma carapace.

A Anthony, mon petit frère, pour qui je m'attache à honorer le nom. Merci pour ces années passées à tes côtés, ces bons moments, pour ton soutien et ton dévouement à me faire réviser. Je reste persuadée que si j'en suis là aujourd'hui, tu y es pour quelque chose. Tu me manques tellement.

A vous, à mes grands-parents, à toi mamy qui croyait tellement en moi, oncles, tantes, cousins et cousines, à toi ma p'tite Marie, je vous aime, vous m'apportez tellement.

Enfin à mes deux amours, à ce trio naissant,

Laurent, merci pour ce bonheur, merci d'avoir cru en moi et surtout de m'avoir donné la plus belle chose de la vie, notre Djoudjou. Merci pour cette aide inconsidérée pendant la rédaction de cette thèse, pour tes corrections et ta relecture. Je sais que les nuits ont été courtes et que ta transformation en fée du logis n'a pas été évidente. Je t'aime fort.

Juliette, tu n'as pas encore conscience de ce que tu peux m'apporter, mais durant l'élaboration de cette thèse, tu as été un réel antistress naturel. Depuis ta venue au monde, chaque jour je suis un peu plus fière de toi, tu m'émerveilles et me combles de bonheur. Ta MAMAN qui t'aime plus que tout.

Sommaire

| | |
|---|----|
| Liste des abréviations | 10 |
| Liste des figures | 14 |
| Liste des tableaux : | 16 |
| INTRODUCTION | 17 |
| 1. Le myélome multiple | 19 |
| A. Le système immunitaire | 19 |
| 1) Système immunitaire inné | 19 |
| 2) Système immunitaire adaptatif..... | 20 |
| B. RAPPEL physiologique : la lignée plasmocytaire | 21 |
| 1) Ontogénie des lymphocytes B..... | 22 |
| 2) Les Immunoglobulines..... | 26 |
| 3) Aspect morphologique et phénotypique des plasmocytes..... | 28 |
| C. Epidémiologie | 29 |
| D. Physiopathologie | 30 |
| 1) Définition | 30 |
| 2) Origine | 30 |
| 3) Oncogénèse | 31 |
| 4) Interaction des cellules tumorales avec leur environnement..... | 31 |
| E. Conséquences cliniques et physiopathologie du myélome multiple | 32 |
| 1) Douleurs osseuses : | 33 |
| 2) Signes d'hypercalcémie | 34 |
| 3) Anémie : | 34 |
| 4) Signes d'atteinte rénale..... | 34 |
| 5) Les infections..... | 35 |
| 6) Complications neurologiques | 35 |
| 7) Syndrome d'hyperviscosité | 36 |
| F. Biologie du myélome multiple | 36 |
| 1) Biochimie initiale : | 36 |
| 2) Biochimie complémentaire : | 38 |
| 3) Hématologie : | 39 |

| | | |
|----|---|----|
| 4) | Confirmation du diagnostic | 41 |
| G. | Critères pronostiques | 42 |
| 1) | Classification de Durie et Salmon | 42 |
| 2) | International Staging System (ISS)..... | 43 |
| 3) | Analyse cytogénétique des plasmocytes tumoraux..... | 43 |
| H. | La prise en charge thérapeutique | 46 |
| 1) | Traitement du myélome du sujet jeune (≤ 65 ans) éligible à la greffe | 47 |
| 2) | Traitement des patients âgés non éligible pour une greffe de cellules souches autologues. 48 | |
| 3) | Phase d'entretien : | 49 |
| 4) | Perspectives :..... | 49 |
| 2. | l'imagerie..... | 51 |
| A. | Imagerie anatomique | 51 |
| 1) | Principe des différentes méthodes d'imagerie anatomique..... | 51 |
| B. | Imagerie fonctionnelle | 56 |
| 1) | Rappels physiques sur la radioactivité : | 56 |
| 2) | Les rayonnements utilisés en imagerie diagnostique | 57 |
| 3) | Principe de l'imagerie fonctionnelle..... | 64 |
| C. | Méthodes d'imagerie couplées | 68 |
| D. | L'imagerie dans le myélome..... | 69 |
| 1) | Place du bilan d'imagerie anatomique dans le contexte du myélome | 69 |
| 2) | Discussion de la place de l'imagerie anatomique : | 75 |
| 3) | Place du bilan d'imagerie fonctionnelle dans le contexte du myélome | 76 |
| E. | Classification « staging » DURIE et SALMON « plus » | 82 |
| F. | Conclusion et Perspectives :..... | 84 |
| 3. | Nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques du myélome..... | 86 |
| A. | Les anticorps..... | 87 |
| 1) | Historique | 87 |
| 2) | Les anticorps : définition | 88 |
| 3) | Les anticorps : fonction | 88 |
| 4) | Les différentes générations d'anticorps..... | 88 |
| B. | Radioimmunosciintigraphie(RIS) | 90 |
| 1) | Applications : | 90 |
| 2) | Inconvénients | 91 |

| | |
|---|-----|
| 3) Perspectives..... | 91 |
| C. Le théranostic : une médecine personnalisée..... | 92 |
| 1) L'objectif de la théranostic :..... | 93 |
| 2) Théranostic et myélome..... | 93 |
| D. Les anticorps utilisés dans le traitement du myélome..... | 95 |
| E. Marquage des anticorps avec le Zirconium 89..... | 97 |
| 1) L'isotope radioactif (Zhang et al 2011)..... | 97 |
| 2) Chimie du Zirconium 89 (Verel et al. 2003)..... | 99 |
| F. Perspectives : Radio immunothérapie et PRIT | 107 |
| 1) La radioimmunothérapie (RIT) | 108 |
| 2) La PRIT : radio immunothérapie pré ciblée (Frampas et al. 2013)..... | 113 |
| CONCLUSION | 117 |

Liste des abréviations

2D : 2 dimensions

3D : 3 dimensions

[¹⁸F]-FDG: 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose

⁹⁹Mo: Molybdène 99

^{99m}Tc: Technetium 99 métastable

¹²³I: Iode 123

¹¹¹In: Indium 111

¹²⁴I: Iode 124

¹²⁵I: Iode 125

¹³¹I: Iode 131

⁶⁷Ga: Gallium 67

⁹⁰Y: Yttrium 90

⁸⁹Zr: Zirconium 89

²¹³Bi: Bismuth 213

Ac: Anticorps

AcM: Anticorps Monoclonal

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADCC: Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity

Ag: Antigène

AL: amylose légère

ARN: Acide ribonucléique

BCR: B Cell Receptor

BOM: Biopsie Osteomédullaire

BPF: Bonnes Pratiques de Fabrication

CD: Cluster de differentiation

CDR: Complementarity Determining Regions

CE : Capture électronique

CEA : antigène carcino-embryonnaire

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
Cpm : coups par minute
CRP : C-Reactiv Protein
CRCT : Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse
CSH: cellules souches hématopoïétiques
CSM : cellules souches mésenchymateuses
CT : Computed Tomography
CTL: Lymphocytes T cytotoxiques
CRCT : Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse
Da : Dalton
Df : Déféroxamine B
Df-Bz-NCS : pischthiocyanatobenzyl-deferoramine
DMSO : Dimethyl sulfoxide
 $E\beta_{max}$: Energie maximale du β
EPP : Electrophorèse des protéines plasmatiques
Fab: fragment variable
Fc: fragment constant
FGF: Fibroblast Growth Factor
FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor
FISH: Fluorescent in situ hybridation
GBq: Giga Becquerel
GDF-15: Growth Differentiation Factor 15
HAMA: Human Anti-Mouse Antibody
HAS : Haute Autorité de Santé
HGPRT: Hypoxanthine Guanidine PhosphoRibosyl Transferase
IFN: Interferon
Ig: immunoglobuline
IL : Interleukine
IMWG : International Myeloma Working Group
IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique
ISS: International staging system
KeV: Kilo électron volt

L_B : Lymphocyte B
LDH : Lactate déshydrogénase
L_T: Lymphocyte T
L_{TH}: Lymphocyte T Helper
mSv: millisievert
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MBq: Mega Becquerel
MeV: Méga electron Volt
MGUS : Monoclonal gammopathy of undetermined significance
MIBI : Méthoxyl-IsoButyl-Isonitrile
MIP: Macrophage Protein Inflammatory
MM : myélome multiple
MORF: oligomères morphilino phosphorodiamidate
MORFc : oligomères morphilino phosphorodiamidate complémentaire
MPT: melphalan, prednisone, thalidomide
MPV: melphalan, prednisone, Velcade
MRP : Médicament Radiopharmaceutique
N-sucDf : N-Succinyl deferoxamine
NFS: Numération Formule Sanguine
NGS : Next Generation Sequencing
NK : Natural Killer
OPG: ostéoprotégérine
PBJ : Proteine de Bence Jones
PBS : Phosphate Buffered Saline
PET/CT : Positon Emission Tomography/ Computed Tomography
PM : Poids Moléculaire
PRIT : Radioimmunothérapie Préciblée
RANK: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa
RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa Ligand
Revlodex: Revlimid, dexamethasone
RIS : Radioimmunosintigraphie
RIT : Radioimmunothérapie

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RX : rayons X
SCF stem cell factor
SDF-1: Stromal cell-Derived Factor 1
SUV: Standardised Uptake Value
SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography
TCR : T Cell Receptor
TD: Thalidomide, dexamethasone
TDM : Tomodensitométrie
TEMP : Tomographie par Emission MonoPhotonique
TEP : Tomographie par Emission de Positron
TcO4⁻ : Pertechnétate
TGF: Transforming Growth Factor
TNF : Tumor Necrosis Factor
VD: Velcade, dexamethasone
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VRD : Velcade Revlimid dexaméthasone
VS : Vitesse de sédimentation
VTD: Velcade, thalidomide, dexamethasone
β2-m : β2-microglobuline

Liste des figures

- Figure 1: Système immunitaire inné
- Figure 2: La réponse immunitaire adaptative
- Figure 3: Ontogénèse des LB
- Figure 4: Complexe moléculaire du B cell receptor
- Figure 5: Structure d'une immunoglobuline
- Figure 6: Configuration des différentes immunoglobulines
- Figure 7 : Myélogramme
- Figure 8: Le microenvironnement du myélome
- Figure 9 : Physiopathologie de l'activation ostéoclastique au cours du MM.
- Figure 10: Electrophorèse des protéines,
- Figure 11 : Electrophorèse des protéines, profil normal
- Figure 12: Immunofixation des protéines sériques
- Figure 13: Immunofixation des protéines urinaires
- Figure 14: Hématies en rouleaux
- Figure 15: Plasmocyte à cytoplasme en flamme
- Figure 16: Cellules de Mott
- Figure 17: Plasmocyte à noyau binucléé
- Figure 18: Structure d'un chromosome
- Figure 19: Principe de la radiographie
- Figure 20: Radiographie thoracique de face
- Figure 21: Radiographie de la main gauche
- Figure 22: Scanner médical
- Figure 23: Tomodensitométrie thoracique
- Figure 24: IRM des cervicales (coupes sagittales)
- Figure 25: IRM: coupe axiale des lobes occipitaux temporaux frontaux
- Figure 26: Vallée de stabilité et éléments radioactifs
- Figure 27: Schéma de désintégration du ^{99}Mo
- Figure 28: Schéma du générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$
- Figure 29 : Annihilation du positon
- Figure 30: Schéma de désintégration du fluor-18
- Figure 31: Composants du cyclotron
- Figure 32 : Représentation du mouvement de la particule chargée
- Figure 33 : De la production des ions au faisceau de proton
- Figure 34 : Le cyclotron
- Figure 35 : Principe schématique de la scintigraphie
- Figure 36 Représentation schématique de l'imagerie SPECT
- Figure 37 : Représentation schématique de l'imagerie TEP
- Figure 38 : Schéma du métabolisme du glucose
- Figure 39 : Appareillage TEP-CT
- Figure 40: Radiographie du profil du crâne, géodes à l'emporte pièce
- Figure 41: Radiographie de l'avant-bras

Figure 42: Scanner du rachis lombaire, lacune de TH12
Figure 43: IRM du rachis lombaire, coupe sagittale, pondération T1, lacune TH12
Figure 44: Comparaison IRM dynamique et radiographie
Figure 45: TEP-FDG et myélome
Figure 46: TEP-¹⁸F-FDG dans le bilan d'extension d'un myélome
Figure 47: Comparaison ¹⁸F FDG PET/CT et ¹⁸F NaF PET/CT chez une femme de 69 ans en stade III de MM
Figure 48 : Implication des tissus mous dans la maladie
Figure 49 : Implication du squelette dans la maladie
Figure 50: Implication de la moelle osseuse dans la maladie
Figure 51: Production des premiers anticorps monoclonaux
Figure 52 : Différentes générations d'anticorps
Figure 53 : Méthode de marquage d'un anticorps avec le zirconium 89 par la N-sucDf (méthode1)
Figure 54: Méthode de marquage d'un anticorps avec le Zirconium 89 par le Df-Bz-NCS (méthode 2)
Figure 55: Evaluation de la pureté radiochimique (PRC) du ⁸⁹Zr N-sucDf-Cetuximab
Figure 56: Immunoréactivité du ⁸⁹Zr N-sucDf-Cetuximab sur la lignée cellulaire A 431
Figure 57: Evaluation du nombre de TFP-N-sucDf-Fe conjugués au Cetuximab.
Figure 58: Schéma représentant le Zévalin
Figure 59: Effet bystander
Figure 60: L'Effet d'un agent de clairance sanguine

Liste des tableaux :

Tableau 1: Comparaison des phénotypes des cellules plasmatiques normales, réactives et malignes

Tableau 2: Fréquence de l'expression de différents CD chez 368 patients diagnostiqués MM

Tableau 3: Définition des formes cliniques

Tableau 4: Classification de DURIE et SALMON

Tableau 5: Classification ISS

Tableau 6 : Incidence des anomalies chromosomiques dans le MM.

Tableau 7: Valeur pronostique des anomalies chromosomiques

Tableau 8 : Classification de Durie et Salmon

Tableau 9 : Classification de DURIE et SALMON PLUS

Tableau 10: Tableau comparatif entre I¹³¹I et I⁹⁰Y

INTRODUCTION

Le myélome multiple (MM) est une affection hématologique maligne du sujet âgé caractérisée par la prolifération d'un seul clone de plasmocytes infiltrant la moelle osseuse et la production excessive d'immunoglobulines monoclonales. Ces cellules tumorales peuvent fréquemment envahir les structures osseuses adjacentes ainsi que plusieurs organes. Malheureusement, malgré les progrès thérapeutiques effectués depuis une dizaine d'années, le myélome reste encore une maladie incurable.

Comme toute pathologie tumorale, le diagnostic et la prise en charge du patient repose sur la clinique, la biologie, l'anatomopathologie et l'imagerie standard. Les avancées technologiques et le gain en sensibilité ont permis la mise au point d'outils de diagnostic moléculaire qui ont amélioré la compréhension de cette pathologie et les résultats thérapeutiques des patients. Ces dernières années, la découverte de diverses mutations génétiques ont permis d'identifier des facteurs pronostiques et d'adapter les traitements des patients. De nouvelles thérapeutiques et de nouveaux protocoles de traitements ont été développés grâce à l'amélioration de la compréhension des transformations moléculaires de cette maladie. Ainsi, bien que le myélome reste encore une maladie incurable, la survie des patients atteints de myélome s'est considérablement rallongée.

Actuellement, la classification de Durie et Salmon est celle la plus largement utilisée pour le diagnostic et la stadification du MM. Elle repose sur des paramètres cliniques et hématologiques simple tels que le pourcentage d'infiltration médullaire par les plasmocytes, la présence d'une immunoglobuline monoclonale dans le sérum ou des chaînes légères de l'immunoglobuline dans les urines, le taux d'hémoglobine, la calcémie, l'atteinte rénale du patient et enfin le nombre de lésions osseuses ostéolytiques traditionnellement définies par la radiographie du squelette (B. G. Durie and Salmon 1975). Elle permet de réaliser le diagnostic, d'établir la stadification qui déterminera la mise en place d'un traitement et d'assurer le suivi bien que sa place soit moins importante que les marqueurs biologiques.

Au point de vue de l'imagerie, la radiographie 2 dimensions reste encore le « gold standard » bien qu'elle soit moins performante sur le plan de la spécificité et de la sensibilité que les nouvelles techniques d'imagerie telles l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) qui est aussi une méthode d'imagerie anatomique ou la Tomographie par Emission de Positons

couplée au scanner (TEP / CT) utilisant le [¹⁸F]FluoroDéoxyGlucose ([¹⁸F]FDG) qui associe une technique d'imagerie fonctionnelle à une technique d'imagerie anatomique. Ces techniques sont donc de plus en plus utilisées mais dans des indications bien précises.

En effet, si l'on s'intéresse aux méthodes d'imagerie métabolique, elles sont encore peu utilisées car l'exploration des lésions osseuses classiques avec la scintigraphie aux biphosphonates marqués au technétium 99 métastable est la plupart du temps inefficace. Elle permet de visualiser des lésions ostéocondensantes et non lytiques comme cela est le cas dans le MM. Aussi, les explorations par le [¹⁸F] FDG sont complexes car il s'agit d'un traceur de la consommation glucidique qui est classiquement augmentée dans les cellules tumorales à fort taux de renouvellement et dans les syndromes inflammatoires. Or dans le myélome, la maladie évolue dans un contexte inflammatoire important et les plasmocytes prolifèrent peu.

Cependant, parmi les méthodes d'imagerie disponibles actuellement, les techniques d'imagerie nucléaire restent les plus sensibles. Ainsi la mise au point de nouveaux traceurs plus spécifiques du plasmocyte tumoral est une voie de recherche intéressante. En effet, la cellule tumorale dérivant d'une cellule immunitaire, elle possède des molécules de surface plus ou moins spécifiques. La mise au point de nouveaux traceurs spécifiques de la cellule tumorale, ciblant des molécules de surface spécifiques, pourrait donc être intéressante pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans cette pathologie et suivre spécifiquement le devenir des cellules dans un contexte inflammatoire et infectieux qui rend difficile l'utilisation des traceurs moléculaires actuels.

La première partie de ce travail sera consacrée à la présentation du MM et à sa prise en charge. La deuxième partie de ce travail portera sur une revue des différentes techniques d'imagerie médicale utilisée dans le myélome. Le troisième et dernier chapitre de ce travail portera sur l'évaluation de la mise au point d'un radiotracer spécifique du myélome marqué avec le zirconium 89.

1. Le myélome multiple

A. Le système immunitaire

Il est constitué de 2 entités, le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif (Figure 1).

1) Système immunitaire inné

Il compte les monocytes sanguins, les macrophages tissulaires, les polynucléaires et les cellules « Natural Killer » (NK). Ils se trouvent principalement dans les muqueuses et la circulation sanguine.

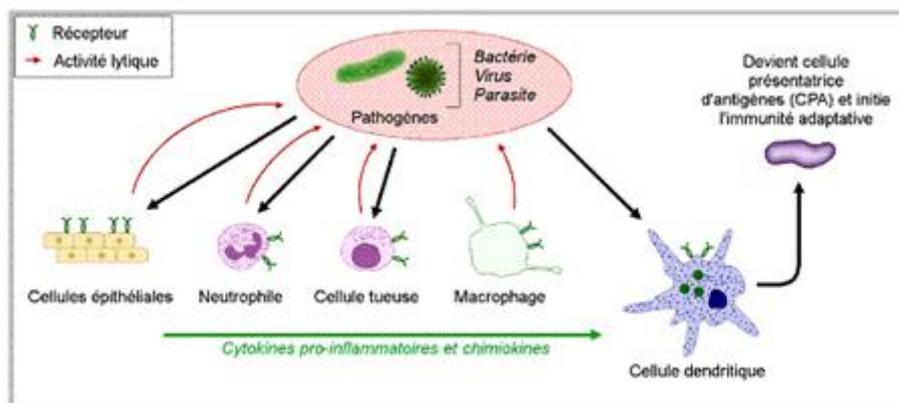


Figure 1: Système immunitaire inné

Il représente la première barrière de défense contre les agents pathogènes. La réponse immunitaire est caractérisée par sa non-spécificité et sa rapidité de mise en place. N'ayant pas de mémoire immunologique, ces cellules ne nécessitent pas de contact préalable avec le pathogène pour optimiser la réponse. Celle-ci est reproductible quel que soit l'agent agresseur. La manière d'éliminer l'agent pathogène est différente selon le type cellulaire. Les monocytes/macrophages et les polynucléaires ont pour principale fonction, la phagocytose qui consiste en une ingestion du pathogène. La vésicule intracellulaire alors formée est nommée phagosome. Elle va fusionner avec un lysosome dans lequel les enzymes et les radicaux libres de l'oxygène (notamment l'hypochlorite) vont tuer et digérer l'intrus. Les cellules NK (cellules tueuses) ont un mécanisme de défense qui se rapproche des lymphocytes T CD8. En effet, elles vont lyser par dégranulation des cellules considérées comme étrangères. Ce mécanisme de lyse est le résultat d'une intégration entre des signaux

activateurs et des signaux inhibiteurs présents à la surface membranaires de cellules NK. Ce système d'équilibre dynamique activation/inhibition permet en pratique aux cellules NK de lyser toutes les cellules dépourvues des molécules du CMH de classe I ou les cellules infectées par des virus ou des bactéries tout en épargnant les cellules saines.

2) Système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire adaptatif est constitué par les lymphocytes B (LB) et T (LT). La réponse immunitaire est caractérisée par sa spécificité. En effet, les LB et les LT possèdent respectivement un B Cell Receptor (BCR) et un T Cell Receptor (TCR) spécifiques d'un fragment protéique appelé antigène (Ag). Ces cellules nécessitent une primo sensibilisation qui donnera naissance à des cellules mémoires. Ces dernières assureront une immunité plus rapide et plus efficace lors d'une seconde rencontre avec l'Ag. Ils se localisent principalement dans les ganglions et la circulation sanguine.

(a) L'immunité humorale

Elle est assurée par les LB. Leur BCR reconnaît un antigène donné. Celui-ci va provoquer l'activation du lymphocyte et sa différenciation en plasmocyte capable de sécréter des immunoglobulines spécifiques de l'Ag donné conduisant à la destruction spécifique de l'agent pathogène portant l'épitope antigénique (figure 2). Nous la détaillerons dans la partie B.

(b) L'immunité cellulaire

Elle est assurée par les LT. Il y a les lymphocytes TCD4 et TCD8. Outre le TCR, impliqué dans la reconnaissance de l'Ag, la transduction du signal d'activation après la liaison TCR/Ag ne peut pas se faire sans la présence de la molécule de surface CD3 présente à la surface de tous les LT. Pour pouvoir s'activer ces cellules nécessitent la présentation de l'Ag par un composant du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe-I pour les LTCD8 et de classe-II pour les LTCD4. La réponse est donc caractérisée par une restriction par le CMH. On trouve 2 catégories de LT :

- **Les LTCD4** (=Lymphocytes T Helper (LTh))

Ils occupent une position centrale dans l'immunité acquise car une fois activés par les cellules présentatrices d'Ag (CPA) telles que les cellules dendritiques, ils secrètent diverses

cytokines qui vont favoriser l'évolution des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps circulants, et ils vont permettre l'évolution des lymphocytes T CD8+ en CTL.

- Les LTCD8 (= Lymphocytes T cytotoxiques (CTL))

Ce sont les cellules effectrices de l'immunité cellulaire. Elles assurent l'élimination directe des cellules anormales ou infectées. Les antigènes viraux sont reconnus par le TCR de la surface des lymphocytes T CD8+. Après activation de ces CTL, ils vont sécréter de la perforine et du granzyme (sérines protéases) qui provoquent la nécrose de la cellule infectée, et du Fas-ligand qui en se liant au Fas de la cellule infectée y déclenche un signal de mort programmée (apoptose) (Figure 2).

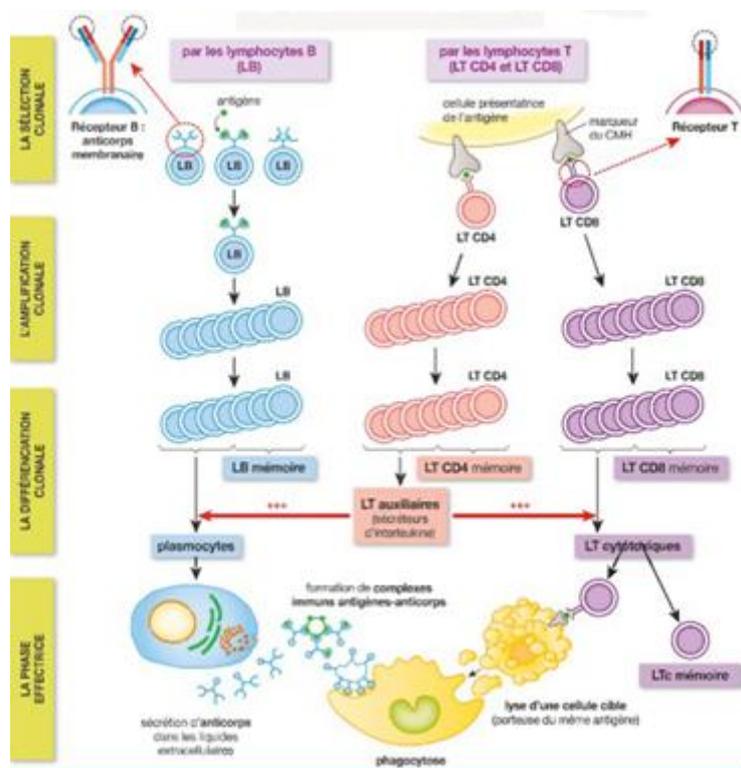


Figure 2: La réponse immunitaire adaptative

B. RAPPEL physiologique : la lignée plasmocytaire

Les plasmocytes sont les cellules terminales matures de la lignée lymphoïdes B. Ils sont, avec les lymphocytes B mémoires, l'aboutissement du processus de sélection et de maturation des cellules B spécifique d'un antigène. Les lymphocytes B naïfs sont produits dans la moelle osseuse, migrent ensuite dans les organes lymphoïdes secondaires pour se différencier au contact de l'antigène en lymphocyte B mémoire ou en plasmocyte. Le plasmocyte migre

ensuite vers la moelle osseuse pour se différencier en plasmocyte mature synthétisant en grande quantité une protéine extrêmement spécialisée, l'immunoglobuline (Ig), effecteur de la réponse immune humorale.

1) Ontogénie des lymphocytes B

La maturation des lymphocytes est appelée l'ontogénèse. On peut séparer l'ontogénèse des lymphocytes B en deux phases principales, dépendantes ou non de la présence d'antigène, la lymphopoïèse et l'immunopoïèse (Figure 3).

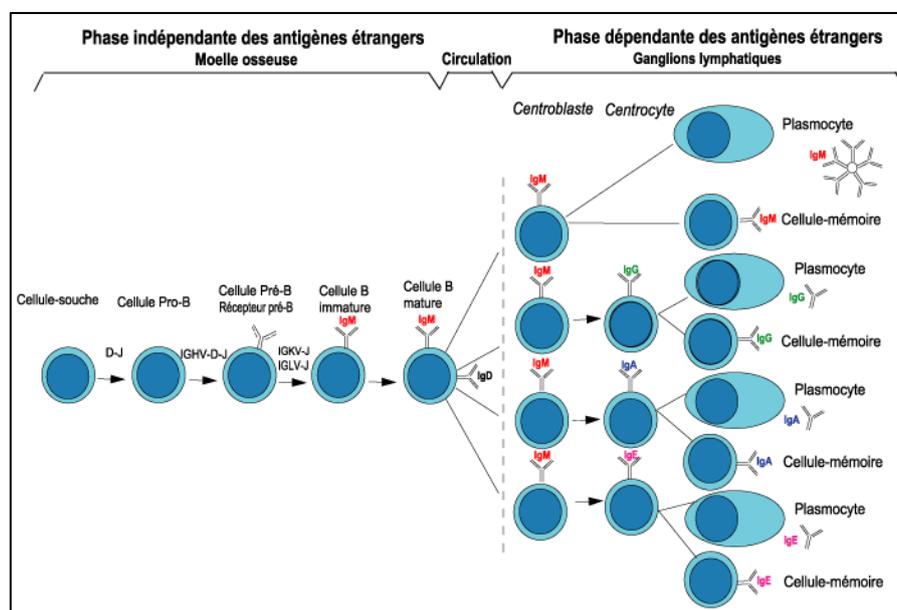


Figure 3: Ontogénèse des LB

(a) Lymphopoïèse B.

La lymphopoïèse est la première étape de différenciation et de maturation des lymphocytes B. Elle se déroule dans la moelle osseuse et elle est indépendante de l'antigène. Elle correspond à la production de lymphocytes B à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) et aboutit à la génération de cellules exprimant l'élément fonctionnel majeur de la lignée B, le BCR (B cell receptor).

1. Les différents stades de développement.

La différenciation des lymphocytes B commence dans la moelle osseuse à partir d'une CSH multipotente ayant la capacité d'auto-renouvellement mais aussi de différenciation générant

ainsi un progéniteur lymphoïde commun B, T et NK. A partir de ce pro géniteur multipotent se différencie un progéniteur lymphoïde T qui va migrer dans le thymus et un progéniteur lymphoïde B qui reste dans la moelle osseuse. Les précurseurs B passent ensuite par différents stades au cours desquels il va y avoir plusieurs remaniements successifs des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines (Ig). Il s'agit de la recombinaison génétique, étape indispensable à la genèse du LB. On retrouve ainsi les stades de lymphocyte pro-B, lymphocyte pré-B pour finir au stade B immature ou lymphocyte B immature. Ce lymphocyte B immature exprime une immunoglobuline de surface capable de reconnaître un antigène, le récepteur BCR (Figure 4). Il s'agit d'un complexe moléculaire composé de deux éléments associés de manière non covalente:

- une IgM membranaire complète (deux chaînes lourdes μ et deux chaînes légères) qui permettra la reconnaissance spécifique de l'Ag.
- un hétérodimère $Ig\alpha/ Ig\beta$ ou CD79a/CD79b dont les domaines cytoplasmiques initieront la transduction du signal.

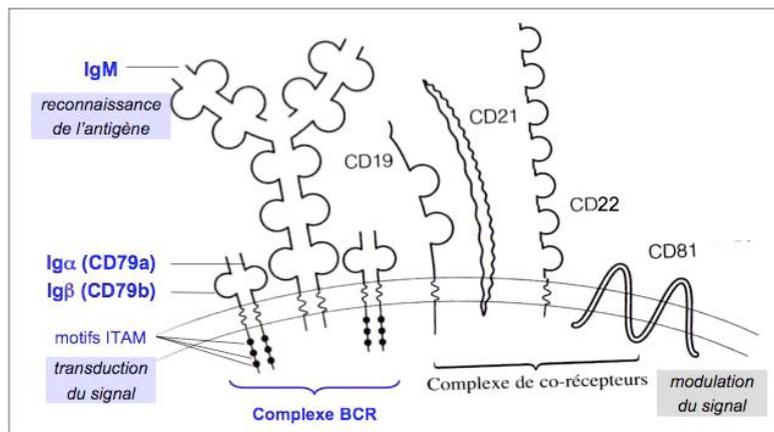


Figure 4: Complexe moléculaire du B cell receptor

A mesure de la différenciation d'autres molécules transmembranaires vont apparaître à la surface du lymphocyte B, associées aux différentes fonctions de ces cellules. Leur expression varie en fonction de l'état de différenciation des lymphocytes B.

Ces lymphocytes B immatures subissent un premier test car ils entrent en contact avec les antigènes du « soi ». S'ils les reconnaissent, ils sont inactivés. Au contraire, les autres acquièrent en plus une IgD de surface. Les LB ayant réussi le test, quittent ensuite la moelle osseuse pour se rendre dans les organes lymphoïdes secondaires où ils pourront subir les

dernières étapes de maturation. Le dernier stade de différenciation médullaire est le lymphocyte B mature naïf, caractérisé par la co-expression membranaire des deux isotypes IgM et IgD. Ces cellules sont dites naïves car elles n'ont jamais rencontré d'antigène, à l'exception de ceux du « soi ». Ce sont des Ig de faible affinité. La production d'anticorps de forte affinité requiert une maturation de la réponse immunitaire, contrôlée par la présence d'un antigène.

Au terme de cet étape, les LB produits n'ont encore jamais rencontré d'Ag extérieurs, ils portent à leur surface une Ig dont la région Fab est par hasard complémentaire de celle d'un Ag précis (= recombinaison génétique au hasard). Les lymphocytes produits vont circuler dans l'organisme jusqu'à ce que l'un d'entre eux rencontre l'Ag complémentaire.

2. Régulation de la différenciation lymphocytaire B

Au cours de la lymphopoïèse, la différenciation lymphocytaire B est sous la dépendance :

- des cellules stromales de la moelle osseuse. Ces dernières régulent la maturation et la survie des précurseurs par l'intermédiaire de diverses cytokines (peptides impliqués dans le développement et la régulation des réponses immunitaires) qu'elles produisent (IL7, Stem Cell factor ou SCF, SDF-1) et de leur récepteur.
- des facteurs de transcription, qui en se fixant sur différents promoteurs sont impliqués dans la quiescence, la survie et la mort des progéniteurs B. Un certain nombre de ces facteurs de transcription apparaissent fondamentaux : Ikaros, E2A, EBF, Pax5 et LF1 . En effet, le promoteur est une région d'ADN située à proximité d'un gène et indispensable à la transcription de l'ADN en ARN. C'est la zone de l'ADN sur laquelle se fixe initialement l'ARN polymérase, avant de démarrer la synthèse de l'ARN. Les séquences promotrices sont en général situées en amont du site de démarrage de la transcription. La fixation et l'activation de l'ARN polymérase sont contrôlées par des facteurs de transcription qui se fixent au niveau de séquences régulatrices spécifiques classiquement appelées "enhancer" et "silencer", situées à des distances variables du site de démarrage de la transcription. Les facteurs de transcription peuvent être soit des activateurs, soit des répresseurs de la transcription.

(b) L'immunopoïèse

La seconde phase, d'activation et de différenciation finale, est dépendante des antigènes, elle s'effectue au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Elle correspond à l'immunopoïèse et aboutit à la formation de plasmocytes et de cellules B mémoires spécifiques d'un antigène. Les lymphocytes B naïfs circulent dans l'organisme via la circulation sanguine et lymphatique jusqu'à rencontrer l'antigène complémentaire de leur Ig de surface. Leur but est d'entrer en contact avec tout organisme étranger (Ag) afin d'essayer de l'éliminer. Une fois que le LB a rencontré l'Ag complémentaire de son BCR, il migre dans les organes lymphoïdes secondaires et plus spécifiquement dans les ganglions. Une fois arrivés dans ces derniers, LB stimulés vont subir une série de transformations. Tout d'abord ils vont proliférer dans la région T du ganglion. Quelques cellules vont alors sécréter une IgM qui correspondra à réponse immune primaire alors que d'autres vont migrer vers une région plus spécialisée appelée follicule primaire. Les LB vont continuer à proliférer si la réponse immune se poursuit transformant le follicule primaire en follicule secondaire (avec centre germinatif). Il va alors y avoir 2 modifications successives des gènes d'Ig :

- Premièrement un processus d'hypermutation somatique sur les chaînes lourdes et légères d'Ig entraînant des modifications de structure des régions CDR du Fab des Ig.
- Deuxièmement, il va y avoir la commutation isotypique, qui remplace le gène codant pour la région Fc constante C μ de l'IgM par un gène codant pour une autre région Fc (G, A, E)

Ensuite les cellules redeviennent matures et subissent une sélection d'affinité. En effet, les Ig de surface modifiée à la surface des LB viennent en contact de l'Ag initial porté par les cellules présentatrices d'Ag. Les cellules B qui portent une nouvelle Ig d'affinité élevée pour l'Ag survivent, tandis que les cellules B qui portent une Ig d'affinité plus faible seront éliminées (apoptose). Ainsi, seules les cellules de forte affinité pour l'Ag sont conservées. Après amplification ces cellules peuvent migrer vers la pulpe rouge de la rate, la médullaire du ganglion ou la moelle osseuse, pour se transformer en plasmocytes qui produisent les anticorps ou les LB peuvent devenir des lymphocytes mémoires qui circuleront indéfiniment dans l'organisme à la recherche de leur Ag complémentaire.

Les plasmocytes, exprimant CD38 et CD138, sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire humorale. Ils produisent et sécrètent les anticorps de la même spécificité que leur BCR à destination de l'ensemble de l'organisme. La durée de vie de ces cellules

sécrétrices peut être courte ou longue selon le type de signaux reçus lors de la stimulation antigénique.

2) Les Immunoglobulines

(a) Structure :

Les Ig sont donc exprimées à la surface des cellules B matures et secrétées en grande quantité par les plasmocytes. Ce sont les effecteurs de la réponse immunitaire humorale.

Les immunoglobulines sont des hétérodimères protéiques, composées de deux chaînes (Figure 5):

- Deux chaînes lourdes H (pour Heavy) identiques
- Deux chaînes légères L (pour Light) identiques.

Chaque chaîne est composée d'une région constante C et d'une région variable V. L'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères définit le site de fixation à l'antigène.

Différentes chaînes lourdes déterminent des classes d'immunoglobulines ou isotypes. Il existe également des sous-classes. On décrit ainsi cinq types de chaînes lourdes : gamma, alpha, mu, delta et epsilon subdivisées en neuf sous-classes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD et IgE. Les chaînes légères sont soit κ soit λ . Ces Ig sont des glycoprotéines possédant une activité anticorps.

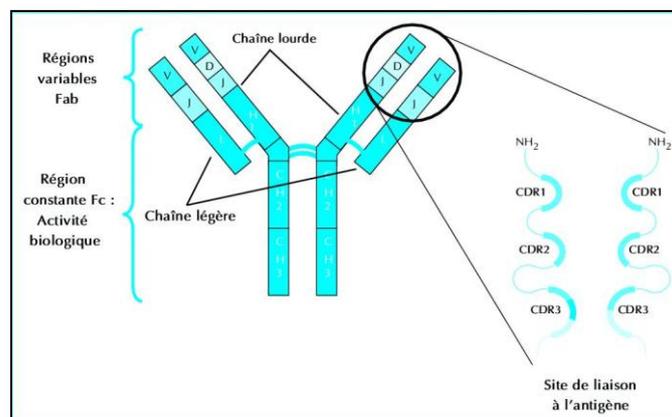


Figure 5: Structure d'une immunoglobuline

(b) Les différentes classes d'immunoglobulines :

Les IgG sont pour la plupart des Ig du sérum et sont toujours monomériques. Sur le tracé électrophorétique des protéines sériques, les IgG migrent dans la fraction des gammaglobulines. Elles protègent l'organisme contre les bactéries, les virus, et certaines toxines. Elles fixent le complément (constituants du système immunitaire) et jouent un rôle dans la réponse mémoire, base de l'immunité durable, qui permet la vaccination.

Les IgA sont aussi présentes dans le sérum. On les retrouve par ailleurs dans la salive les sécrétions du système bronchique et des voies urinaires, dans les larmes, le colostrum et le lait maternel.

Les IgM sont exprimées à la surface des cellules B dès le stade de lymphocyte B immature, dans le complexe moléculaire du BCR. Un taux sanguin d'IgM anormalement élevé est le signe d'une infection en cours ou récente.

L'IgD est une autre Ig fréquemment retrouvée à la surface des cellules B. Elle apparaît à la surface du lymphocyte B mature naïf.

Les Ig M et D possèdent une faible mobilité électrophorétique que les IgG elles se retrouvent dans la fraction des β ou même des α_2 globulines.

Les IgE sont faiblement détectées dans le sérum. Elles se lient aux polynucléaires basophiles et aux mastocytes lors de réactions d'hypersensibilité immédiate. Elles interviennent aussi dans la lutte contre les parasites (Figure 6).

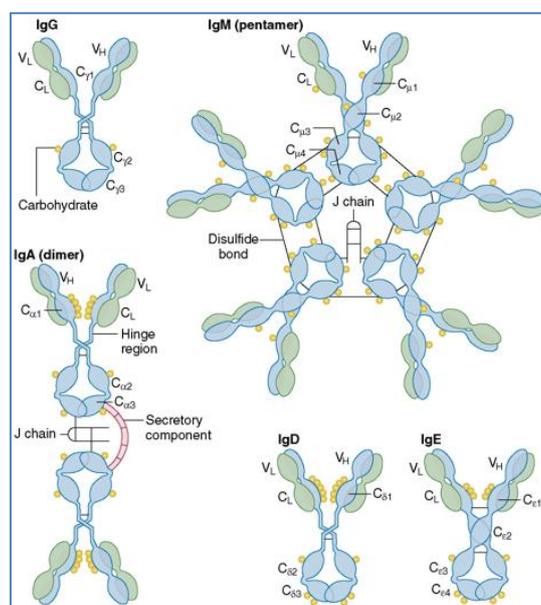


Figure 6: Configuration des différentes immunoglobulines

(c) Organisation et expression des gènes d'immunoglobulines.

La formation des chaînes lourdes et des chaînes légères des immunoglobulines résulte de l'association de plusieurs segments de gènes qui sont organisés en loci sur des chromosomes différents. Le locus des gènes des chaînes lourdes (IGH) se situe sur le chromosome 14, tandis qu'il existe deux loci pour les gènes des chaînes légères (IGL). Les gènes des chaînes légères κ sont situés sur le chromosome 2. Les gènes des chaînes légères λ sont situés sur le chromosome 22.

3) Aspect morphologique et phénotypique des plasmocytes

Dans les conditions physiologiques, les plasmocytes sont des cellules que l'on rencontre très rarement dans la circulation sanguine et qui appartiennent au système lymphoïde. Ils ne représentent que 0.14 à 0.3% des cellules de la moelle osseuse. A l'examen microscopique, le plasmocyte normal est de forme ovalaire et son diamètre varie entre 8 et 20 μm . Il est facilement identifiable par son noyau excentré et son cytoplasme très développé fortement basophile(Figure7).

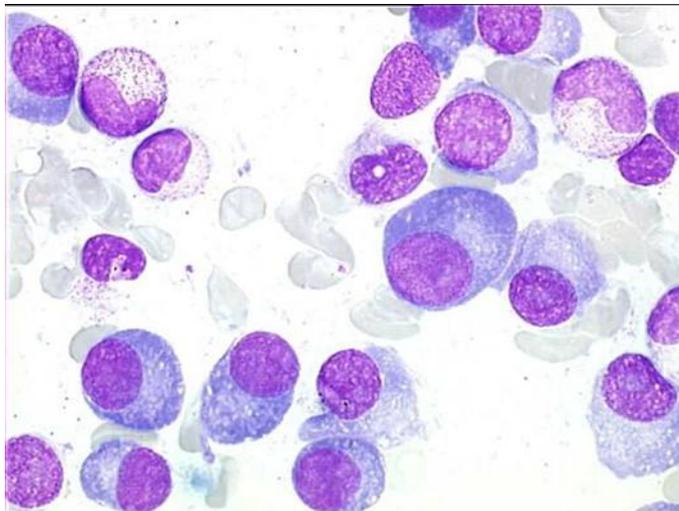


Figure 7 : Myélogramme

Les phénotypes des plasmocytes peuvent être variables d'un individu à l'autre, cependant la co-expression du CD38 et du CD138 permet d'affirmer la nature plasmocytaire d'une cellule médullaire. Ces sont des marqueurs universels à la fois des cellules normales et malignes. Le caractère malin d'un plasmocyte nécessite donc l'analyse d'un profil phénotypique plus élargi. Par exemple l'évaluation de l'expression du CD19, CD27, CD28 et CD56 (Tableau 1 et

2) vont renseigner sur le caractère malin des cellules alors que les CD45, CD221 vont être associés au pronostic du MM (Régis Bataille et al. 2006). On peut imaginer grâce à l'immunophénotypage, pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

| | Normal (BM) | Reactive (PB) | MM (BM) | PCL (PB) | HMCL |
|-------|-------------|---------------|---------|----------|--------|
| CD138 | +++ | +++ and - | +++ | +++ | +++ |
| CD38 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| CD28 | - | - | + | + | + |
| CD56 | - | - | +++ | - | + or - |
| CD19 | + | + | - | - | - |
| CD27 | + | + | + or - | - | - |
| CD45 | + | + | - | - | + or - |

This table illustrates the most frequent phenotype of PC (- means not expressed; + expressed, +++ strongly expressed). The table is a synthesis of previously published data.^{1-2,23-24,25,26,27,28,29,30,31,32} MM: multiple myeloma; PCL: primary plasma cell leukemia; BM: bone marrow; PB: peripheral blood; HMCL: human myeloma cell line.

Tableau 1: Comparaison des phénotypes des cellules plasmatiques normales, réactives et malignes

| | CD56 | CD28 | CD19 | CD27 | CD20 |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|
| Number of patients analyzed | 368 | 335 | 362 | 146 | 209 |
| Number of positive | 287 | 160 | 9 | 74 | 29 |
| Percentage positive | 78.0 | 47.8 | 2.5 | 50.7 | 13.9 |

Expression of CD56, CD28, CD27 and CD20 was evaluated in 368 MM patients at diagnosis. Patients were considered positive when at least 33% of myeloma cells were positive. Phenotype was evaluated in a three-color (CD38, CD138) or four-color (CD38, CD138, CD45) assay. This table is an update of previously published data.^{1-2,2,3}

Tableau 2: Fréquence de l'expression de différents CD chez 368 patients diagnostiqués MM

C. Epidémiologie

Le myélome multiple, ou maladie de Kahler représente 2% de l'ensemble des cancers et 10 % des hémopathies malignes. Après les lymphomes, il représente la deuxième hémopathie maligne. Chaque année, environ 5000 nouveaux cas de myélome sont diagnostiqués en France. L'incidence s'accroît avec l'âge et l'âge moyen de diagnostic est de 65 ans. Il est légèrement plus fréquent chez l'homme que chez la femme, le ratio étant de 3/2.

En 2005, la survie relative à 5 ans était environ de 40 %. Aujourd'hui elle est passée à 65% grâce à l'utilisation de combinaisons de nouvelles molécules (lénalidomide, bortezomib).

D. Physiopathologie

1) Définition

Le myélome multiple est une hémopathie maligne due à la prolifération monoclonale B lymphoïde, s'exprimant par une accumulation de cellules plasmocytaires. Les plasmocytes malins s'accumulent préférentiellement dans la moelle osseuse mais des localisations extra médullaires existent. Elles forment ce que l'on appelle des plasmocytomes. Il en résulte :

- Une dysplasie médullaire reflétée par l'anémie et/ou une leucopénie et une thrombopénie.
- L'invasion et la destruction de l'os
- La production et la sécrétion d'une immunoglobuline monoclonale dans le sang et/ou d'un fragment d'immunoglobuline (chaîne légère libre) dans les urines et à une surproduction de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'interleukine-6 (IL-6).
- Une immunodépression, essentiellement marquée par une baisse des immunoglobulines et une susceptibilité accrue aux infections.

Le type d'Ig produite varie d'un patient à l'autre. Dans 55 % des cas l'Ig monoclonale est de type G, dans 21 % des cas de type A et dans 15 % des cas une chaîne légère, plus rarement une IgD (1% des cas). Les myélomes à IgE ou IgM sont très rares. Dans 2 % des cas le myélome peut être non sécrétant.

2) Origine

La nature exacte de la « cellule souche myélomateuse » n'est pas totalement établie. On peut cependant la définir comme un plasmocyte dérivé de LB ayant été stimulé par un antigène dans les centres germinatifs. L'analyse des gènes des régions variables des chaînes lourdes et légères des Ig a montré que le clone malin est caractérisé par un réarrangement VDJ identique, avec les mêmes mutations en VH et VL qui restent stables tout au long de la maladie. Ce profil démontre l'origine lymphoïde post-folliculaire des cellules de MM.

3) Oncogenèse

Le myélome multiple est précédé par un état « prémyélomateux indolent » (99 % des cas) nommé gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) et/ou par un plasmocytome solitaire osseux.

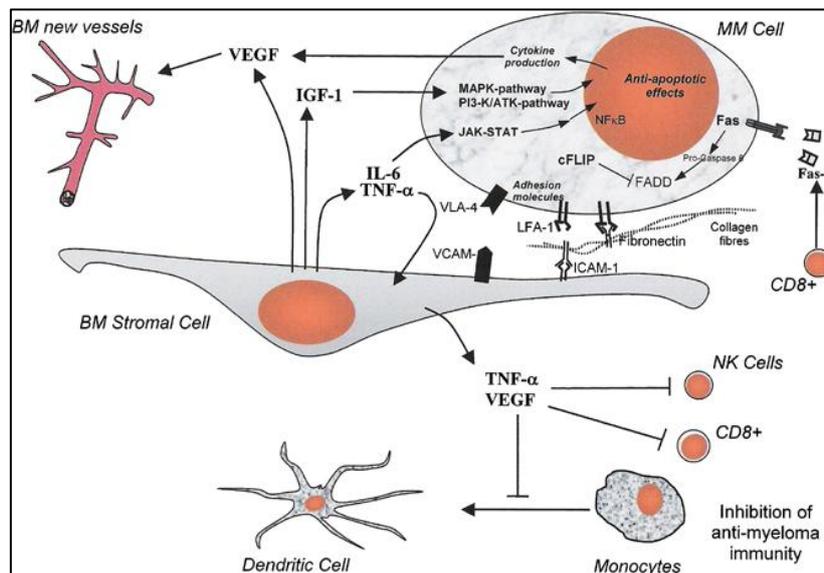
En effet le MM serait l'étape ultime d'un processus impliquant des mutations génétiques successives (Hallek et al. 1998). La première étape serait la translocation du gène des chaînes lourdes des Ig situé sur le chromosome 14 (locus IgH) (Bergsagel et al. 1996; Kuipers et al. 1999; Avet-Loiseau et al. 2002). Au stade MGUS, on s'aperçoit que 50% des patients présente une translocation du chromosome 14 lors du diagnostic. Dans le cas des MGUS, un pic monoclonal modéré est constaté sans aucun signe clinique, radiologique ou biologique, il est décelé en général de façon fortuite, à l'occasion d'une prise de sang, chez 3 à 4 % de la population générale après 50 ans. L'évolution vers un myélome est de l'ordre de 1 % par an. Ainsi à 25 ans de suivi, 1/4 des patients développeront un myélome multiple. L'évolution du stade MGUS à celui de MM est la conséquence de mutations successives des cellules tumorales. Il s'agit de phénomènes oncogéniques impliquant plusieurs gènes tels que le gène RAS, Rb, p53 et les gènes myc ou encore bcl2 dont la mutation, la perte ou la surexpression favorisent l'activation des plasmocytes. Les anomalies chromosomiques ou mutations génétiques observées au sein du myélome multiple sont des facteurs pronostiques.

4) Interaction des cellules tumorales avec leur environnement

Au sein de la moelle osseuse un réseau complexe d'interactions s'organise. Les cellules du microenvironnement communiquent entre elles avec des contacts cellulaires et par l'action de cytokines et de facteurs de croissance, et permettent de recruter les plasmocytes. Ces derniers influencent à leur tour l'environnement afin de leur assurer une survie et une prolifération optimale. Cliniquement, cette interaction se manifeste par des lésions osseuses, qui sont un des signes cliniques majeurs du MM. Les facteurs de croissance et les cytokines vont donc permettre la progression du clone tumoral par l'intermédiaire de leur récepteur membranaire spécifique (récepteurs tyrosine kinases, récepteurs aux cytokines). Ces facteurs sont produits de façon autocrine par les cellules de MM ou de façon paracrine par les cellules du microenvironnement. Physiologiquement, L'IL-6 est le facteur de différenciation des LB en plasmocytes. Lors du myélome multiple cette IL est synthétisée par

les cellules stromales, les ostéoclastes et les ostéoblastes mais aussi par les cellules plasmocytaires elles-mêmes. Cette IL permet l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la protection contre l'apoptose et dans l'induction de la prolifération. Le $TNF\alpha$, l'IL-1b, le $TGF\beta$, le GDF-15 et le VEGF entrent aussi dans ces voies de signalisation. Les cellules tumorales prolifèrent donc en contact étroit avec les cellules du microenvironnement de la moelle osseuse, notamment avec les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Le GDF 15, un facteur de croissance de différenciation, est surexprimé par ces CSM. Il augmente significativement la survie des cellules myélomateuses. Le GDF15 active, par phosphorylation d'Akt, la voie de signalisation PI-3K/Akt et permet la prolifération des cellules responsables de la maladie (Corre et al. 2012). La survie et la prolifération des cellules de MM induites par les différents facteurs de croissance et cytokines passent par 4 voies de signalisation : la voie JAK/STAT, la voie PI-3K/Akt, la voie des MAPK et la voie NF-Kb (Bruno et al. 2005). Chacune de ces voies est une cible thérapeutique potentielle.

Figure 8: Le microenvironnement du myélome



E. Conséquences cliniques et physiopathologie du myélome multiple

Les éléments cliniques qui caractérisent le MM peuvent être présents dès le diagnostic, ou apparaître au cours de l'évolution de la maladie. Différents symptômes généraux, non spécifiques mais habituels et précoces sont présents tels qu'une altération de l'état général. À côté de cela, le MM se manifeste par des symptômes plus spécifiques, notamment osseux et rénaux.

1) Douleurs osseuses :

Une grande partie de la morbidité du myélome est imputable à des douleurs osseuses et des fractures pathologiques en raison d'un déséquilibre de formation et de résorption de la trame osseuse. Elles résultent d'une augmentation de l'activité ostéoclastique au contact des plasmocytes. En effet, ces derniers stimulent la sécrétion de cytokines activatrices des ostéoclastes, telles que les interleukines (IL) : IL-6, l'IL-1, le Tumor Necrosis Factor TNF- β , ou encore les Macrophage Protein Inflammatoire (MIP-1a, MIP-1b) aboutissant à une augmentation de la résorption osseuse avec ostéolyse diffuse ou multifocale. De plus, il existe une dérégulation du système RANK-RANKL ostéoprotégérine (système essentiel dans l'activation et la différenciation des ostéoclastes)(Sfiridaki et al. 2011).

Le récepteur RANK est présent à la surface des ostéoclastes et appartient à la famille des récepteurs au TNF. L'agoniste de ce récepteur RANK est le RANK-L (RANK-ligand), protéine exprimée et libérée par les ostéoblastes et par les lymphocytes T.

L'activation du récepteur RANK induit la maturation et l'activation des ostéoclastes et provoque une résorption osseuse contribuant à l'apparition de l'ostéoporose.

L'ostéoprotégérine, appelée OPG, également sécrétée par les ostéoblastes, est une protéine soluble qui joue le rôle de récepteur-piège pour le RANK-L (c'est-à-dire que RANK-L se fixe à OPG et est ainsi neutralisé) (Figure9).

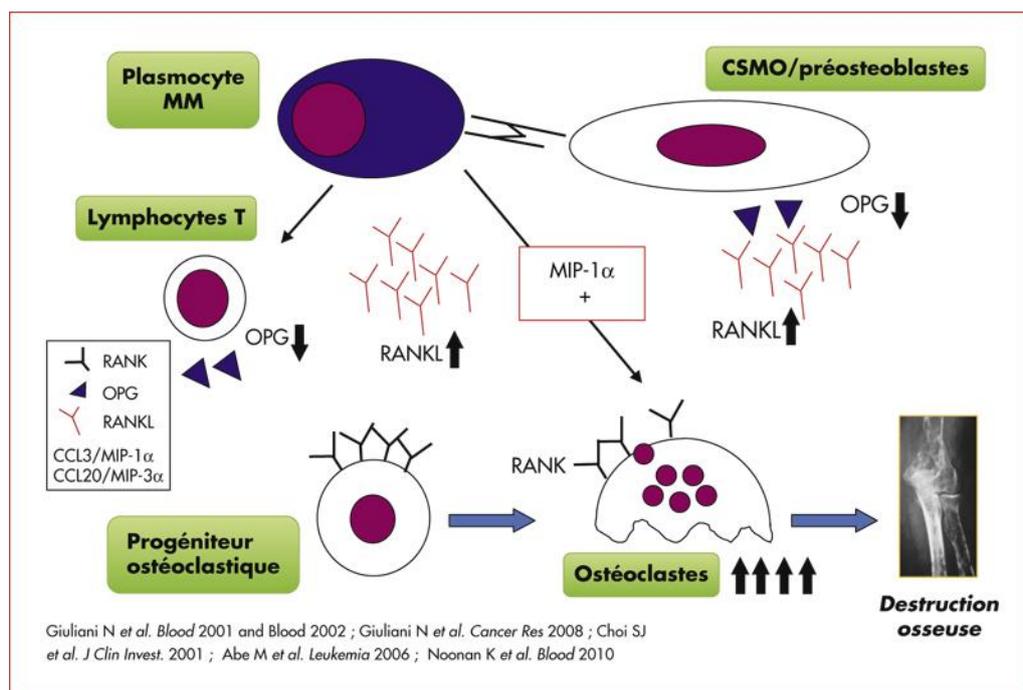


Figure 9 : Physiopathologie de l'activation ostéoclastique au cours du MM.

Les symptômes osseux sont fréquemment révélateurs de la maladie. Les douleurs osseuses diffuses sont présentes chez environ 70 % des patients, d'apparition le plus souvent brutale, elles sont principalement localisées au niveau du rachis (tassement vertébraux compliqués ou non de compression médullaire ou radiculaire) et des côtes. Parfois Le myélome est évoqué devant des fractures pathologiques : fractures des os longs et du bassin ou devant des tassements vertébraux.

2) Signes d'hypercalcémie

L'hypercalcémie est liée à l'importance de la résorption osseuse, elle est le plus souvent symptomatique et concerne 20 % à 30 % des patients. Ses principales manifestations cliniques sont digestives, neurologiques, cardio-vasculaires et métaboliques. Il s'agit d'un élément de gravité.

3) Anémie :

L'anémie est présente chez la moitié des patients et peut être révélatrice du myélome. Il s'agit d'une anémie normocytaire normochrome peu ou pas régénérative. L'envahissement médullaire par les plasmocytes malins et la présence des cytokines du micro environnement inhibitrice de l'érythropoïèse (action du TNF et de l'IL-1) explique d'une part cette anémie. Le syndrome inflammatoire et l'insuffisance rénale avec baisse du taux plasmatique de l'érythropoïétine contribue aussi à l'anémie. Le taux d'hémoglobine se situe le plus souvent vers 10 g/dl. La fatigue est donc un symptôme classique du myélome multiple.

En 2002 Silvestri et al ont décrit le mécanisme principal d'altération de l'érythropoïèse dans le myélome, le contact direct entre érythroblastes immatures et plasmocytes malins par l'intermédiaire des molécules Fas-L et Trail entraîne une cytotoxicité sur ces précurseurs de la lignée rouge, une inhibition de leur maturation et une apoptose(Silvestris et al. 2002).

4) Signes d'atteinte rénale

Environ 50 % des patients atteints de myélome présentent une atteinte rénale ; celle-ci est due à une production excessive de chaînes légères d'Ig monoclonales.

La néphropathie à cylindre myélomateux ou tubulopathie myélomateuse est de loin la plus fréquente des complications rénales du myélome et représente 80 % des insuffisances

rénales aiguës. Elle est liée à la précipitation intra tubulaire de cylindres composés de l'agrégation de chaînes légères néphrotoxiques et de la protéine de Tamm et Horsfall synthétisée par les cellules de la branche ascendante de l'anse de Henlé. Cette obstruction tubulaire conduit à la rupture de la membrane basale.

La néphropathie par dépôts (glomérulaires et/ou tubulo-interstitiels) peut aussi être observée. D'une part on peut retrouver des dépôts de fibrilles d'amylose de type AL qui se caractérisent par le dépôt extracellulaire de chaînes légères monoclonales (le plus souvent lambda) et d'autres protéines (composant amyloïde P), organisé en feuillets formant ainsi des fibrilles. Dans la maladie de Randall, on observe des dépôts non fibrillaires de chaînes légères.

Cette atteinte rénale peut être déclenchée ou aggravée par une déshydratation, une infection, des traitements médicamenteux (notamment l'injection de produits de contraste iodés) ou encore l'hypercalcémie (précipitation des sels de Ca au niveau tubulaire).

5) Les infections

La prédisposition aux infections est l'une des morbi-mortalités de la maladie. La présence des plasmocytes dans la moelle osseuse entraîne une inhibition des fonctions immunitaires normales, comme la production d'anticorps (reflétée par une hypogammaglobulinémie), l'inhibition des fonctions T ou l'activation aberrante de la fonction monocyte macrophage. Les patients sont sensibles aux infections virales et aux bactéries encapsulées. Leur neutropénie les rend cependant vulnérables à toute infection. On observe le plus souvent des infections bactériennes pulmonaires (pneumocoque, Haemophilus Influenzae), urinaires ou encore des septicémies à gram négatif.

6) Complications neurologiques

Il s'agit le plus souvent de compression médullaire par tassement vertébral. En effet, la compression de la gaine nerveuse est expliquée par la contiguïté avec l'atteinte osseuse et la prolifération plasmocytaire. Cette atteinte médullaire entraîne donc des paraplégie ou quadriplégies imposant un traitement urgent (chirurgie, radiothérapie, corticoïdes à haute dose) afin de préserver la motricité. On peut également observer des neuropathies sensitivomotrices, rares, souvent associées à un plasmocytome localisé ostéocondensant ou à une amylose (syndrome du canal carpien, signes de neuropathie périphérique). Les Ig monoclonale par leur effet d'anticorps direct vont se diriger contre les structures nerveuses

(par exemple AC anti myéline) ou encore des fibrilles vont se déposer le long des axes nerveux.

7) Syndrome d'hyperviscosité

Lorsque le taux d'Ig est important, l'hyperprotidémie peut être responsable d'un syndrome d'hyperviscosité et d'une hypervolémie plasmatique. Différents symptômes sont alors observés comme un syndrome hémorragique par thrombopathie avec des ecchymoses, des épistaxis, des hémorragies intestinales. D'autres symptômes neurologiques comme des céphalées, des troubles de la vision, des bourdonnements d'oreille ou une confusion peuvent accompagner le MM. Il est rare mais nécessite des plasmaphérèses en urgence.

F. Biologie du myélome multiple

1) Biochimie initiale :

- Dosage des protéines totales sériques

La protidémie est souvent augmentée (90 à 100 g/l). L'hyperprotidémie reflète l'augmentation d'une immunoglobuline monoclonale circulante dans le MM. Cependant, une hypoprotidémie est souvent trouvée dans les formes à chaînes légères.

- Électrophorèse des protéines plasmatiques (EPP)

Afin d'affirmer la présence d'une Ig monoclonale sérique on doit procéder à l'électrophorèse des protéines. Dans 85 % des cas le pic d'immunoglobuline est identifié (Figure 10 et 11).

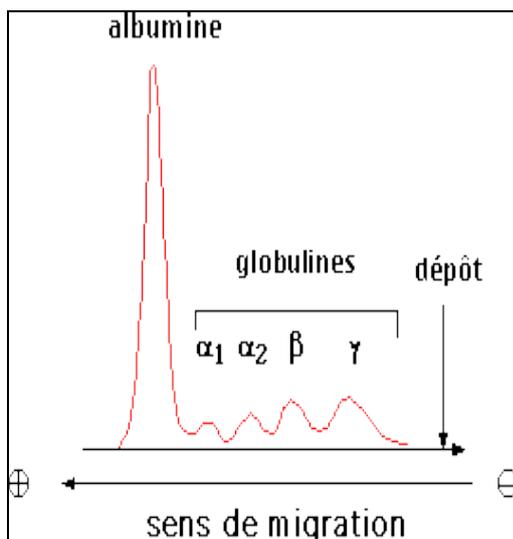


Figure 10: Electrophorèse des protéines, Profil Normal

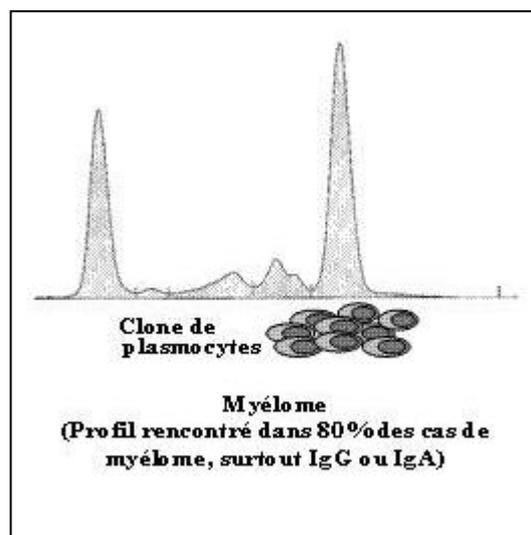


Figure 11 : Electrophorèse des protéines, Profil de gammopathie monoclonale

- Immunofixation des protéines sériques

En cas de pic monoclonal détecté à l'électrophorèse, une immunofixation des protéines sériques est réalisée (Figure 12). Elle permet d'identifier la chaîne lourde et légère de la protéine monoclonale. Pour la chaîne lourde, il s'agit le plus souvent d'une IgG ou d'une IgA.

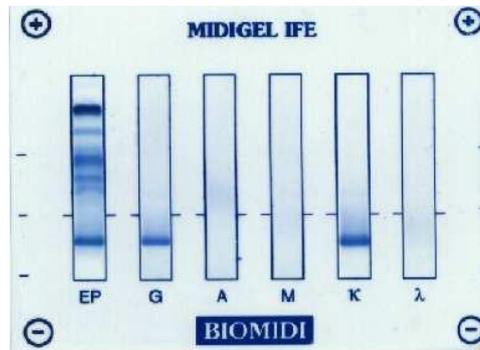


Figure 12: Immunofixation des protéines sériques: Mise en évidence d'une IgG chaîne K

- Dosage pondéral des Ig sériques ou des chaînes légères sériques

- Protéinurie des 24 heures et Electrophorèse des protéines urinaires

Dans 15 % des cas les plasmocytes ne sécrètent que des chaînes légères d'immunoglobuline et l'EPP sérique ne décèle pas de pic mais une hypogammaglobulinémie portant sur les immunoglobulines polyclonales. On retrouve alors des chaînes légères dans les urines sous forme d'une protéinurie dite de Bence-Jones. On procède donc à la recherche des protéines sur les urines de 24 H. Il faut savoir que la protéinurie est mal détectée par les bandelettes réactives, en cas d'anomalie, elle est complétée, par une électrophorèse des protéines urinaires et immunofixation (recherche de la protéine de Bence-Jones) qui peut être, dans certains cas, le seul signe pathologique (Figure 13).

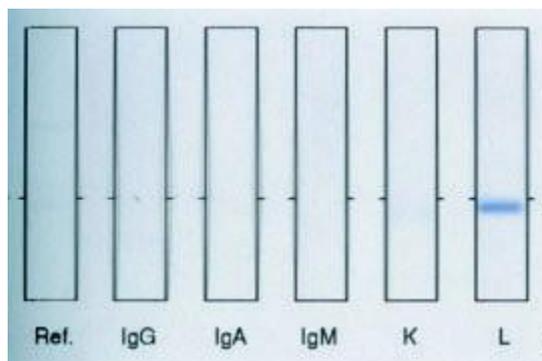


Figure 13: Immunofixation des protéines urinaires : Mise en évidence d'une chaîne légère λ

Cette Ig peut-être :

- complète: IgG (55 %), IgA (20 %), IgD (1 %), IgE exceptionnelle ;
- incomplète, sous la forme :
 - d'une chaîne légère kappa ou lambda (15 à 20 % des cas) ;
 - de chaînes légères en excès (15 à 20 % des cas) dans les urines ;
- non sécrétée (très rare, < 1 % des cas) dans le cas de myélome non sécrétant.

2) Biochimie complémentaire :

- Vitesse de Sédimentation (VS) et Protéine C Réactive (CRP)

Une élévation très marquée de la VS, supérieure à 20 mm à la première heure est le plus souvent rencontrée. Dans le cas d'un myélome multiple non sécrétant ou d'un myélome multiple à chaînes légères la VS est normale. La VS est un examen très sensible mais peu spécifique qui est influencé par l'anémie ou encore un contexte inflammatoire ou infectieux. Le dosage de la C Reactiv Protein (CRP) rend spécifiquement compte de l'inflammation bien plus que la VS. La CRP est synthétisée par les hépatocytes en réponse à l'IL-6, indirectement elle reflète donc le taux sérique d'IL-6 qui joue un rôle majeur dans le myélome. Cependant, ce n'est pas un marqueur spécifique du myélome, car cette protéine de la phase aiguë de l'inflammation peut être augmentée par de nombreux autres facteurs.

- Dosage des LDH (lactate déshydrogénase) et de la β 2-microglobuline sérique

Le dosage de la β 2-microglobuline est l'un des paramètres biologiques dont la valeur pronostic est fiable (R Bataille, Grenier, and Sany 1984). Ce dosage reflète en grande partie la masse tumorale. En effet la β 2-microglobuline est surexprimée à la surface des plasmocytes malins et relarguée dans le sérum par clivage protéolytique. Ainsi plus la masse tumorale est importante plus le taux de β 2-microglobuline est élevé. Cependant l'augmentation de ce paramètre biologique peut aussi être due à une insuffisance rénale. L'élévation des LDH est un facteur de pronostic défavorable.

- Albuminémie

On constate chez 40 % des patients un taux d'albumine sérique abaissé lors du diagnostic.
L'hypo albuminémie est un facteur pronostic défavorable.

- Dosage de la calcémie

On recherche une hypercalcémie liée à l'ostéolyse. Pour cela on détermine la calcémie que l'on corrige grâce à l'albuminémie afin de calculer la calcémie corrigée.

Calcémie corrigée = calcémie mesurée - 0,025 (albuminémie - 40) avec calcémie mesurée en mmol/L et albuminémie en g/L.

- Bilan rénale

L'atteinte rénale est évaluée par la créatininémie, la clairance à la créatinine et la protéinurie des 24 h. De plus une hyperuricémie peut mettre en évidence une insuffisance rénale.

3) Hématologie :

- Hémogramme : NFS et frottis sanguin

L'hémogramme met en évidence une anémie normochrome, normocytaire arégénérative et plus rarement une leucopénie et/ou une thrombopénie.

Sur le frottis sanguin, on peut observer des hématies en rouleaux ou encore une plasmocytose discrète est possible (Figure14).

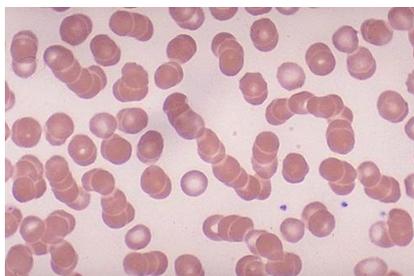


Figure 14: Hématies en rouleaux

- Le MYÉLOGRAMME : mise en évidence de la prolifération plasmocytaire

Dans le MM, une infiltration plasmocytaire supérieur à 10% est détectable mais n'est pas forcément homogène. Ce pourcentage de plasmocytes peut varier de façon significative selon le site d'aspiration, et parfois même la moelle peut apparaitre normale. En effet les

plasmocytes tumoraux s'agrègent pour former des colonies. Il peut être alors nécessaire de refaire la ponction de moelle dans un autre territoire, ou bien de réaliser une biopsie ostéo-médullaire (BOM). Le myélogramme par ponction médullaire reste cependant l'examen de référence (prélèvement sternal ou iliaque), la BOM est nécessaire seulement si le myélogramme est non contributif. Le myélogramme permet de détecter une infiltration plasmocytaire quantitativement et/ou qualitativement anormale.

Le plasmocyte est aisément reconnaissable par son cytoplasme largement basophile son noyau ovalaire et excentré dans la cellule. On observe de plus des plasmocytes souvent anormaux, binucléés avec un cytoplasme en flamme ou encore des cellules de Mott (présence de vacuoles). (Figure 15, 16,17)

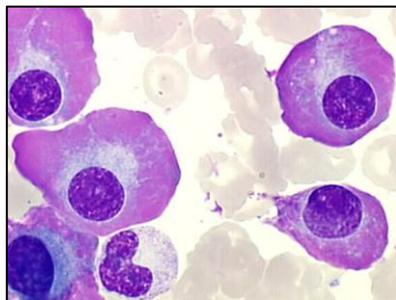


Figure 15: Plasmocyte à cytoplasme en flamme

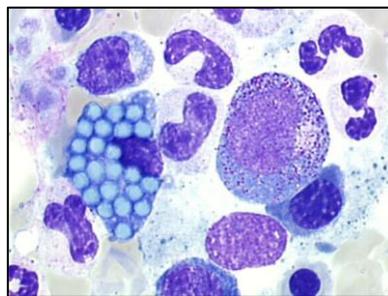


Figure 16: Cellules de Mott

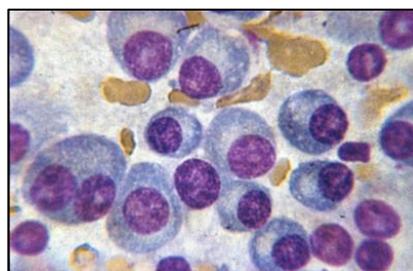


Figure 17: Plasmocyte à noyau binucléé

Le myélogramme permet également l'analyse cytogénétique réalisée à visée pronostique. Le phénotypage des plasmocytes médullaires n'est pas indispensable pour le diagnostic. Il

confirmerait le caractère clonal des plasmocytes avec un isotype des chaînes lourdes et légère identique à celui de l'Ig monoclonale sérique. Le myélogramme peut être complété par l'analyse caryotypique des plasmocytes médullaires qui a un intérêt pronostique.

4) Confirmation du diagnostic

Le diagnostic de certitude de myélome multiple repose sur trois critères :

- la présence d'une immunoglobuline monoclonale dans le sérum et/ou les urines révélée après immunoelectrophorèse des protéines sériques et urinaires ;
- la mise en évidence d'une plasmocytose médullaire supérieure ou égale à 10 % sur le myélogramme
- le retentissement clinique et biologique de cette infiltration plasmocytaire.

Le traitement repose, entre autre, sur le caractère symptomatique du myélome avec l'existence de symptômes cliniques ou d'une atteinte d'organe définie par au moins une des anomalies suivantes (critères CRAB) : C : hypercalcémie R : insuffisance rénale A : anémie B : atteinte osseuse (Bone)

Les différentes formes cliniques sont présentées dans le tableau 3 suivant :

| | | |
|--|---|---|
| MGUS | Pas de symptômes [critères CRAB] | Immunoglobuline monoclonale détectée mais < 30 g/L si IgG et plasmocytose médullaire < 10 % |
| Myélome multiple asymptomatique | Pas de symptômes [pas de critères CRAB] | Immunoglobuline monoclonale détectée à des taux > 30 g/L si IgG ou IgA ou IgD monoclonale et/ou plasmocytose médullaire ≥ 10 % |
| Myélome multiple symptomatique | Symptômes [critères CRAB] | Immunoglobuline monoclonale détectée dans le sérum et/ou les urines et/ou Plasmocytose médullaire ≥ 10 % |

Tableau 3: Définition des formes cliniques

G. Critères pronostiques

1) Classification de Durie et Salmon

La classification historique de Durie et Salmon a été publiée en 1975 (B. G. Durie and Salmon 1975). Elle permet d'apprécier la masse tumorale dans le MM et repose sur des critères cliniques et biologiques simples tel que le pourcentage d'infiltration médullaire par les plasmocytes, la présence d'une immunoglobuline monoclonale dans le sérum ou des chaînes légères de l'immunoglobuline urinaire, le taux d'hémoglobine, la calcémie, l'atteinte rénale du patient et enfin le nombre de lésions osseuses ostéolytiques traditionnellement défini par la radiographie du squelette. Les patients sont ainsi classés en trois catégories selon l'importance de la masse tumorale, et de la fonction rénale qui définit des sous-groupes (Tableau 4).

Une mise à jour de cette classification a été proposée en 2005 par l'INTERNATIONAL MYELOMA FOUNDATION. Elle se nomme SALMON DURIE et PLUS. En plus des critères classiques, cette classification propose d'utiliser les techniques d'imagerie moderne telles que le scanner, la TEP/CT au [¹⁸F]-FDG ou l'IRM de la colonne vertébrale pour apprécier les lésions osseuses.

| Masse tumorale Critères requis | <u>Stade I</u> faible tous | <u>Stade II</u> intermédiaire ni I ni III | <u>Stade III</u> forte au moins un |
|--|----------------------------------|---|--|
| <u>Protéine M</u> | | | |
| sérique | IgG < 50 g/L IgA < 30 g/L | | IgG > 70 g/L IgA > 50 g/L |
| urinaire | PBJ < 4 g/24 h | | PBJ > 12 g/24 h |
| <u>Hémoglobine</u> | > 10 g/dL | | < 8,5 g/dL |
| <u>Calcémie</u> | < 3 mmol/L (120 mg/L) | | > 3 mmol/L (120 mg/L) |
| <u>Lésions osseuses</u> | ≤ 1 | | > 3 |
| <u>Sous-classification</u> | | | |
| - A définit une fonction rénale préservée (créatininémie < 175 µmol/L soit 20 mg/L) | | | |
| - B définit une insuffisance rénale (créatininémie ≥ 175 µmol/L soit 20 mg/L) | | | |

Tableau 4: Classification de DURIE et SALMON

Cette classification reste d'actualité mais il ne faut pas ignorer que sa valeur pronostique est finalement inférieure à celle de la β_2m et des anomalies cytogénétiques

2) International Staging System (ISS)

L'ISS est un nouvel indice international de valeur pronostique basé sur la combinaison de deux paramètres biologiques prédictifs de la durée de survie, la β_2 -microglobulinémie et l'albuminémie. Il en résulte une classification en trois stades (Tableau 5).

| <u>Stade</u> | I | II | III |
|--------------------------------|---|--------------------|-------------------------------|
| <u>Critères</u> | β_2m sérique < 3,5 mg/L et albuminémie > 35 g/L | <i>ni I ni III</i> | β_2m sérique > 5,5 mg/L |
| <u>Durée de survie médiane</u> | 62 mois | 44 mois | 29 mois |

Tableau 5: Classification ISS

Le groupe III est un groupe hétérogène de patients qui n'ont en commun que l'élévation de la β_2m sérique, ce qui peut être lié une masse tumorale importante comme à une insuffisance rénale. Il est donc nécessaire d'avoir d'autres critères afin d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique du patient. L'ISS n'intègre pas non plus la cytogénétique et n'a pas été validé dans le contexte des nouvelles thérapeutiques.

3) Analyse cytogénétique des plasmocytes tumoraux.

Il s'agit d'établir un caryotype des cellules tumorales pour identifier les anomalies génétiques. Elle doit être systématiquement pratiquée car il s'agit d'un examen pronostique essentiel. Une analyse en FISH (fluorescence in situ hybridization) est aussi réalisée.

L'analyse cytogénétique des plasmocytes tumoraux est complexe car l'infiltration tumorale est hétérogène et les plasmocytes sont des cellules différenciées avec un index de prolifération faible.

On sait aujourd'hui que dans le MM les anomalies chromosomiques sont observées chez près de 90% des patients (Avet-Loiseau et al. 2007). Ce sont des événements précoces qui participent au processus de pathogénèse. Le MM est caractérisé par l'existence d'anomalies

cytogénétiques nombreuses et complexes, numériques et/ou structurales. Le caryotype peut ainsi présenter un grand nombre d'anomalies chromosomiques, différentes d'un individu à l'autre. La fréquence des anomalies cytogénétiques diffère en fonction du stade et de l'évolution de la pathologie.

La ploïdie apparaît comme un paramètre important, à la fois dans la biologie et dans l'évolution clinique du MM (Wuilleme et al. 2005). On retrouve une hyperdiploïdie (47 à 60, voir 75 chromosomes) chez environ la moitié des patients et une hypodiploïdie dans environ 30 à 40% des cas (Avet-Loiseau et al. 2007). Les anomalies de nombre peuvent occasionner la perte de gènes suppresseurs de tumeurs, comme c'est le cas pour la délétion du chromosome 13. Cette anomalie est trouvée chez à peu près la moitié des patients (Facon et al. 2001). Il peut s'agir d'une délétion partielle (del13q-), mais dans la plupart des cas c'est une délétion totale du chromosome, ou monosomie 13 (**del13**).

De plus, on peut retrouver des anomalies structurales sous forme de translocations concernant de nombreux chromosomes et de nombreux locus sur le bras court ou long d'un chromosome (Figure 18).

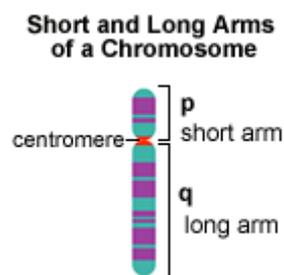


Figure 18: Structure d'un chromosome

Les anomalies structurales les plus remarquables font intervenir le chromosome 14, et plus particulièrement le locus 14q32 des chaînes lourdes des Ig (IgH). Près de 60% des patients présentent une anomalie touchant cette région. D'autres translocations impliquent les loci des chaînes légères des Ig, IgLk (2p12) et IgLλ (22q11) ; elles sont moins fréquentes et moins étudiées. Les conséquences se traduisent par la surexpression du gène qui est venu à proximité de l'un des *enhancers* du gène des IgH ou des IgL. En effet, les *enhancers* des Ig sont fortement activés dans les cellules B, et tout particulièrement dans les plasmocytes. Or, les partenaires impliqués dans ces translocations sont dans la plupart des cas des oncogènes, dont l'expression se trouve dérégulée. Ainsi, parmi les loci partenaires les plus fréquemment

impliqués dans les translocations IgH figure celui de la cycline D1 qui intervient dans la régulation du cycle cellulaire : la translocation **t (11;14)(q13;q32)** est trouvée dans environ 20% des MM. La translocation **t(4;14)(p16;q32)** est observée dans environ 15% des MM. Elle entraîne la dérégulation de *FGFR-3* (*fibroblast growth factor receptor-3*, locus4p16), récepteur transmembranaire pour les FGF (*fibroblast growth factor*) exprimés par les cellules stromales, dont la forme activée est un oncogène. Dans 2 à 10% des cas c'est le locus 16q23 (*c-maf*) qui est impliqué (**t (14;16)** (q32;q23)). D'autres loci sont trouvés de façon récurrente, bien que plus rare.

Les études faites en cytogénétique conventionnelle ont donc permis de définir de nombreuses anomalies chromosomiques. Des délétions partielles, touchant notamment les chromosomes 13 et 17, des mutations ou des méthylations de promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur, ou encore la phosphorylation d'oncogènes sont observés. p53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les pathologies malignes humaines. Son inactivation, par délétion (del17p13) ou mutation, est observée dans certains cas de MM, plus particulièrement dans les stades avancés de la maladie. La délétion **del17p** est détectable chez environ 10% des patients (Avet-Loiseau et al. 2007). Les mutations de *p53* sont observées avec une prévalence de 5% au diagnostic, et 20-40% des MM avancés (Fonseca et al. 2004) (Tableau 6).

| Genomic aberration | Incidence, % (no. of patients analyzed for the aberration) |
|--------------------|--|
| del(13) | 48 (936) |
| t(11;14)(q13;q32) | 21 (746) |
| t(4;14)(p16;q32) | 14 (716) |
| Hyperdiploidy | 39 (657) |
| MYC translocations | 13 (571) |
| del(17p) | 11 (532) |

Tableau 6 : Incidence des anomalies chromosomiques dans le MM.

De nombreuses anomalies chromosomiques ont un impact pronostique défavorable, les délétions del (13), del (17p), les translocations t (4 ; 14) t (14 ; 16) t (14 ; 20), l'hypodiploïdie ainsi que les gains de 1q sont associés à une évolution défavorable tant au plan de la survie sans évènement que de la survie globale. Il semblerait que certaines de ces anomalies chromosomiques et leur impact pronostique ne soit pas indépendants les uns des autres

mais bien au contraire associés. La del 13, les gains de 1q ou encore les anomalies de ploïdie ne représente pas à eux seul un facteur pronostique. Actuellement on peut dire que les principaux facteurs pronostiques défavorables sont la t (4 ; 14) la del17p et la t (14 ; 16), ce qui permet d'identifier un groupe de patients (Tableau 7).

| Genomic aberration | Impact on EFS, mo* (P) | Impact on OS† (P) |
|--------------------|------------------------|-----------------------------|
| del(13) | 29 vs 41 (< .001) | 68% vs 83% (< .001) |
| t(11;14)(q13;q32) | 35 vs 34 (.2) | 80% vs 74% (.28) |
| t(4;14)(p16;q32) | 20.6 vs 36.5 (< .001) | 41.3 months vs 79% (< .001) |
| Hyperdiploidy | 37 vs 33 (.02) | 82% vs 70% (.006) |
| MYC translocations | 35 vs 37 (.94) | 72% vs 78% (.50) |
| del(17p) | 15 vs 35 (< .001) | 22 months vs 75% (< .001) |

*Median EFS for patients presenting the chromosomal abnormality versus that of those who did not present the genomic aberration.

†Median OS for patients presenting the chromosomal abnormality versus that of those who did not present the genomic aberration. When the median was not attained, we did calculate the percentage of patients alive at the time of median follow-up (ie, 41 months).

Tableau 7: Valeur pronostique des anomalies

Grace à l'hybridation moléculaire in situ en fluorescence et aux anomalies génétiques mise en évidence sur les plasmocytes présents dans la moelle, le myélome peut être classé en catégories dont les traitements vont varier. Par exemple la présence de t (4 ; 14) considéré comme un faible facteur de risque répond aujourd'hui très bien au Velcade® (bortezomib). Par opposition à la del 17p qui elle est de plus mauvais pronostic en termes de réponse au traitement.

H. La prise en charge thérapeutique

En l'absence de symptômes, l'indication de traitement n'est pas requise, une surveillance clinique biologique et radiologique tous les 3 à 6 mois doit cependant être mis en place.

La prise en charge thérapeutique se trouve être uniquement chez les patients présentant un myélome symptomatique : c'est-à-dire avec atteinte de la fonction de certains organes (critères CRAB : l'hypercalcémie, l'insuffisance rénale, l'anémie et l'atteinte osseuse). Le meilleur choix pour chaque patient va dépendre de facteurs individuels comme l'âge, le stade, les facteurs génétiques, la fonction rénale et l'acceptation du patient.

Les options thérapeutiques comprennent la chimiothérapie d'induction, les traitements intensifs et enfin les traitements de support. Depuis l'introduction en 1962 du melphalan,

médicament historique dans le traitement du myélome, de nombreuses options thérapeutiques ont été utilisées. Les chimiothérapies conventionnelles les plus courantes furent l'association des corticoïdes et des produits alkylants. Le MP melphalan/prednisone fut la première combinaison pour le traitement initial du myélome. Puis des protocoles de chimiothérapie intensive ont été mise en place avec autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Désormais de nouveaux agents comme la thalidomide, le lénalidomide et le bortezomib permettent une nouvelle approche de la prise en charge du patient. Aujourd'hui, il n'y a pas de consensus sur le traitement type du myélome.

1) Traitement du myélome du sujet jeune (≤ 65 ans) éligible à la greffe

À ce jour, le schéma de référence associe une chimiothérapie d'induction puis un prélèvement de CSH autologues, une phase d'intensification chimiothérapique suivie de la réinjection des CSH autologues (autogreffe). L'intérêt d'un traitement de consolidation et/ou d'entretien est discuté. ("CR2011-Fr_b2.pdf" 2014)

(a) Phase d'induction :

En général, le schéma de référence associe une chimiothérapie de réduction tumorale basée sur une association d'un corticoïde et d'un alkylant. On procède à des cycles jusqu'à l'obtention d'une réponse. Cette induction dure généralement 2 à 4 mois. Les recommandations concernant les thérapies initiales pour les candidats à une autogreffe sont les suivantes :

Thalidomide/dexaméthasone (TD) par voie orale

Velcade[®]/dexaméthasone (VD)

Velcade[®]/thalidomide/dexaméthasone (VTD)

Revlimid[®] / dexaméthasone faible dose (revlodex) par voie orale

Ces quatre protocoles peuvent aboutir à une réponse rapide et importante.

Pour choisir le protocole le plus adapté au patient, il est important de tenir compte des différents facteurs. Par exemple on choisira plutôt des schémas comprenant le Velcade[®] pour des patient à très mauvais pronostic et dont la fonction rénale est déjà atteinte.

Les thérapies combinées comprenant les nouveaux agents Revlimid[®], thalidomide et Velcade[®] comme thérapie initiale sont associés à des taux de réponse et de survie sans

progression semblables à ceux de la greffe de cellules souches autologues. Ainsi la greffe peut être reportée si besoin sans renoncer à l'efficacité.

(b) Phase d'intensification avec greffe :

La greffe permet d'administrer une chimiothérapie à très forte dose. Trois semaines après la fin du traitement d'induction, les patients recevront une perfusion de cyclophosphamide et de filgrastim, suivi quelques jours plus tard d'une collecte de CSH autologues dans le sang en vue d'une autogreffe. Pour cela les cellules souches sont recueillies au cours d'une cytophérèse avant la chimiothérapie intensive puis sont congelées et réinjectées une fois le traitement intensif terminé. Le traitement intensif correspond au melphalan forte dose IV 200 mg/m². La durée de l'ensemble de ce traitement est d'environ 6 mois (Harousseau 2009).

2) Traitement des patients âgés non éligible pour une greffe de cellules souches autologues.

Pour les personnes âgées de plus de 65 ans, le schéma de référence comporte une chimiothérapie sans intensification par autogreffe. À ce jour, il existe deux traitements de référence :

- l'association « melphalan-prednisone-thalidomide » (MPT) par voie orale
- l'association « melphalan-prednisone-bortezomib » (MPV) où le Velcade[®] est administré en IV.

Ces traitements sont administrés selon des cycles de 28 jours. Ils sont poursuivis jusqu'à l'obtention d'une réponse maximale (généralement après plusieurs cycles) et peuvent durer entre 12 et 18 mois. La réponse au traitement est évaluée dès les premiers cycles et en fin de traitement. En l'absence de réponse, un protocole de deuxième ligne sera proposé.

Le risque de thrombose veineuse profonde est une préoccupation avec le protocole MPT et les traitements MPT et MPV sont tous les deux associés à un risque de neuropathie.

Les autres options sont le MP ou thalidomide/dexaméthasone ou Revlimid[®]/dexaméthasone peuvent être envisagées.

Des études sont en cours sur l'intérêt d'un traitement de consolidation et/ou d'entretien. Le traitement des symptômes est également assuré.

3) Phase d'entretien :

L'INF α est utilisé comme traitement d'entretien d'une rémission induite par un traitement intensif. Les résultats sont très contradictoires et la toxicité est non négligeable. La prednisone représente un agent d'entretien efficace et probablement supérieur à l'INF α . La prednisone administrée trois fois par semaine à 50 mg semble prolonger la rémission et la survie. Les résultats concernant le Revlimid[®] faible dose sont prometteurs en post greffe. Il prolonge la survie sans progression mais semblerait donner des cancers secondaires.

Le Velcade[®] a amélioré la survie sans progression et la survie globale et a montré des effets bénéfiques chez les patients à faible risque de délétion 17p.

La thalidomide n'a pas son indication dans le traitement d'entretien post autogreffe malgré des résultats intéressants.

Dans le myélome, la survenue d'une rechute survient le plus souvent dans les 3 ans suivant le diagnostic. Il faudra alors instaurer une deuxième ligne de traitement. Si la première rémission est jugée longue (>1 an), le même schéma thérapeutique peut être envisagé lors de la rechute. Une rechute précoce justifiera l'utilisation d'une autre combinaison. La réponse au traitement est déterminée par la quantification du composant monoclonal par électrophorèse des protéines sériques (+/- urinaires) ou encore par le dosage sérique des chaînes légères libres pour les myélomes à chaînes légères ou non sécrétant. Lorsque l'immunoglobuline monoclonale n'est plus détectable dans le sérum ni dans les urines, l'affirmation de la rémission complète nécessite un myélogramme. Enfin l'évaluation de la réponse au traitement, par la TEP-FDG et l'IRM, fait l'objet d'études cliniques en cours.

4) Perspectives :

Les essais cliniques occupent une place centrale dans la mise au point de nouveaux traitements du myélome. Ils permettent non seulement d'évaluer leur efficacité et leur tolérance mais aussi de faire avancer la connaissance des mécanismes de la maladie et d'améliorer le diagnostic. L'essai IFM/DFCI 2009 compare une association de molécules récentes, le protocole VRD (bortézomib, lénalidomide et dexaméthasone), à un traitement intensif avec autogreffe de cellules souches périphériques en première ligne dans le traitement du myélome chez des patients d'âge ≤ 65 ans. L'objectif est de comparer la survie sans progression de la maladie, d'évaluer le taux, la durée de réponse aux traitements, la

survie globale, la tolérance, et de définir le meilleur traitement selon le profil génétique de la maladie. Les premiers résultats de l'étude IFM/DFCI 2009 seront bientôt présentés.

Ainsi, l'évaluation de l'efficacité des combinaisons thérapeutiques actuellement testées peut reposer sur la clinique, la biologie mais aussi sur l'imagerie avec des techniques de plus en plus sensibles et résolutive comme nous allons le voir dans le deuxième chapitre.

2. l'imagerie

Découvert à la fin du 19ème siècle, le myélome multiple est décrit comme une maladie rendant les os lacunaires et fragiles. Le critère « multiple » désigne l'atteinte de plusieurs os à la fois. C'est en 1903 que Weber rapporte que ces lésions ostéolytiques pouvaient être identifiées sur les radiographies. En 1909, il décrit la nature plasmocytaire de cette atteinte osseuse. Observées chez environ 90 % des patients, ces lésions osseuses vont souvent mettre en jeu le pronostic fonctionnel des patients (van Lammeren-Venema et al. 2012). Leur dépistage est alors primordial.

Les méthodes d'imagerie utilisées dans l'exploration de la maladie peuvent se diviser en techniques d'imagerie anatomique telles que la radiographie conventionnelle, la tomodensitométrie (CT), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou en techniques d'imagerie métabolique ou fonctionnelle comme l'imagerie scintigraphique. Elles permettent d'évaluer l'atteinte au niveau osseux ainsi que celle des tissus mous. Même en l'absence de symptomatologie osseuse, ce bilan d'imagerie est recommandé.

A. Imagerie anatomique

L'imagerie anatomique, également appelée imagerie structurale, cherche à identifier, localiser et mesurer les différentes parties de l'anatomie. On retrouve la radiographie, le scanner (CT) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

1) Principe des différentes méthodes d'imagerie anatomique

(a) La radiographie

1. Principe :

La radiographie est une méthode d'imagerie par transmission qui permet d'obtenir une image en deux dimensions (2D) de la zone anatomique étudiée.

Elle permet l'exploration des structures anatomiques internes à l'aide d'une image fournie par un faisceau de rayons X (RX) traversant le sujet. C'est l'examen morphologique de référence. Le principe du radiodiagnostic repose sur la différence d'atténuation des RX d'un tissu à l'autre (Figure 19). Les structures sont mises en évidence par le contraste

radiologique dû à des différences de densité (muscles, poumons ou cavité aériennes) et de composition (graisse, os).

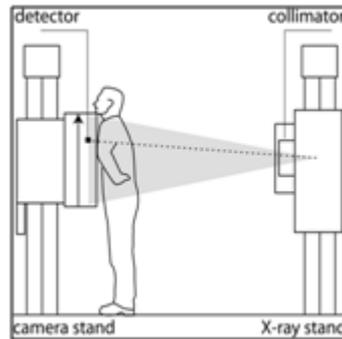


Figure 19: Principe de la radiographie

Son principe consiste à obtenir une image sur un film radiographique ou sur un écran en fonction de la densité d'un organe. Les images apparaissent en nuance de gris selon les unités Hounsfield qui peuvent s'étendre de - 1000 (noires) pour les structures contenant de l'air (poumons) à + 1000 (blanc) pour les structures compactes absorbant le rayonnement comme l'os (Figures 20 et 21).



Figure 20: Radiographie thoracique de face



Figure 21: Radiographie de la main gauche

2. Avantages

Cette méthode d'imagerie ancienne présente de nombreux avantages. En effet, c'est un examen peu coûteux et simple d'utilisation qui ne nécessite pas une longue formation pour le manipulateur. Elle permet une observation rapide sans limite de profondeur, les radiographies sont donc rapidement disponibles. Les délais d'attente sont courts et l'examen est facilement réalisable.

3. Inconvénients de la méthode

Dans le cadre de la radiologie conventionnelle, l'irradiation du patient n'est pas négligeable, surtout dans le cadre d'un suivi d'efficacité de traitement où au moins trois clichés sont nécessaires. L'imagerie radiologique 2D ne permet pas de visualiser le volume d'un organe ou d'une lésion.

(b) Le TDM ou scanner

1. Principe

L'apport de l'informatique et du traitement numérisé des images ont abouti à la mise au point de la tomodensitométrie en 1972. La tomodensitométrie (TDM) ou scanner, dite aussi CT (CT : *computed tomography*), est une technique radiologique permettant d'obtenir une image représentant une coupe de l'organisme. Il s'agit également d'une imagerie par transmission de RX. Dans ces appareils modernes, un tube émetteur de rayons X tourne, à très grande vitesse, autour du patient et prend une succession d'images du corps à 360° (Figure 22). Des capteurs, qui entourent le patient, mesurent l'absorption des différents tissus. La superposition des coupes obtenues par l'intermédiaire d'un traitement informatique permet alors l'obtention d'une imagerie en 3 dimensions (3D). Le contraste dû à la différence des densités et de composition peut être produit artificiellement en remplissant un organe creux avec un produit de contraste, substance très absorbante pour les RX. Grâce au scanner, on visualise une modification de volume ou une anomalie de structure (Figure 23).



Figure 22: Scanner médical



Figure 23: Tomodensitométrie thoracique (coupe axiale)

2. Avantages

La facilité d'utilisation et la grande sensibilité de cette méthode d'imagerie la rend avantageuse. Son coût est modéré. Elle permet de réaliser des images en 3D permettant une quantification de l'organe exploré. Cette technique a une très bonne résolution spatiale. L'acquisition se fait en quelques minutes. Le scanner est la technique d'imagerie anatomique de choix dans les machines couplées.

3. Inconvénients

Cette méthode d'imagerie est très irradiante, la dose délivrée aux organes lors d'examens de scanographie est nettement supérieure à celle délivrée lors d'actes de radiographie (par exemple d'un facteur 100 pour les poumons lors d'un examen pulmonaire scanographique 2D versus radiologique) (IRSN 2012).

Enfin, les images ne donnant que des informations anatomiques, il est parfois difficile de différencier une tumeur d'un tissu fibrotique.

(c) L'IRM

1. Principe :

Découverte en 1946, l'IRM ou Imagerie par résonance magnétique nucléaire est une des techniques qui a révolutionné l'imagerie médicale par son contenu informatif et la qualité des images obtenues. Elle permet de visualiser avec une grande précision les organes et tissus mous dans différents plans de l'espace. Elle utilise le phénomène de résonance magnétique nucléaire des protons de l'eau, constituant essentiel de l'organisme humain. Le noyau d'hydrogène est doté d'un moment magnétique ou spin. En appliquant une onde électromagnétique de fréquence adaptée, il devient possible de faire basculer l'orientation de ces spins (phénomène de résonance), qui émettent des signaux électromagnétiques lorsqu'ils retrouvent leur position d'origine (phénomène de relaxation). Ce signal émis par les noyaux juste après la résonance est détecté et un traitement informatique permet de reconstruire une imagerie en coupe en 3D (Figure 24).

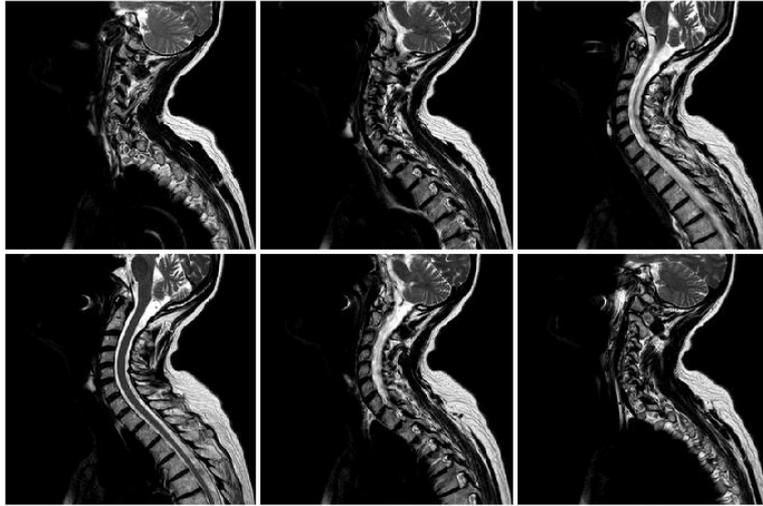


Figure 24: IRM des cervicales (coupes sagittales)

L'IRM permet de connaître la structure anatomique d'un organe et peut également suivre son fonctionnement et son métabolisme. Effectivement, l'IRM fonctionnelle est beaucoup utilisée en neurologie pour suivre le fonctionnement de notre cerveau et notamment sa perfusion. Elle peut alors obtenir des images du débit sanguin avec une grande résolution anatomique (0.5 mm) et temporelle (1/10 de seconde) (Figure 25). Ce sont les propriétés de l'hémoglobine qui sont alors utilisées.

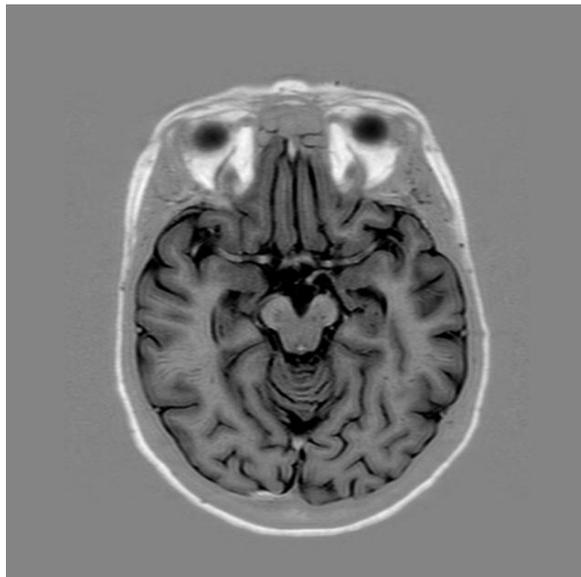


Figure 25: IRM: coupe axiale des lobes occipitaux temporaux frontaux

2. Avantages

Il s'agit d'une technique innovante non irradiante de très haute résolution. Elle permet une analyse sans limite de profondeur, c'est même l'une des seules techniques permettant de différencier l'eau des graisses. En tant qu'imagerie fonctionnelle, elle a permis de grandes avancées en neurologie.

3. Inconvénients :

C'est une technique onéreuse, moins répandue que les autres. Chez les patients algiques comme ceux atteints de myélome multiple, c'est une technique qui peut être moins adaptée en raison des temps longs de l'acquisition. Par ailleurs cette méthode présente des contre-indications dans les cas où le patient est porteur d'objets métalliques (Pacemaker, prothèses métalliques...) ou encore d'implants auditifs.

B. Imagerie fonctionnelle

La découverte de la radioactivité a conduit au développement de la médecine nucléaire avec la scintigraphie 2D et la scintigraphie 3D (ou TEMP) puis la tomographie par émission de positons (TEP) dans les années 1990. Ces techniques d'imagerie nucléaire consistent à évaluer le fonctionnement d'un organe. Il s'agit d'une imagerie fonctionnelle, ou encore métabolique.

Il est donc possible de diagnostiquer des lésions avant toute manifestation morphologique. Ces techniques consistent à administrer un vecteur couplé à un isotope radioactif pour visualiser sa distribution dans un organe.

1) Rappels physiques sur la radioactivité :

La radioactivité est un phénomène physique naturel ou artificiel provenant du noyau atomique instable. Ce sont des radio-isotopes ou radionucléides qui se transforment par désintégration en noyaux atomiques évoluant vers la stabilité. Le retour à l'état stable se manifeste par l'émission d'un rayonnement particulaire (α , β , neutrons) et/ou électromagnétique (γ).

Les noyaux instables se distribuent autour de la vallée de stabilité (Figure 26) définie en fonction du nombre de protons et de neutrons constituant les noyaux. Cette instabilité du noyau est due à un excès soit de protons, soit de neutrons, ou encore à un excès des deux.

Un noyau qui possède trop de neutrons par rapport aux noyaux de la vallée de stabilité subira une transformation de type β^- . Au contraire, un excédent de protons se traduit par une transformation de types β^+ et/ou par capture électronique (CE). A partir de l'élément Plomb-208 stable, c'est à dire au-delà de $Z=82$ et $N=126$, tous les noyaux sont instables, ils deviennent trop lourds, c'est le domaine de la radioactivité α .

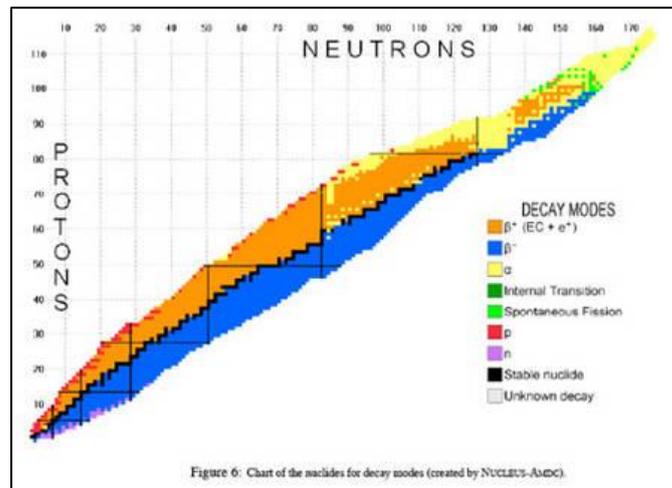


Figure 26: Vallée de stabilité et éléments radioactifs

Lors de la réaction de désintégration, une particule est émise par le noyau, ce dernier peut alors se retrouver dans un état excité ; le retour à la stabilité se fera par l'émission d'un rayonnement électromagnétique gamma ou par le phénomène de conversion interne.

2) Les rayonnements utilisés en imagerie diagnostique

(α) La désexcitation γ

Après désintégration α , β^- , β^+ , capture électronique ou encore fission, le noyau fils peut se retrouver dans un état dit excité. Cet excès d'énergie du noyau sera tôt ou tard transféré au milieu via un rayonnement γ . Ce rayonnement électromagnétique, appelé photon, ne possède ni masse ni charge, l'interaction avec la matière n'est donc pas obligatoire par comparaison aux particules chargées. Ces photons possèdent un fort pouvoir pénétrant et le transfert d'énergie à la matière est faible. Ils peuvent être détectés par des caméras après avoir traversé la matière en interagissant peu avec elle. C'est le principe de l'imagerie diagnostique de tomographie par émission monophotonique (TEMP) ou scintigraphie.

On signale par un astérisque * la forme excitée d'un noyau quand la désexcitation de celui-ci se produit rapidement. Lorsque le noyau reste dans un état d'excitation durant un temps

quantifiable, il est alors appelé noyau métastable (signalé par la lettre m). On retrouve ainsi le ^{99m}Tc , émetteur d'un rayonnement électromagnétique gamma de 140 KeV.

Les photons γ utilisés en diagnostic ont généralement une forte énergie (70 à 511keV) par comparaison aux rayons X destinés à la même utilisation (50 à 150 keV).

1. Caractéristiques du Technétium 99 métastable

Le technétium 99 métastable (^{99m}Tc) est l'isotope radioactif le plus utilisé dans le domaine de l'imagerie médicale nucléaire diagnostique. Il possède les propriétés d'un radio-isotope idéal. Il émet un rayonnement gamma dont l'énergie (140 keV) est adaptée aux détecteurs des gamma-caméras actuelles. Il possède une période physique de 6,023 heures, suffisamment longue pour la préparation des médicaments radiopharmaceutiques et l'exploration des tissus cibles mais suffisamment courte pour réduire au maximum la dose de rayonnement absorbée par le patient. Enfin sa facilité d'approvisionnement grâce à l'utilisation du générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ lui permet une large utilisation. La faible émission du rayonnement particulaire associé (électrons de conversion) permet l'injection d'activités importantes (plus de 1100 MBq) compatible avec une faible dosimétrie au patient (Schwochau et al. 1993).

2. Obtention de ^{99m}Tc

Le ^{99m}Tc est produit par un générateur de molybdène ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$). Il permet d'obtenir du technétium sous forme de pertechnétate de sodium $\text{Na } ^{99m}\text{TcO}_4$. Il est issu de la transformation radioactive du ^{99}Mo (Figure 27)

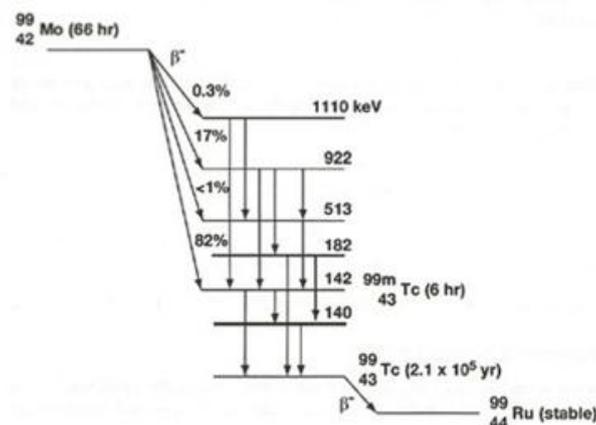


Figure 27: Schéma de désintégration du ^{99}Mo

En pratique, un générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ est constitué par une colonne d'alumine sur laquelle est adsorbé très fortement le molybdate polymérisé [$(^{99}\text{Mo}_7\text{O}_{24})^{6-}$]. Après la désintégration β^- , le technétium 99 formé peut être stable et métastable. Il se trouve sous forme de pertechnétate (TcO_4^-) qui est facilement élué de la colonne par une solution aqueuse stérile de chlorure de sodium à 0,9% alors que les polymères de l'ion molybdate sont retenus. Ce système stérile est protégé par du plomb pour assurer une radioprotection du personnel (ANSM 2011) (Figure 28).

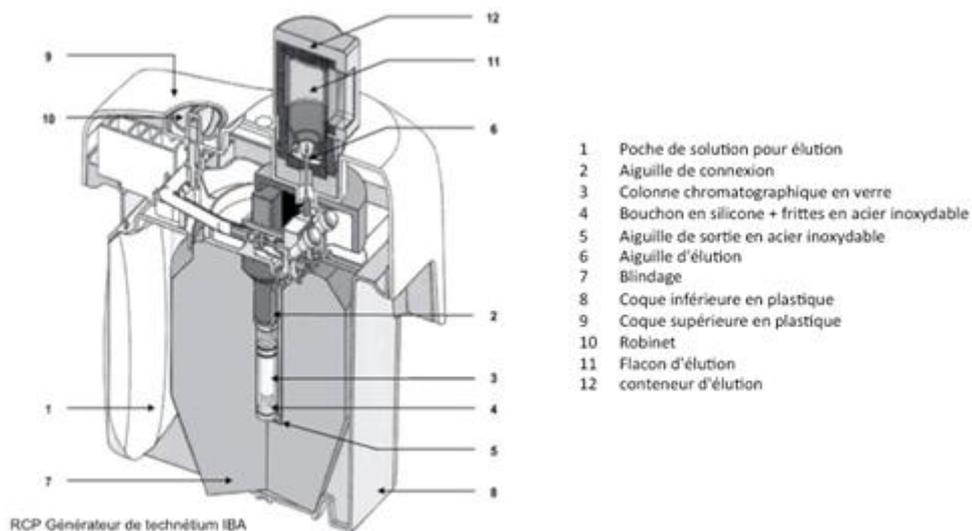


Figure 28: Schéma du générateur du $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

(b) La transformation β^+

Cette transformation radioactive est due à un excès de protons dans le noyau. Elle consiste donc en la transformation d'un proton en neutron avec émission d'un positon β^+ et d'un neutrino.

La particule β^+ émise est animée d'une énergie cinétique variable qui va déterminer son parcours dans la matière. Après avoir interagi avec le milieu, elle rencontre inéluctablement un électron négatif du milieu. Cette interaction entraîne l'annihilation, c'est à dire la disparition de ces deux particules, et l'apparition de deux photons γ de 0,511 MeV, de sens opposés mais de même direction (Figure 29).

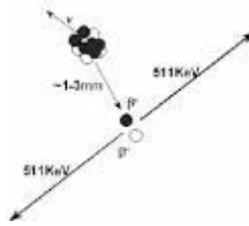


Figure 29 : Annihilation du positon

Ces deux photons gamma de 511 KeV possèdent un fort pouvoir pénétrant, ils ont donc un parcours long dans la matière. Une détection simultanée de cette paire de photons γ est la base de l'imagerie de tomographie par émission de positons (TEP). Le ^{18}F est l'émetteur β^+ le plus couramment utilisé en imagerie TEP.

1. Caractéristique du ^{18}F

Le ^{18}F est un radioélément artificiel qui après désintégration se transforme en ^{18}O stable (Figure 30). Il possède une période radioactive de 110 min, période suffisamment longue pour l'exploration des tissus et suffisamment courte pour réduire l'irradiation du patient. C'est un émetteur β^+ , il a donc un spectre continu d'énergie avec une énergie maximale $E_{\beta_{\max}} = 0,635 \text{ MeV}$. Ces particules β^+ ayant un très court parcours dans la matière, l'énergie qu'elle y transfère est donc importante. Cela entraîne alors une forte irradiation interne du patient. Chaque positon émis avec une énergie comprise entre 0 à 635 MeV va donc donner naissance à deux photons de 511 KeV.

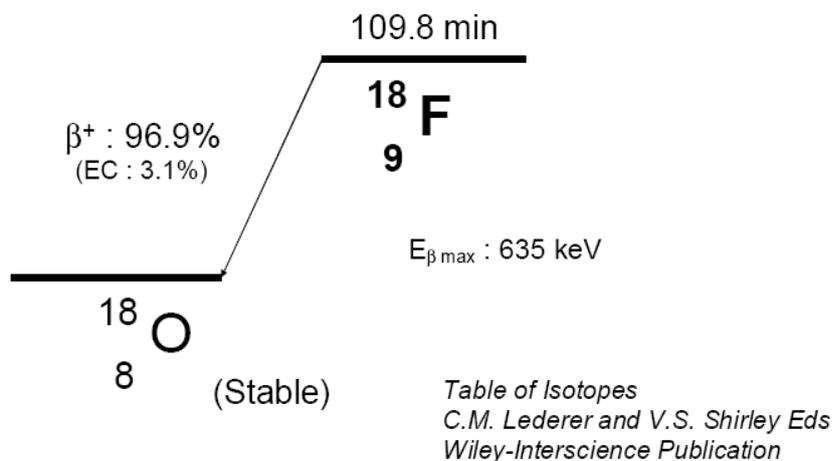


Figure 30: Schéma de désintégration du fluor-18

2. Production du ^{18}F

Le ^{18}F est un isotope artificiel qui doit être synthétisé à l'aide d'un accélérateur de particules : le cyclotron. Le cyclotron est un accélérateur électromagnétique de haute fréquence mis au point en 1929 par E.O. Lawrence aux Etats-Unis. Il permet la production d'un faisceau de particules accélérées ou ions sources (H^+) grâce à l'utilisation d'un champ électromagnétique. Ces particules sont ensuite utilisées comme projectiles pour « bombarder » une cible d'atomes, créant ainsi une réaction nucléaire qui va produire l'émetteur β^+ voulu.

L'ion source constitue la particule chargée à accélérer qui va bombarder la cible. Les deux ions sources les plus souvent utilisés sont l'hydrogène H^+ et le deutérium D^+ . Le choix de la source se fait en fonction du radioélément que l'on souhaite produire. Les ions H^+ permettent la production de $^{11}_6\text{C}$, $^{13}_7\text{N}$, $^{18}_9\text{F}$, tandis que les ions D^+ permettent de produire du $^{15}_8\text{O}$ et du $^{18}_9\text{F}_2$.

Un volume de gaz (H_2 ou D_2) est alors transféré dans une chambre soumise à un champ électrique statique. Sous l'effet de ce champ, le gaz va s'ioniser. Le plasma ainsi obtenu est stabilisé par le champ magnétique. Les ions produits sont ensuite transférés vers la zone d'accélération.

Cette dernière est formée par les Dees, deux cavités en forme de demi-cylindres, séparées par un petit intervalle. L'injection de l'ion source a lieu au centre de cette zone. L'ensemble est soumis à un vide poussé et est placé entre deux électro-aimants qui produisent le champ magnétique désiré (Figure 31).

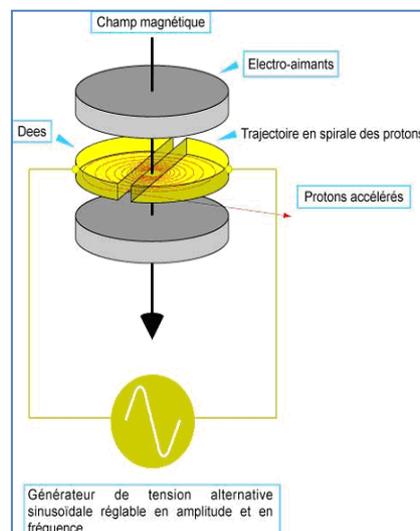


Figure 31: Composants du cyclotron

Les particules chargées sont mises en mouvement; elles sont accélérées parallèlement au champ électrique appliqué entre les deux Dees. Leur trajectoire est ensuite courbée grâce au champ magnétique appliqué entre les électro-aimants encadrant les deux Dees.

Le champ électrique E est dû à une tension alternative U appliquée entre les deux Dees. La particule est alors successivement attirée par un champ électrique positif puis repoussée par un champ électrique négatif. Il a donc pour effet d'accélérer les particules, qui reçoivent à chaque passage un « quantum d'énergie », ce qui augmente leur vitesse. Elles sont donc accélérées une fois par demi-tour soit deux fois par tour, à chaque passage dans la zone entre chaque Dee. (Zone « inter-dee ») (Figure 32).

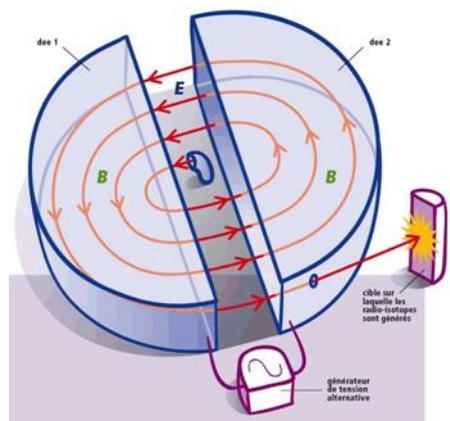


Figure 32 : Représentation du mouvement de la particule chargée

Lorsque les particules entrent dans l'un des Dees, elles ne sont plus soumises au champ électrique mais au seul champ magnétique, qui leur impose une trajectoire circulaire.

Il faut que les électrons périphériques des ions accélérés soient éliminés de façon à ne conserver que le proton. Cette élimination est obtenue par l'interposition d'une feuille de carbone (stripper) devant le faisceau d'ions, captant les électrons périphériques.

Il en résulte en sortie un faisceau constitué uniquement de protons.

La figure 33 ci-dessous représente la succession des événements conduisant à la production du faisceau de protons :

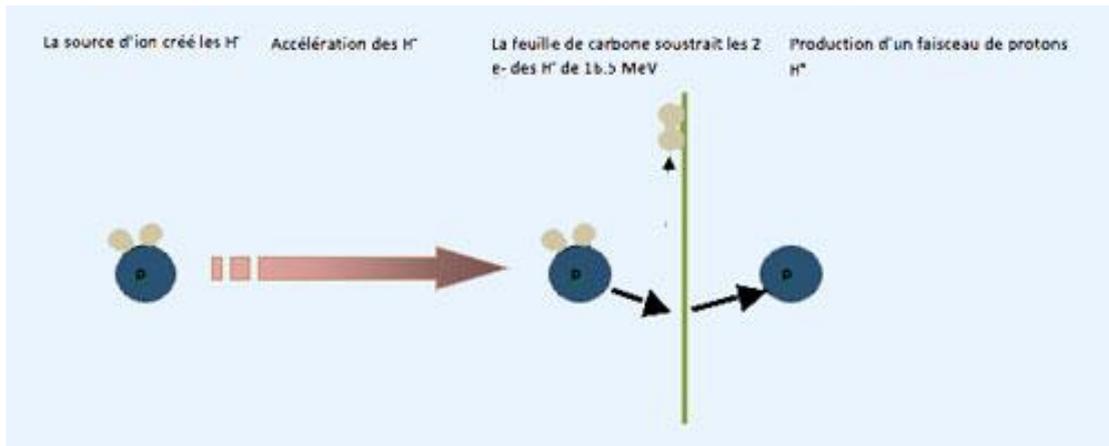


Figure 33 : De la production des ions au faisceau de proton

Ces protons seront ensuite éjectés de l'accélérateur avec une certaine énergie puis dirigés vers une cible.

La cible est constituée d'un petit réservoir creux parfaitement étanche contenant la substance liquide à bombarder. Dans ce cas, il s'agit d'une cible constituée d'eau enrichie à 95 % en oxygène 18 : H_2^{18}O .

Une réaction de type (p,n) générant le Fluor 18 se produit alors : $\text{O}^{18}(\text{p},\text{n})\text{F}^{18}$



Le CHU de Toulouse possède un cyclotron IBA cyclone 10/5 (Figure 34). Le radionucléide ^{18}F peut donc être produit sur site. Il est produit par la réaction nucléaire $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ induite par un faisceau de protons d'énergie de 10 MeV sur une cible constituée de 2.5 mL d'eau enrichie à 95 % en isotope ^{18}O . Une durée d'irradiation de 60 min permet d'obtenir approximativement 37 GBq de ^{18}F . Immédiatement après la fin du « tir », la solution d'eau enrichie irradiée contenant le ^{18}F sous forme de fluorure est transférée sous pression d'hélium vers l'entrée d'un module de synthèse.



Figure 34 : Le cyclotron

L'isotope ainsi obtenu est ensuite couplé à différentes molécules chimiques de façon à en faire un médicament radiopharmaceutique (MRP). Le plus utilisé est le 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose ([^{18}F] FDG). Il permet de visualiser le métabolisme glucidique d'une cellule souvent augmenté chez les cellules cancéreuses.

3) Principe de l'imagerie fonctionnelle

(a) Scintigraphie

1. Principe

La scintigraphie planaire ou la Tomographie par Emission Mono Photonique (TEMP) représente environ 80 % de l'activité diagnostique en médecine nucléaire aujourd'hui. Elle permet d'observer *in-vivo* le métabolisme ou la distribution d'un radio-isotope au sein d'un organe cible. Le principe consiste à administrer à un patient un vecteur dont le métabolisme est spécifique de l'organe, de la fonction ou de la pathologie à étudier (Figure 35). Un radioélément émetteur γ est complexé à un vecteur constituant ainsi le Médicament Radiopharmaceutique (MRP) d'intérêt qui se fixera électivement sur l'organe ou le tissu à explorer. L'organe étudié devient alors un émetteur de rayonnements gamma qui pourront être détectés grâce à une gamma caméra. La scintigraphie est donc une imagerie d'émission (c'est-à-dire que le rayonnement vient du patient après injection du traceur) par opposition à l'imagerie conventionnelle radiologique qui est une imagerie de transmission (le faisceau est externe et traverse le patient). Elle permet d'obtenir une image en deux dimensions. Parmi les MRP les plus utilisés, on retrouve les biphosphonates, vecteurs de l'os en formation, marqués au $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Ils sont utilisés pour la scintigraphie osseuse, ou encore l' ^{123}I , qui est à la fois vecteur et émetteur. Il est utilisé dans la scintigraphie thyroïdienne.

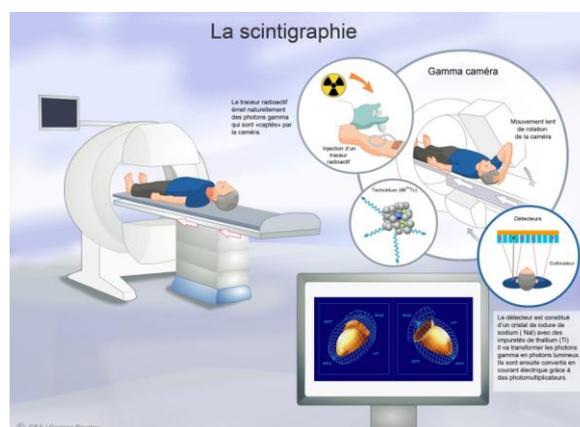


Figure 35 : Principe schématique de la scintigraphie

Différents radio-isotopes émetteurs de rayons gamma sont utilisés en TEMP : le technetium-99m (^{99m}Tc), l'indium-111 (^{111}In), l'iode-123 (^{123}I), le thallium 201 (^{201}Tl).

2. Avantages:

C'est une méthode d'imagerie fonctionnelle très sensible. Ces dernières années, l'enjeu est de mettre au point des traceurs de plus en plus spécifiques comme la radioimmunoscintigraphie (RIS), une technique d'imagerie scintigraphique obtenue après radio marquage d'un anticorps monoclonale spécifique d'une cellule. Dans le domaine de la cancérologie, il est donc possible de détecter avec une grande spécificité une tumeur et de voir son évolution après la mise en place d'un traitement. Cette technique n'a pas de limite de profondeur.

3. Inconvénients :

C'est une technique irradiante, l'irradiation du patient va dépendre de la période effective du radioélément au sein de l'organisme. La résolution spatiale est médiocre.

(b) La TEMP ou SPECT

La TEMP (Tomographie par Emission Monophotonique) ou SPECT, *Single Photon Emission Computed Tomography* en anglais, repose sur le principe d'une émission mono-photonique comme la scintigraphie. Ce qui diffère, c'est l'image obtenue. Effectivement une ou plusieurs γ -caméras effectuent une rotation autour du patient émetteur de rayonnements γ et permet une acquisition volumique de l'organe d'intérêt pour obtenir une image en coupe et en 3D (Figure 36).

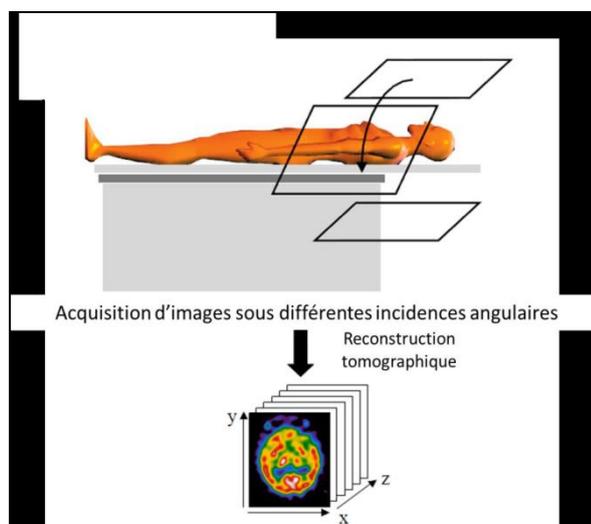


Figure 36 Représentation schématique de l'imagerie SPECT

(c) La ^{18}F -FDG -TEP

1. Principe :

La TEP (tomographie par émission de positons), ou PET en anglais, utilise des traceurs marqués avec un radioélément émetteur β^+ . Le traceur correspond à un vecteur moléculaire du processus physiologique étudié. Le noyau radioactif en se désintégrant émet des positons qui vont s'annihiler dans le milieu avec un électron. Deux photons γ de 511 keV sont ensuite émis dans la même direction mais en sens opposé (à 180° l'un de l'autre).

Un détecteur, placé tout autour du patient, capte les signaux des deux photons qui coïncident, et restitue alors la distribution du vecteur marqué. Cette technique est surtout utilisée en cancérologie (Figure 37).

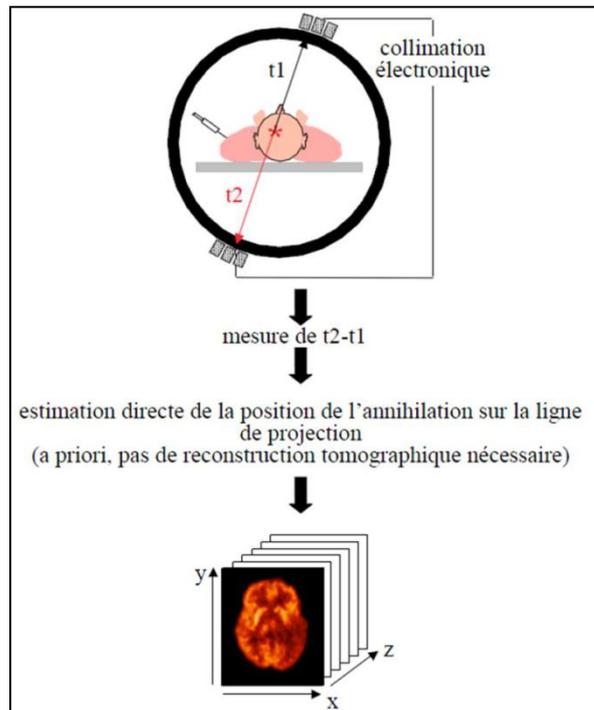


Figure 37 : Représentation schématique de l'imagerie TEP

Le vecteur le plus utilisé dans le bilan d'extension et le suivi d'un certain nombre de cancers est le ^{18}F FDG de courte période (110 minutes environ). Cet analogue du glucose est davantage consommé par les cellules cancéreuses qui prolifèrent souvent plus que les cellules saines. Ceci permet d'identifier et de localiser par l'observation de "points chauds" la tumeur et ses métastases. Cette technique permet de fournir une estimation du volume de la tumeur mais également de son niveau d'activité tumorale.

En effet, les cellules tumorales qui se multiplient présentent un métabolisme glucidique augmenté. Elles incorporent préférentiellement le $[^{18}\text{F}]$ FDG. Ce composé, transformé en $[^{18}\text{F}]$ FDG-6-phosphate par une hexokinase, n'est pas métabolisé par les cellules. La substitution du groupe hydroxyle par un atome de fluor sur le deuxième carbone ne permet pas les étapes ultérieures de la glycolyse. La radioactivité reste donc piégée et s'accumule dans les cellules cibles. C'est ce que l'on appelle une impasse métabolique. (Figure 38)

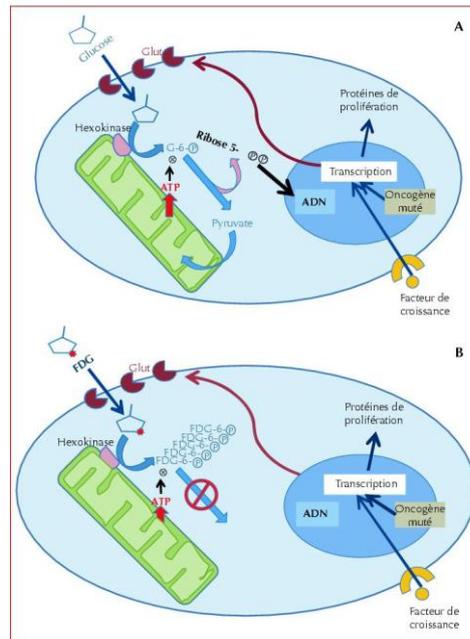


Figure 38 : Schéma du métabolisme du glucose et du FDG dans les cellules en prolifération

Ainsi l'imagerie $[^{18}\text{F}]$ FDG -TEP permet de visualiser et quantifier l'activité métabolique cellulaire dans les tissus consommateurs de glucose, en particulier les tissus tumoraux. Le FDG n'est évidemment pas adapté à l'étude des tumeurs touchant les organes grand consommateur de glucose comme le cerveau, le cœur et le rein.

2. Avantage :

C'est une méthode d'imagerie très sensible, sans limite de profondeur. Elle permet la quantification de la radioactivité présente au sein d'un tissu. Le suivi de l'évolution métabolique d'une tumeur est ainsi possible. L'acquisition des images du corps entier est rapide en comparaison à l'IRM ce qui représente un avantage dans la prise en charge des patients algiques.

3. Inconvénients :

Il s'agit d'une méthode utilisant des rayonnements ionisants de haute énergie. La résolution de cette méthode est de l'ordre de 1 à 2 mm, il sera donc difficile d'estimer avec précision où se trouve la zone fixante. La TEP au $[^{18}\text{F}]$ FDG est non spécifique car toutes les cellules ou les microorganismes consommant du glucose le fixent donnant des faux positifs. C'est le cas des zones inflammatoires et des infections bactériennes qui sont 2 situations fréquentes chez les patients atteints de tumeurs en général et chez les patients atteints de myélome particulièrement.

C. Méthodes d'imagerie couplées

Désormais des techniques d'imagerie couplées sont de plus en plus utilisées. On retrouve ainsi la SPECT/CT, la TEP/CT et l'IRM/TEP, techniques d'imagerie hybrides donnant simultanément des images anatomiques et fonctionnelles. Ceci améliore ainsi la résolution et la sensibilité des techniques utilisées seules.

Par exemple, le TEP/CT assemble une TEP fournissant une information fonctionnelle (par exemple, une captation augmentée d'un traceur au niveau de lésions) et un scanner ou CT qui apporte l'information anatomique et morphologique correspondante. Grâce à cela, le patient bénéficiera dans le cadre d'un seul passage de deux imageries complémentaires acquises dans les mêmes conditions (Figure 39).

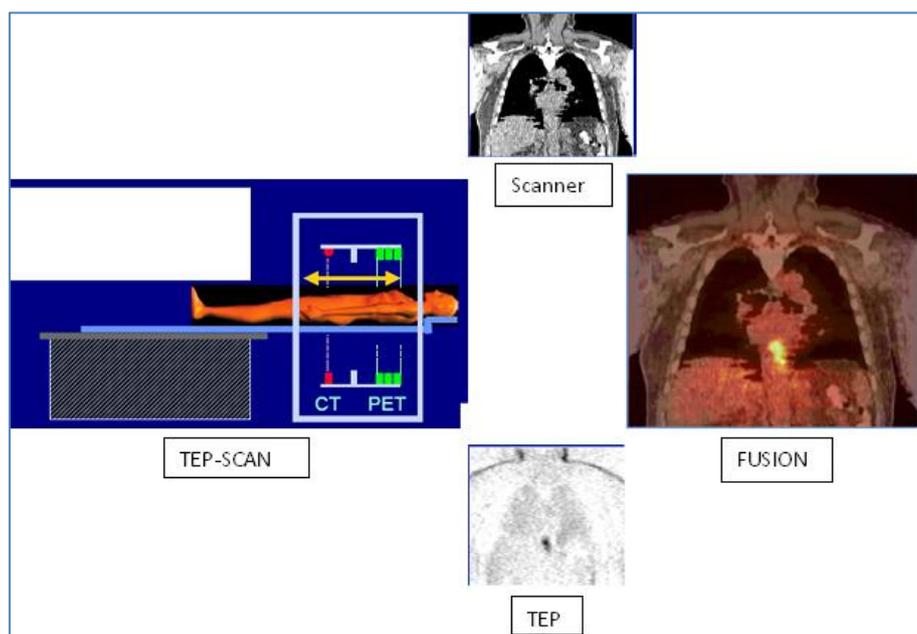


Figure 39 : Appareillage TEP-CT

D. L'imagerie dans le myélome

1) Place du bilan d'imagerie anatomique dans le contexte du myélome

Le diagnostic de myélome multiple est posé en fonction des deux critères suivants : la présence d'une immunoglobuline monoclonale dans le sérum ou les urines et la présence d'une plasmocytose médullaire supérieure à 10 %.

L'indication du traitement des patients atteints du myélome repose sur le caractère symptomatique de la maladie, défini par au moins un des critères du CRAB: C : hypercalcémie, R : insuffisance rénale, A : anémie, B : atteinte osseuse (*Bone*). Le dernier critère repose sur les données fournies par l'imagerie. Il permet de visualiser l'étendue de la maladie. Il représente un des plus importants facteurs pronostiques. En fonction du nombre de lésions répertoriées, la prise en charge thérapeutique d'un patient peut être initiée. Elle permet aussi d'évaluer la réponse au traitement.

(a) La radiographie

Actuellement, le système le plus couramment utilisé pour la stadification du myélome multiple est la classification de Salmon et Durie. Ce système est basé sur des paramètres cliniques, hématologiques et surtout sur le nombre de lésions ostéolytiques traditionnellement défini par la radiographie du squelette. Effectivement, la radiographie classique du corps entier est le «gold standard » pour le diagnostic mais aussi pour le suivi des rechutes des patients. Il comprend des images de face et de profil du crâne, du rachis complet, du thorax et du grill costal ainsi que des clichés de face du bassin, des humérus et des fémurs à la recherche de lésions le plus souvent lytiques. Les lésions lytiques ont un aspect bien arrondi et limité, formant des géodes ou lacunes dites à l'emporte-pièce, qui sont particulièrement visibles sur le cliché de la voûte crânienne de profil (Figures 40 et 41). Les atteintes touchent préférentiellement les os qui sont impliqués dans la production des cellules hématologiques à savoir le rachis (65 %), les côtes (45 %), le crâne (40 %), le bassin (30 %) avec le sacrum (10 %) et les os longs (25 %) dont l'humérus et les fémurs (Delorme and Baur-Melnyk 2011).

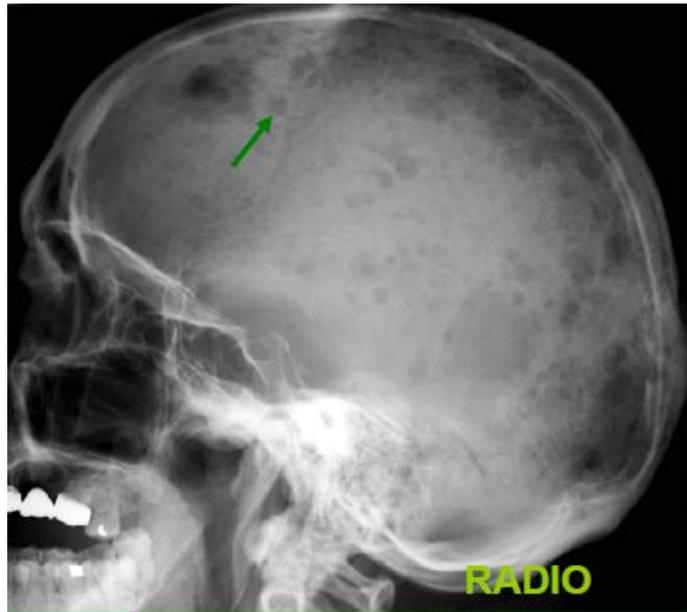


Figure 40: Radiographie du profil du crâne, géodes à l'emporte pièce



Figure 41: Radiographie de l'avant-bras d'un patient atteint de MM

Le stade 1 de cette maladie est défini par la présence de tous les critères biologiques requis et d'au moins une lésion lytique détectable. Tandis que les patients qui présentent au moins 4 lésions osseuses sont classés en stade 3, de mauvais pronostic, car la masse tumorale est importante. Les autres patients sont classés par défaut en stade 2, stade intermédiaire ni 1 ni 3 (Tableau 8).

| Masse tumorale Critères requis | Stade I faible tous | Stade II intermédiaire ni I ni III | Stade III forte au moins un |
|--|----------------------------------|---|--|
| <u>Protéine M</u> | | | |
| sérique | IgG < 50 g/L IgA < 30 g/L | | IgG > 70 g/L IgA > 50 g/L |
| urinaire | PBJ < 4 g/24 h | | PBJ > 12 g/24 h |
| <u>Hémoglobine</u> | > 10 g/dL | | < 8,5 g/dL |
| <u>Calcémie</u> | < 3 mmol/L (120 mg/L) | | > 3 mmol/L (120 mg/L) |
| <u>Lésions osseuses</u> | ≤ 1 | | > 3 |
| <u>Sous-classification</u> | | | |
| - A définit une fonction rénale préservée (créatininémie < 175 µmol/L soit 20 mg/L) | | | |
| - B définit une insuffisance rénale (créatininémie ≥ 175 µmol/L soit 20 mg/L) | | | |

Tableau 8 : Classification de Durie et Salmon

Lors de la radiographie, les lésions osseuses deviennent évidentes lorsque plus de 30% de l'os trabéculaire est perdu (B. G. Durie and Salmon 1975). Ce qui conduit à une sous-estimation des lésions notamment dans les premières phases de la maladie (van Lammeren-Venema et al. 2012) Malgré cela, la radiographie du squelette est toujours considéré comme obligatoire par les grands groupes d'étude sur le MM afin de faire un diagnostic correct de la maladie symptomatique. Cet examen peut être douloureux pour les patients ayant un traumatisme osseux.

(b) Le scanner

D'après la haute autorité de santé (HAS), la TDM du rachis peut être indiquée afin de confirmer la présence d'une compression médullaire, lorsque l'IRM n'est pas réalisable (non disponible ou contre-indication) mais aussi pour évaluer un risque fracturaire. La CT s'est avéré avoir une bonne estimation du risque de fracture et d'instabilité osseuse (Figure 42).



Figure 42: Scanner du rachis lombaire, lacune de TH12

Cependant, plusieurs études ont mis en évidence que la tomodensitométrie est un outil idéal pour la détection de la destruction osseuse précoce. Elle permet la détection de petites lésions ostéolytiques ainsi que l'atteinte des tissus mous dans le myélome. La sensibilité diagnostique de la TDM est supérieure à celle de la radiographie standard. Elle révèle plus de lésions, principalement dans les zones qui ne peuvent être visualisées avec précision par radiographie, par exemple, les omoplates, des côtes ou du sternum. Contrairement à la radiographie, le scanner permet un diagnostic complet en un seul examen, sans avoir à repositionner les patients (Dimopoulos et al. 2009). Le scanner est donc un bon outil de diagnostic. Cependant, c'est un mauvais outil d'évaluation thérapeutique, car même après traitement les lésions lytiques persistent. De plus, le scanner est une technique très irradiante pour le patient. La dosimétrie patient est de 1,3 à 3 fois plus élevée que celle délivrée lors de la radiographie. En résumé, un CT à faible dose conventionnelle ou un balayage de la colonne vertébrale est considéré comme une alternative possible à la radiographie standard chez les patients présentant une symptomatologie douloureuse du myélome. En effet, elle permet d'obtenir une évaluation exhaustive des lésions osseuses dans une courte période mais ne fait pas partie des méthodes d'imagerie diagnostique de routine dans le myélome multiple à elle seule.

On voit cependant apparaître cette technique d'imagerie dans la classification de DURIE et SALMON plus, technique couplée au TEP au [¹⁸F] FDG. Effectivement grâce à ces méthodes couplées on va pouvoir différencier une tumeur d'un tissu fibrotique, la CT apportant les informations anatomiques, l'imagerie fonctionnelle donnant les informations métaboliques (Figure 39).

(c) IRM

L'IRM permet un contraste élevé et sensible dans la visualisation directe de la moelle osseuse et de ses composants. Par conséquent, elle est devenue la méthode de choix pour l'imagerie de la moelle osseuse (Figure 43). Dans le myélome, l'IRM a permis d'améliorer la mise en évidence et le suivi de l'infiltration osseuse (Mariette et al. 1999) (Baur et al. 2002). Elle améliore l'approche diagnostique de la maladie. Elle est recommandée chez les patients dont la radiographie conventionnelle ne permet pas de mettre en évidence des lésions lytiques ainsi que dans les cas de plasmocytome apparemment solitaire. Elle peut aussi être indiquée en cas de fractures vertébrales afin d'écartier l'hypothèse de fractures ostéoporotiques. Par ailleurs, l'IRM est l'imagerie de choix en cas de suspicion de compression médullaire et/ou radiculaire. Celle-ci doit être réalisée en urgence. (HAS 2010)



Figure 43: IRM du rachis lombaire, coupe sagittale, pondération T1, lacune TH12

L'IRM permet en effet de distinguer une infiltration sur un site ostéopénique d'une lésion lytique. Elle reflète principalement une infiltration de la moelle osseuse, qui peut être ou non associée à la destruction de l'os. Une IRM anormale peut donc diagnostiquer un patient dans un stade précoce de la maladie sans que celui-ci ait recours au traitement. A l'inverse,

chez les patients atteints de myélome actif documenté, le nombre de lésions visibles à l'IRM est en très bonne corrélation avec le taux de réponse au traitement et le taux de survie globale. Cette excellente corrélation est la principale raison de l'inclusion de l'IRM dans le système Durie / Salmon PLUS (Tableau 3) (B. G. M. Durie 2006).

L'IRM du rachis et du pelvis est donc recommandée pour le dépistage des lésions lytiques, elle peut désormais être utilisée pour la stadification de la maladie. D'autres zones du squelette peuvent être explorées si le dépistage par radiographie a mis en évidence des anomalies diffuses de la trame osseuse.

Ce qui semblerait intéressant, c'est le suivi du patient après traitement mal évalué par la radiographie.

A partir des années 2010, l'IRM de diffusion corps entier a démontré son intérêt dans le myélome (Sommer et al. 2011). S. Naquin (Figure 44) et al ont donc comparé l'IRM de diffusion corps entier, la radiologie conventionnelle et le stade établi avec la classification de DURIE et SALMON. Une exploration du corps entier en un temps restreint semble désormais possible. Cette étude a mis en évidence une détection supérieure des lésions conduisant à une majoration du stade de Salmon et Durie (Narquin et al. 2013). Sa place dans le bilan pré-thérapeutique reste encore à évaluer mais montre une approche très intéressante.

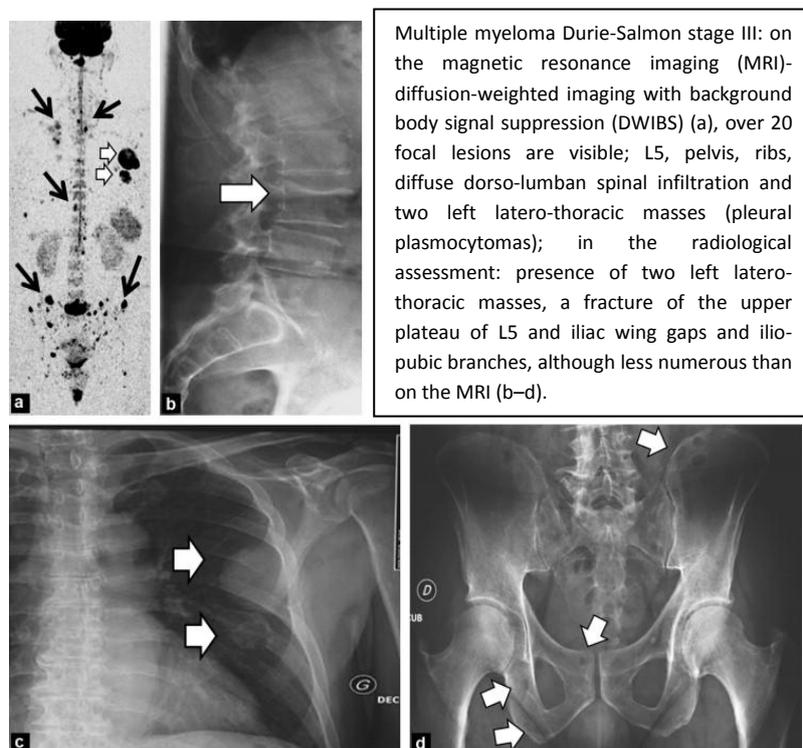


Figure 44: Comparaison IRM dynamique et radiographie

Un essai clinique français a été mis en place en 2010, l'étude EVALICEMM. Cet essai a comme objectif principal d'évaluer, après traitement intensif du myélome, s'il existe une relation entre les lésions de la moelle osseuse observées avec l'IRM dynamique corps entier et la survenue d'une progression ou d'une rechute dans les 2 ans qui suivent le traitement.

A l'avenir, la caractérisation du myélome par l'IRM dynamique pourrait être intégrée dans les critères de réponse aux traitements. Les objectifs secondaires sont l'évaluation pronostique de cette technique d'IRM, ainsi que la détermination de l'intérêt de cette évaluation pour le diagnostic.

L'IRM « dynamique » est capable de quantifier les microvaisseaux dans une lésion. Or, dans les lésions osseuses actives du myélome, il existe une augmentation de l'angiogénèse. C'est donc un indicateur de l'activité de la maladie. Chaque examen IRM dynamique corps entier dure 40 minutes.

2) Discussion de la place de l'imagerie anatomique :

En 2009, le IMWG, groupe de travail international sur le myélome, a indiqué que la radiographie corps entier été la méthode de référence pour la détection des lésions osseuses liés au myélome (Dimopoulos et al. 2009). Cependant, au cours des dernières décennies, les techniques d'imagerie actuellement disponibles, ayant montré une augmentation du taux de détection par rapport à l'imagerie classique radiographique corps entier, sont progressivement mises en œuvre dans la pratique quotidienne. En 2013, une revue résume les directives du Groupe de travail international sur le myélome, qui recommandent que le scanner corps entier remplace la radiographie classique du squelette. De même, la performance égale de l'IRM indique qu'elle est une alternative intéressante. Par ailleurs, comme les lésions du crâne et des côtes sont sous-diagnostiquées par ces techniques modernes, le groupe conseille des clichés radiographiques supplémentaires de ces régions (Regelink et al. 2013). Les conséquences de cette approche sont discutées. Des questions se posent, l'une d'elles étant de savoir si la mise en pratique quotidienne du CT et de l'IRM se traduira par une amélioration de la prise en charge ou si la sur stadification des patients avec les nouvelles techniques conduira à la mise en place de combinaisons thérapeutiques excessives.

3) Place du bilan d'imagerie fonctionnelle dans le contexte du myélome

Par son approche métabolique, la médecine nucléaire offre une alternative originale aux techniques d'imagerie conventionnelle. Elle permet de distinguer une lésion active de la maladie d'une lésion persistante mais inactive métaboliquement. Afin d'apprécier l'atteinte osseuse, les scintigraphies réalisées avec le sestamibi ou les biphosphonates marqués au ^{99m}Tc ont été envisagées. L'imagerie TEP par ailleurs prend une grande place dans l'arsenal de l'imagerie diagnostique.

(a) La TEP

1. ^{18}F FDG

Récemment, la TEP FDG et l'IRM ont donc été intégrées au système de classification de DURIE et SALMON PLUS afin de détecter l'atteinte de la moelle osseuse chez les patients atteints de myélome. De nombreuses études ont été réalisées afin de comparer leur capacité diagnostique. L'IRM a prouvé une efficacité supérieure dans la détection des atteintes de la colonne vertébrale chez des patients de stade avancé du myélome.

Cependant, avec la TEP au ^{18}F FDG, il est possible de balayer l'ensemble du corps entier du sommet de la tête jusqu'aux pieds sur une période d'acquisition de 40 minutes. Dans cette approche d'imagerie médicale, les atteintes osseuses du myélome peuvent être détectées ainsi que les atteintes extra médullaires. La TEP au ^{18}F FDG est plus sensible que l'IRM dans la détection du nombre de lésions focales avant tout changement anatomique. Il permettrait une prise en charge thérapeutique précoce des lésions osseuses (Figure 45).

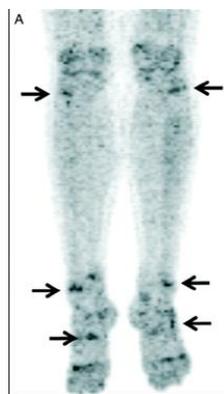


Figure 45: TEP-FDG et myélome

La TEP au [¹⁸F] FDG semble la technique la plus appropriée pour évaluer la réponse au traitement et une éventuelle rechute (B. G. M. Durie 2006). Cette réponse thérapeutique est appréciée par la diminution de la fixation du [¹⁸F] FDG entre deux examens successifs au sein des cibles tumorales. Lorsqu'une thérapie est efficace, le nombre de lésions détectées au [¹⁸F] FDG diminue par la disparition de cellules actives consommatrices de glucose alors que sur l'IRM, les anomalies disparaissent entre 9 et 12 mois. Cependant, la positivité persistante du TEP-FDG est en corrélation avec une rechute probable tôt ou tard (B. G. M. Durie et al. 2002). Après transplantation de CSH, la persistance d'un signal positif est un facteur de mauvais pronostic et entre en corrélation avec une rechute probable à 6 mois.

Enfin, l'utilisation d'un système hybride PET/CT a permis la détection des lésions de petite taille, ou légèrement plus actives, qui étaient à peine distinguables du tissu normal environnant sur des images TEP seules. Le système hybride permet également une localisation plus précise des lésions anatomiques hyper métaboliques et, par conséquent, une meilleure discrimination entre l'os et les lésions des tissus mous (Figure 46). La TEP/CT est une méthode d'imagerie intéressante dans la stadification de la maladie puisqu'elle est capable de détecter des lésions de petites tailles non visualisées par les autres techniques. C'est une alternative prometteuse, en particulier au cours du suivi car il permet de suivre la réponse au traitement.

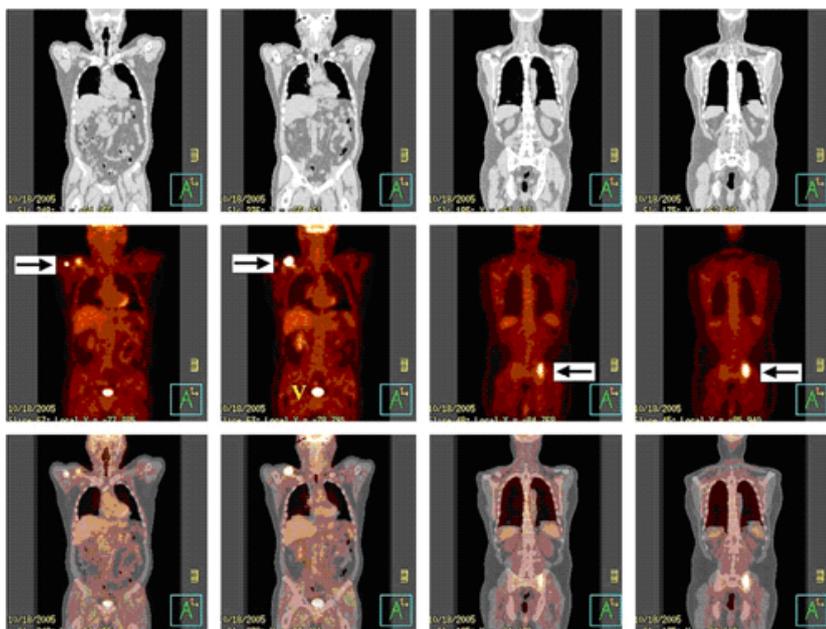


Figure 46: TEP-¹⁸F-FDG dans le bilan d'extension d'un myélome.
 Coupes frontales (de haut en bas : images TDM, images TEP, images de fusion TEP+TDM). Visualisation des lésions de la clavicule et de l'acromion droits connus (flèche). Découverte d'une lésion sacro-iliaque gauche méconnue (flèche).

Des études récentes ont aussi montré que l'obtention d'une rémission complète en TEP/CT au [¹⁸F] FDG, avant la transplantation des cellules souches, était corrélée à une rémission plus durable et à une survie prolongée même chez les patients avec un risque génétique prouvée (Bartel et al. 2009).

La TEP permet de quantifier la diminution du métabolisme des cellules tumorales. En effet l'intensité de la fixation au sein de la tumeur est mesurable par une valeur normalisée quantitative appelée SUV (Standardised uptake value) qui tient compte à la fois de l'activité injectée et de la morphologie du patient. Sa valeur normale est de 1 dans les tumeurs elle est habituellement supérieure à 2 et peut atteindre 10 ou plus. L'évaluation de la réponse thérapeutique repose sur l'évolution de la SUV tumorale avant, en cours et en fin de traitement (Cachin 2006).

L'évaluation du suivi thérapeutique dans le myélome, via le TEP au [¹⁸F] FDG, est en cours grâce à l'étude IMAJEM (IMAgerie JEune Myélome). Les patients éligibles sont inclus dans le protocole IFM/DFCI 2009 qui évalue l'impact de l'autogreffe et VRD (bortézomib, lénalidomide et dexaméthasone) en première ligne versus VRD et autogreffe si rechute. En parallèle, on compare donc l'intérêt de 2 méthodes d'imagerie : l'IRM et le TEP FDG. Les deux techniques sont comparées au diagnostic, après 3 cycles d'induction VRD et à la fin du traitement (7 mois) du protocole IFM/DFCI 2009. Ce travail permettra de mieux choisir les examens d'imagerie nécessaires à la prise en charge des malades.

Les données de la littérature sont encore considérées comme insuffisantes pour utiliser la TEP au [¹⁸F] FDG comme outil de diagnostic et de suivi de la maladie. Elle est encore en cours d'évaluation notamment avec l'étude IMAJEM. Bien qu'elle ne fasse pas partie du bilan standard elle peut être utile en complément de l'IRM et discutée au cas par cas en réunion de concertation pluridisciplinaire.

2. NaF TEP

Le ¹⁸F NaF est un traceur TEP reconnu pour être un excellent marqueur de l'imagerie du squelette. Son absorption dans la trame osseuse se fait par échange du fluorure avec les groupements hydroxyles des hydroxyapatites, entraînant ainsi la formation de la fluoroapatite (Schiepers et al. 1997). C'est donc un marqueur très sensible et fiable de reconstruction osseuse. Le traceur s'accumule dans les lésions ostéoblastiques mais aussi

ostéolytiques reflétant le débit sanguin régional et le remodelage osseux (Hawkins et al. 1992). L'augmentation de l'absorption du fluorure a effectivement été retrouvée à la périphérie des lésions lytiques associées à une activité ostéoblastiques réactives même minime (Even-Sapir et al. 2007). Lorsqu'il est couplé avec le CT, la spécificité de la TEP au $[^{18}\text{F}] \text{NaF}$ augmente, ce qui permet de distinguer les lésions bénignes des tumeurs malignes. D'autres études sont nécessaires afin d'étudier l'utilité de TEP/CT au $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ dans la détection de la maladie osseuse myélomateuse (Tan et al. 2011) (Figure 47).

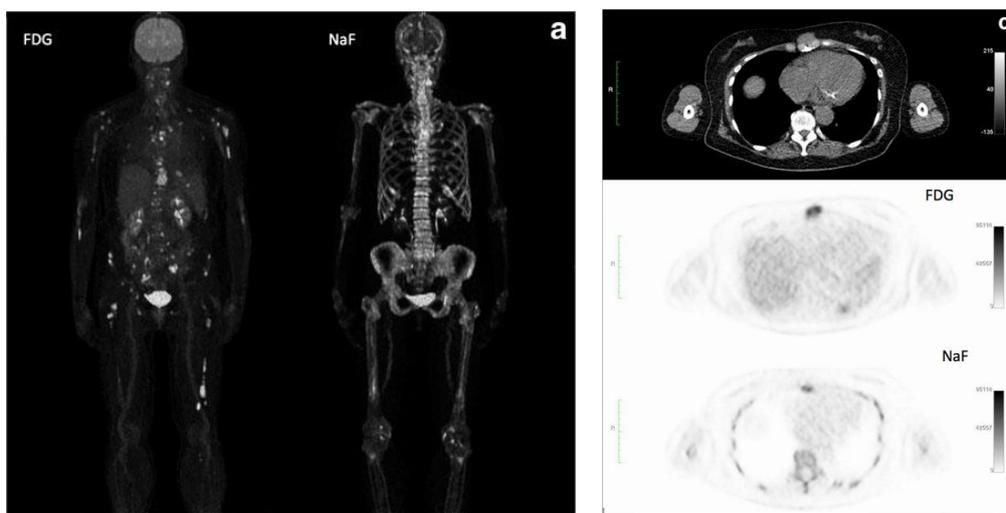


Figure 47: Comparaison 18F FDG PET/CT et 18F NaF PET/CT chez une femme de 69 ans en stade III de MM

(b) Les scintigraphies

1. Scintigraphie osseuse au $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$

La scintigraphie osseuse au technetium-99m utilise les biphosphonates comme vecteur du médicament radiopharmaceutique, ceux-ci se fixent sur les cristaux d'hydroxyapatite en formation. Il semblerait logique qu'une scintigraphie osseuse soit effectuée afin de mettre en évidence les lésions osseuses dans le myélome multiple. Or, cet examen n'a pas d'intérêt diagnostique dans cette indication. Contrairement à la plupart des lésions malignes, les lésions osseuses du myélome ne fixent pas le biphosphonate de technétium 99m (sauf lorsqu'elles sont fracturaires). Effectivement la fixation de ce MRP dépend de la vascularisation, de la perméabilité capillaire mais surtout de l'activité ostéoblastique, activité quasi-inexistante dans les lésions lytiques. Le $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ est donc un traceur de la

reconstruction osseuse qui permet de visualiser des lésions ostéocondensantes et non des lésions ostéolytiques comme cela est le cas dans le myélome.

2. Scintigraphie au ^{99m}Tc –MiBi

i. Principe :

Cette technique d'imagerie utilise un vecteur appelé le méthoxy-isobutyl-isonitrile. Une fois préparé à l'aide d'une solution injectable de pertechnétate de sodium ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), le complexe ^{99m}Tc -sestamibi se forme. Initialement développé comme traceur de la perfusion, son utilisation en cardiologie a permis de constater que ce produit s'accumule dans le myocarde, mais également dans d'autres organes tels que le foie, les muscles, la thyroïde, le rein ainsi que dans de nombreuses lésions tumorales, notamment dans les localisations osseuses du myélome (Look et al. 1996).

Sa fixation tissulaire dépend principalement de la vascularisation, laquelle est généralement accrue dans les tissus tumoraux. En raison de sa nature lipophile et de sa charge positive, le complexe de ^{99m}Tc -Sestamibi traverse les membranes cellulaires par simple diffusion et s'accumule dans la mitochondrie (compartiment cellulaire le plus chargé négativement). Il a été mis en évidence sur culture cellulaire, une accumulation quatorze fois plus importante du sestamibi dans les cellules tumorales que dans des cellules normales. Ceci s'explique par une haute densité mitochondriale et par un potentiel transmembranaire plus élevé que dans la cellule normale (Delmon-Moingeon et al. 1990).

Hormis sa fixation dans les tissus tumoraux, le ^{99m}Tc -sestamibi semble avoir un intérêt majeur dans le domaine de l'oncologie. Celui-ci refléterait le statut P-gp d'une cellule cancéreuse. La P-gp étant une protéine membranaire d'efflux responsable d'une chimiorésistance. La plupart des drogues qu'elle transporte sont des cations lipophiles. Le sestamibi est donc un substrat de la P-gp. Ainsi, les cellules exprimant la P-gp montrent une accumulation de sestamibi dont le niveau est inversement lié au niveau d'expression de cette protéine (Piwnica-Worms et al. 1995). Par exemple dans le cancer du sein, il existe une corrélation inverse entre la fixation du sestamibi et le statut P-gp de la tumeur. L'absence de fixation du sestamibi sur la tumeur mammaire est prédictive d'une chimiorésistance. Des données in vitro suggèrent que le sestamibi ne se fixe pas dans la cellule cancéreuse chimiorésistante P-gp+/MDR+ et se fixe en revanche dans la cellule chimiosensible P-gp.

Pour une cellule chimiosensible, la fixation tumorale du ^{99m}Tc -sestamibi diminue au cours du traitement à mesure de la diminution des cellules cancéreuses. Ce traceur pourrait être utile pour le suivi de l'efficacité thérapeutique.

ii. Contexte du myélome.

La scintigraphie ^{99m}Tc -sestamibi corps entier a été comparée à l'IRM de la colonne vertébrale et du bassin et au PET/CT corps entier dans l'évaluation de l'étendue et de la gravité de la maladie des patients atteints de myélome. Lors de l'étude, la scintigraphie ^{99m}Tc -sestamibi a montré une mauvaise sensibilité au niveau de la détection du bassin et de la colonne vertébrale. Elle s'est révélée être plus utile pour l'imagerie du corps entier avec une meilleure détection pour les lésions diffuses que pour les lésions focales du MM (Fonti et al. 2008). Le ^{99m}Tc -sestamibi semble aussi sensible que l'IRM pour la détection des infiltrations diffuses mais moins performantes pour les atteintes focales. L'absorption de ^{99m}Tc -sestamibi est relativement élevée au niveau du myocarde, du foie et de la rate et est normalement excrétée par la bile. La visualisation de MM est limitée dans ces régions. L'absorption de ^{99m}Tc -sestamibi est augmentée dans la maladie active et se normalise en rémission (Figures 48,49 et 50). Elle peut cependant être faussement réduite dans les formes résistantes aux médicaments du MM, entraînant de faux négatifs (Walker et al. 2012). L'imagerie de ^{99m}Tc -sestamibi pourrait être une alternative quand la TEP/CT au ^{18}F FDG et l'IRM ne sont pas envisageables.

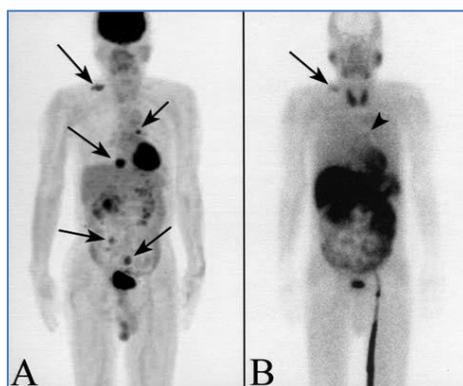


Figure 48 : Implication des tissus mous dans la maladie (a) ^{18}F FDG PET (b) ^{99m}Tc -MIBI

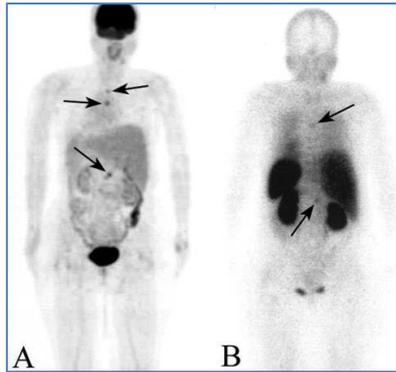


Figure 49 : Implication du squelette dans la maladie (a) 18F FDG PET (b) 99mTc-MIBI

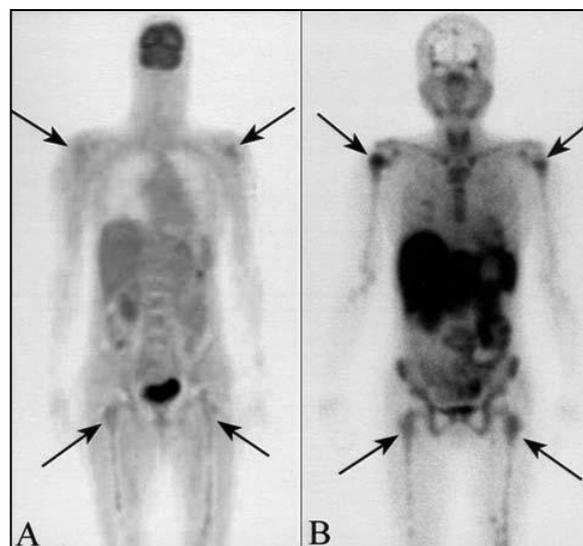


Figure 50: Implication de la moelle osseuse dans la maladie (a) 18F FDG PET (b) 99mTc-MIBI

E. Classification « staging » DURIE et SALMON « plus »

De nombreuses études ont conduit à modifier la classification de Durie-Salmon datant de 1975. Cette dernière permettait de stadifier la maladie en fonction de critères biologiques et des atteintes osseuses apportées par la radiographie conventionnelle. Depuis 2006, ces critères ont été revus. Une nouvelle classification a intégré le taux de créatinine sérique et les techniques d'imagerie, à la fois anatomique et fonctionnelle pour la stadification du myélome : le TEP/CT au [¹⁸F]FDG et l'IRM (B. G. M. Durie 2006) (Tableau 9).

| Durie-Salmon PLUS Staging System | |
|--|--|
| Classification | Plus MR Imaging and/or FDG PET Findings |
| MGUS | All negative |
| Stage IA, smoldering or indolent * | Can have single plasmacytoma and/or limited disease at imaging |
| MM | |
| Stage I B † | 5 focal lesions; mild diffuse disease |
| Stage II A or B † | 5–20 focal lesions; moderate diffuse disease |
| Stage III A or B † | 20 focal lesions; severe diffuse disease |
| <p><i>* Serum creatinine value of less than 2.0 mg/dL and no extramedullary disease. To convert to Système International units in micromoles per liter, multiply by 88.4.</i></p> <p><i>† Serum creatinine value of 2.0 mg/dL or higher and extramedullary disease. To convert to Système International units in micromoles per liter, multiply by 88.4.</i></p> | |

Tableau 9 : Classification de DURIE et SALMON PLUS

Le patient est en stade 1, lorsque l'on observe de 0 à 4 lésions focales ou que l'atteinte diffuse est modérée. La maladie a évolué au stade 2 si l'atteinte comprend 5 à 20 lésions focales ou que l'atteinte diffuse est moyenne. Enfin lorsqu'on observe plus de 20 lésions focales ou une atteinte diffuse sévère, le patient est entré en stade 3. La valeur du stade clinique dans la prise en charge des patients est soulignée à la fois par la discrimination du statut précoce de la maladie et par une meilleure distinction des risques des patients en stade 2 et 3. Grâce à ces nouvelles techniques d'imagerie les bons et moins bons pronostics peuvent être distingués. C'est particulièrement vrai pour les patients présentant plus de 20 lésions focales à l'IRM et/ou TEP où la présence extra médullaire de la maladie identifie les patients avec le plus mauvais pronostic.

Le système Durie -Salmon PLUS à la différence du système de stadification Durie -Salmon ne comprend pas les paramètres biologiques tels que l'hémoglobine et le taux d'immunoglobuline en dehors de l'utilisation du taux de créatinine sérique. La question concernant la comparabilité et la concordance de ces deux classifications se pose.

Fechtner et al ont donc comparé la décision de prise en charge thérapeutique après examen de l'ensemble du corps par IRM et après utilisation du système de classification de Durie-Salmon classique. Ce dernier comprenait la radiographie conventionnelle et les paramètres biologiques suivants : la calcémie, la créatinine et l'hémoglobine, correspondant aux critères CRAB. Les systèmes étaient concordants dans seulement 45% de l'ensemble des patients examinés atteints de myélome multiple (Fechtner et al. 2010). Les décisions de traitement

dépendent donc de la classification utilisée et, par conséquent, reste encore une question de débat.

Ce système de DURIE et SALMON plus attribue une pertinence égale à la TEP/CT au 18F-FDG et à l'IRM de la colonne vertébrale. Cependant dans la pratique courante, la problématique de l'imagerie n'a pas été encore élucidée. C'est le contexte clinique qui va permettre de préférer une technique à l'autre ou, finalement, de recourir aux deux pour étayer le diagnostic.

Enfin cette classification de la maladie par catégorie pronostique est de plus en plus utilisée dans les essais cliniques. Une large utilisation de ces nouvelles techniques d'imagerie participera à améliorer l'analyse des résultats d'essais cliniques incorporant de nouveaux traitements.

Les études à venir permettront de déterminer quelle technique ou combinaison de techniques devraient être le nouveau gold standard, en mettant l'accent sur la valeur pronostic et le rôle de l'imagerie dans le suivi de la maladie.

F. Conclusion et Perspectives :

La radiographie du squelette, le gold standard pendant de nombreuses années, semble pouvoir être remplacée par le scanner corps entier. De plus l'IRM du rachis lombaire a été incluse dans les recommandations de consensus 2009 des lignes directrices du myélome. Des images radiographiques du crâne et des côtes doivent tout de même être effectuées.

Dans le cas de la stadification de la maladie, étape clé dans la prise en charge du patient, une méthode sensible est préconisée dans la mesure où la mise en place d'un traitement dépendra du nombre de lésions détectées. En effet, la mise en place d'une chimiothérapie sera envisagée pour les stades 2 et 3 et non pour le stade 1. Pour cette étape de la prise en charge du patient, l'IRM paraît la méthode la plus adaptée surtout lorsque il y a une suspicion de compression médullaire. Le scanner est retenu quand l'IRM n'est pas disponible. Pour le suivi du traitement, le TEP/CT au [¹⁸F]FDG a montré son efficacité ainsi que l'IRM. La TEP/CT au [18F] FDG est une méthode basée sur la fusion entre une image anatomique et une image métabolique donnée. Bien que cette méthode soit très sensible, elle n'est malheureusement pas spécifique du myélome. Par conséquent, le développement d'un composé diagnostique plus spécifique du myélome semble être intéressant.

De plus, la consommation du [¹⁸F] FDG est augmenté dans des régions inflammatoires et au niveau des sites infectieux, situations fréquemment rencontrées chez les patients atteints de myélome. Ceci peut mener à des faux positifs. Il semble donc intéressant de développer des traceurs plus spécifiques des plasmocytes tumoraux, avec en particulier des sondes spécifiques de biomarqueurs tumoraux.

Comme nous l'avons vu, la sensibilité de la TEP/CT au [¹⁸F] FDG pourrait prédire très précocement la réponse. De nouveaux traceurs TEP ouvrent la voie de l'imagerie moléculaire qui semble extrêmement prometteuse dans le diagnostic et dans le suivi du traitement ciblé du cancer.

3. Nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques du myélome

Comme évoqué dans la première partie de ce mémoire, le myélome multiple est la deuxième hémopathie maligne la plus fréquente après les lymphomes non hodgkiniens. En 2005, la survie relative à 5 ans était environ de 40 %. Aujourd'hui, elle est passée à 65% grâce à l'utilisation de combinaisons de nouvelles molécules (lénalidomide, bortezomib)(Yokota et al. 1992). Cela reste donc une pathologie tumorale hématologique encore non curable malgré l'amélioration considérable du taux de survie.

La prise en charge des patients repose notamment sur la mise en évidence de l'atteinte osseuse, principalement par des techniques d'imagerie anatomique. Malheureusement, ces techniques ne donnent aucune information sur l'évolution du métabolisme tumoral dans les masses résiduelles. Les techniques d'imagerie métabolique sont donc aujourd'hui les plus étudiées dans cette pathologie.

La TEP/CT au [¹⁸F]FDG semble être la technique la plus appropriée pour le suivi de la réponse thérapeutique et pour détecter précocement la rechute. Cependant la TEP au [¹⁸F] FDG manque de spécificité, notamment dans un contexte infectieux fréquent chez ces patients. Malgré une bonne sensibilité dans de nombreux cancers, cette dernière semble faible pour le myélome en raison de l'hétérogénéité des plasmocytes tumoraux et de la faible activité métabolique de ces cellules.

Un des projets de recherche de l'équipe 13 du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT) est de réaliser dans un premier temps un radio traceur moléculaire spécifique du plasmocyte tumoral à visée diagnostique, afin de pouvoir détecter et prendre en charge précocement la maladie, puis d'évaluer la maladie résiduelle après traitement. Dans un second temps, ce radiotracer pourra être utilisé à des fins thérapeutiques, en remplaçant l'isotope radioactif.

La cellule tumorale, dérivant d'une cellule du système immunitaire, peut être caractérisée par des marqueurs membranaires tels que le CD38 et le CD138 exprimés dans 100 % des cas de myélome, ou encore par d'autres CD associés au caractère malin des cellules comme le CD 56 ou le CD28. L'hétérogénéité du phénotype des plasmocytes normaux d'un individu à l'autre et chez un même individu a été mise en évidence. Les marqueurs phénotypiques qui signent le caractère malin sont de même très hétérogènes, le CD38 et le CD138 semblent donc être les cibles idéales.

A. Les anticorps

1) Historique

Il est intéressant de rappeler que les premiers anticorps utilisés en biologie ont été obtenus à partir de cellules de myélome murin. Effectivement c'est en 1975, avec la combinaison de nouvelles techniques que César Milstein et Georges Köhler (Figure 51) réussirent à développer une méthode permettant la production des anticorps *in vitro* à partir d'un hybridome résultant de la fusion entre un lymphocyte B (LB) murin et un myélome de la même espèce (Köhler and Milstein 1975) .

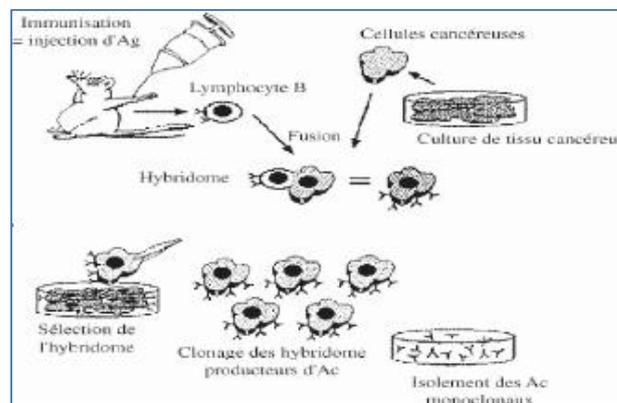


Figure 51 : Production des premiers anticorps monoclonaux

Les L_B provenant de souris immunisées sont fusionnés avec des plasmocytes malins provenant d'un myélome murin. Ces plasmocytes sont déficients en une enzyme nécessaire à la biosynthèse des nucléotides, l'HGPRT (Hypoxanthine-Guanidine Phosphoribosyl Transferase), ce qui permet la sélection des cellules hybrides (ou hybridomes) par un agent : l'aminoptérine, ajouté au milieu de culture. En effet, celle-ci bloque la seule voie de biosynthèse des nucléotides disponibles aux plasmocytes malins non fusionnés, entraînant alors leur mort et ainsi la sélection par complémentarité génique des hybridomes issus de la fusion avec les L_B qui, eux, possèdent l'HGPRT fonctionnelle. Les L_B non hybridés étant incapables de se multiplier *in vitro* vont disparaître après quelques jours. Les hybridomes ainsi sélectionnés ont donc la capacité de se multiplier indéfiniment *via* leur partie myélome et la capacité de sécréter des anticorps dont l'origine est lymphocytaire. Chaque clone cellulaire hybride isolé produit des anticorps tous identiques que l'on appelle anticorps monoclonaux (AcM).

Cette découverte a ensuite permis de développer l'utilisation des anticorps monoclonaux en recherche et dans le domaine médical pour le diagnostic *in vitro* et pour la thérapie de diverses pathologies.

2) Les anticorps : définition

Le pronostic de certains cancers s'est considérablement amélioré avec l'essor, entre autres, des anticorps thérapeutiques. Ces biomédicaments présentent une spécificité importante pour leur cible et leur capacité à mobiliser le système immunitaire est responsable, en grande partie, de leur efficacité thérapeutique.

Ces biomédicaments sont définis comme étant « *tout médicament dont la substance est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle* » (article L. 5 121-1 modifié du CSP Français).

3) Les anticorps : fonction

Leur activité implique plusieurs mécanismes qui découlent de leur structure.

En effet :

- La partie Fab, partie variable, est capable de reconnaître l'Ag
- La partie Fc, partie constante, va activer des effecteurs de cytotoxicité comme :
 - le système du complément
 - les cellules du système immunitaire inné (polynucléaires, macrophages, NK, LT) via les récepteurs Fc de ces cellules, c'est ce qu'on appelle l'ADCC ou cytotoxicité médiée par les anticorps.

4) Les différentes générations d'anticorps

Les premiers anticorps obtenus ont été les anticorps thérapeutiques murins. En raison de leur immunogénicité, des réactions d'hypersensibilité, pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique ont été rencontrées chez l'homme. Il a donc été indispensable de développer rapidement de nouveaux types d'anticorps plus proches des anticorps humains (Hwang and Foote 2005).

En effet, une utilisation chronique d'anticorps murins chez l'homme induit le déclenchement d'une réaction immunitaire chez l'hôte avec production d'anticorps humains anti-souris HAMA (Schroff et al. 1985). Les anticorps murins sont donc aujourd'hui les moins nombreux sur le marché. Ils sont néanmoins utilisés en cas d'échec des autres traitements ou encore lors d'utilisation ponctuelle en diagnostic pour l'imagerie *in vivo*. En effet, dans cette indication, les quantités d'anticorps marqués utilisées sont très inférieures à celles utilisées en thérapie.

Dans les années 80-90, les avancées technologiques en biologie moléculaire ont permis de générer successivement des anticorps chimériques, humanisés puis totalement humains. Ainsi les anticorps monoclonaux ont pu connaître un nouvel essor en thérapie.

Plus l'anticorps comporte des séquences humaines, plus l'immunogénicité potentielle chez l'homme est réduite. De plus, cette proximité génétique avec les récepteurs de fragment Fc humains, améliore la demi-vie et les fonctions effectrices de l'anticorps. Les suffixes appliqués aux noms des anticorps permettent d'identifier leur nature : -momab (murin), -ximab (chimérique), -zumab (humanisé), -mumab (humain) (Figure 52).

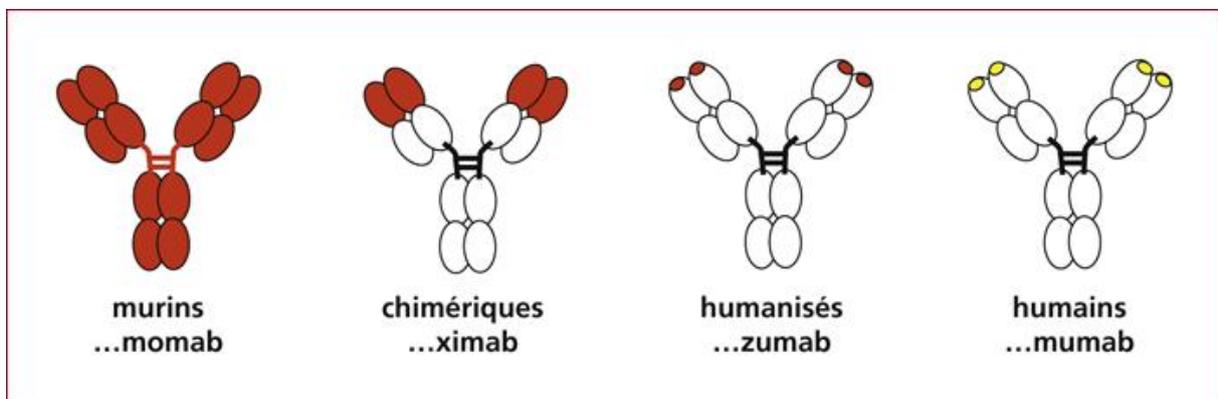


Figure 52 : Différentes générations d'anticorps

De nombreux anticorps, visant sélectivement les antigènes tumoraux, ont été développés au cours des deux dernières décennies. Ils sont utilisés dans le cadre de traitement par immunothérapie. Le potentiel pathogène de ces bio-médicaments peut être augmenté, en leur greffant une substance radiotoxique émetteur β^- , pour les transformer en produit de radio immunothérapie. L'utilisation de radionucléides émetteurs γ permet de visualiser la

distribution de ces anticorps et d'avoir accès à des outils de radio-immunodiagnostic ou d'immunoscintigraphie.

B. Radioimmunoscintigraphie(RIS)

1) Applications :

Son principe consiste à amener spécifiquement un isotope radioactif sur un tissu donné en utilisant des anticorps ayant une spécificité pour un tissu ou un antigène particulier. Dans le domaine de l'oncologie, la cible peut être un antigène associé aux tumeurs, un récepteur de facteur de croissance, un produit d'oncogène ou de gène « suppresseur de tumeur » muté, voire une molécule liée à l'angiogenèse. Le marquage des anticorps anti tumeurs par des radio-isotopes émetteurs γ tels que le technétium-99m (^{99m}Tc) ou l'indium 111 (^{111}In) a joué un rôle important dans la démonstration de la spécificité de l'immunociblage tumoral et semble intéressant pour le diagnostic et le suivi des patients pendant et à la fin d'un traitement. Par exemple, l'arcitumomab (CEA-Scan®), fragment Fab' marqué au ^{99m}Tc , reconnaît l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) et est utilisé pour le diagnostic des récurrences de cancers colorectaux. L'ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), un anticorps monoclonal murin anti-CD20 marqué à l' ^{111}In , était indiqué dans le diagnostic des lymphomes B non hodgkinien, désormais il est utilisé dans le traitement. Cet anticorps a été marqué à l' ^{111}In , dans le but d'effectuer la dosimétrie patient. Sur la base de cette dosimétrie, il était possible de calculer les doses absorbées par chaque organe avant administration de Zevalin® marqué à l'yttrium-90. Les doses absorbées, estimées pour les organes sains, se situaient nettement en dessous des limites supérieures de sécurité généralement acceptées.

Grâce à l'utilisation de ces isotopes radioactifs émetteurs de rayonnements électromagnétiques γ , il a été possible de visualiser l'efficacité d'immunociblage d'un anticorps, de connaître sa distribution dans l'organisme, de déterminer sa demi-vie et d'obtenir des données de dosimétrie pour connaître l'exposition éventuelle des organes sains lors d'une application thérapeutique. La RIS se révèle être une méthode de diagnostic intéressante, complémentaire des examens conventionnels, principalement pour le diagnostic des récurrences ou de métastases de certains cancers (Chatal et al. 1992). Elle permet une détection précoce d'anomalies, plusieurs mois avant les modifications

morphologiques. Sa sensibilité dépend plus de la densité de l'antigène tumoral sur la cible que de la taille des lésions.

D'autres domaines comme l'infectiologie sont concernés par l'immunociblage. Le sulesomab (LeukoScan®) est un fragment Fab' d'anticorps qui reconnaît une glycoprotéine de surface (NCA-90) de granulocytes. Il est couplé au ^{99m}Tc pour visualiser le lieu et l'étendue de l'infection ou de l'inflammation osseuse chez les patients suspectés d'ostéomyélite (Ivančević et al. 2002).

Après cet enthousiasme, on aurait pu s'attendre à l'essor des anticorps diagnostiques notamment dans le domaine de la cancérologie, mais les premiers résultats cliniques n'ont pas été à la hauteur des espérances.

2) Inconvénients

L'inconvénient majeur des anticorps monoclonaux pour le diagnostic *in vivo* est leur pharmacocinétique. En effet, les anticorps entiers persistent dans la circulation sanguine pendant plusieurs jours. Ceci génère un bruit de fond important qui dégrade la qualité de l'image car il n'y a pas un ratio tumeur/bruit de fond suffisant le jour de l'injection (Kelloff et al. 2005). Un signal non spécifique peut aussi être détecté (anticorps circulants fixés ou non à l'antigène, radioactivité libérée à partir de l'anticorps marqué dans la circulation, fixation non spécifique de certains agents chélatants en particulier au niveau hépatique, rénale ou encore médullaire) conduisant à des faux positifs.

Le principal problème de la RIS est lié à la faible accessibilité des antigènes tumoraux aux anticorps. En effet, les tumeurs expriment de manière hétérogène les antigènes cibles. De plus, leur vascularisation est souvent anarchique conduisant à une faible distribution de l'anticorps au centre de la tumeur. Au niveau de l'anticorps, sa grande taille limite l'infiltration dans le site tumoral et la captation non spécifique de l'anticorps limite sa diffusion au sein de la tumeur (Chatal et al. 1992; de Bie et al. 1992).

3) Perspectives

L'avenir de la RIS dépend donc de l'ingénierie moléculaire. Avec l'évolution, différents formats d'anticorps se présentent comme des sondes adaptées pour le diagnostic *in vivo* des tumeurs. Des études ont montré que la clairance systémique des formats d'anticorps est inversement proportionnelle à leur taille : plus le fragment est petit, plus la clairance sanguine est rapide (Rosebrough et al. 1988) (Yokota et al. 1992).

Une autre approche est celle d'une imagerie plus sensible avec des radio-isotopes de période adaptée à la distribution tumorale de l'anticorps. En effet, l'anticorps se retrouve concentré dans la tumeur au bout de plusieurs jours. L'utilisation d'isotopes radioactifs émetteurs de positons de périodes longues pour marquer des anticorps (immuno-TEP) est donc une approche intéressante car il serait possible d'obtenir une image de bonne qualité avec un bruit de fond minime. L'immuno-TEP permet la caractérisation moléculaire de processus tumoraux, avec des applications potentielles diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques. Par ailleurs, l'immuno-TEP devrait permettre d'étudier des marqueurs pronostiques à l'échelle du corps entier, d'évaluer et de quantifier l'expression et l'accessibilité de cibles *in vivo* et de sélectionner ainsi les patients pour des thérapies ciblées coûteuses. L'imagerie *in vivo* des tumeurs est un domaine de recherche en plein essor. Cette imagerie fonctionnelle joue un rôle essentiel dans l'étude du fonctionnement des organes, en mode physiologique ou pathologique.

De plus, l'intérêt de la radiochimie est de pouvoir remplacer un isotope radioactif utilisé en diagnostic (émetteur γ par exemple) par un isotope utilisé en thérapie (émetteur β^-) lorsqu'ils sont dans un groupe chimique proche. Il sera alors possible de réaliser une scintigraphie à un patient pour savoir s'il est éligible à une radio immunothérapie.

C. Le théranostic : une médecine personnalisée

La médecine personnalisée est une des voies les plus prometteuses en cancérologie. Elle consiste à traiter chaque patient de façon individualisée en fonction des spécificités génétiques et biologiques de sa tumeur. Son but est d'améliorer la performance des soins, d'éviter des traitements inutiles et d'améliorer la qualité de vie des patients.

Ainsi, le principe d'adapter la thérapie au diagnostic est appelé «théranostic» (Pene et al. 2009; Seaman et al. 2010). Ce nouveau concept de théranostic oncologique nécessite la caractérisation approfondie d'une tumeur donnée en identifiant ses biomarqueurs spécifiques. Ainsi, la découverte de ces marqueurs cancéreux a permis la mise au point de thérapies ciblées. En raison de leur pouvoir spécifique et affin, les anticorps sont apparus comme les molécules de choix pour cette nouvelle approche. Effectivement ils peuvent être utilisés en thérapie et en diagnostic ce qui en fait des candidats prometteurs pour le théranostic.

Aujourd'hui, l'importance des anticorps monoclonaux pour la thérapie anti-cancéreuse ne présente aucun doute. La première méthode fût l'utilisation d'anticorps thérapeutiques couplés à un élément cytotoxique adressés spécifiquement aux cellules tumorales en visant les biomarqueurs membranaires. Pour ce qui est du diagnostic on peut envisager la mise au point de nouveaux radioimmunotraceurs pour une application efficace. Le théranostic semble être une stratégie prometteuse.

1) L'objectif de la théranostic :

Ce concept a donc pour but de disposer de nouveaux traceurs de marqueurs spécifiques d'une maladie, permettant ainsi de mieux suivre leur expression au cours de l'évolution de la maladie et de mieux caractériser l'hétérogénéité des cellules cancéreuses. Par ailleurs il permet aussi de disposer d'approches diagnostiques pour caractériser les marqueurs présents à la surface des tumeurs des patients afin d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique.

Dans ce contexte, l'imagerie *in vivo*, devient une approche incontournable. Parmi les différentes technologies d'imagerie actuelles, la tomographie à émissions de positons (TEP) possède l'avantage d'être une des méthodes les plus sensibles et reste la seule technique d'imagerie quantitative répondant aux conditions du théranostic. Ainsi, il paraît intéressant de développer de nouveaux traceurs pour l'imagerie TEP.

2) Théranostic et myélome

Le théranostic semble être une stratégie prometteuse. L'approche diagnostique permettrait une détection spécifique et une stadification précise de la maladie, un suivi du patient en termes d'efficacité thérapeutique, et surtout de suivi de la maladie résiduelle. L'approche thérapeutique permettrait, elle, l'amélioration du traitement individualisé des patients atteints de myélome.

(a) Intérêt diagnostique et pronostique :

L'enjeu repose donc sur un diagnostic spécifique et précoce des plasmocytomes osseux et extra médullaires. La détection, durant les étapes initiales de la maladie, est d'une importance cruciale sur le pronostic de survie. Par conséquent, le développement d'un radio traceur tumoral plus spécifique du myélome semble être intéressant pour détecter la présence des plasmocytes tumoraux ou étudier l'environnement tumoral. En raison de

l'expression répandue du CD38 et du CD138 sur les plasmocytes, le marquage d'un anticorps monoclonal (anti-CD138 ou anti-CD38) (van der Veer et al. 2011), avec les techniques en projet dans l'équipe 13 du CRCT, permettrait de valider dans un premier temps les modèles animaux de myélome émergent (Severin et al. 2011). Sachant qu'une lésion myélomateuse est parfois formée d'un petit nombre de cellules, la mise au point d'un radiotracer TEP pourrait être pertinente car l'imagerie TEP est la plus sensible. Ainsi, le marquage d'un anticorps avec un traceur TEP pourrait être une alternative intéressante. Sachant qu'un anticorps met trois jours à atteindre des concentrations optimales dans la tumeur, l'utilisation d'un traceur TEP sensible et spécifique de période longue comme le Zirconium 89 (^{89}Zr , $T \approx 3$ jours) permettrait d'assurer le suivi sur plusieurs jours (Deri et al. 2013).

L'objectif de l'équipe toulousaine répond à cette évolution de l'ingénierie, elle est en mesure de procéder au radiomarquage d'un anticorps comme l'anti CD38 ou l'anti CD138, anticorps recombinants particulièrement adaptés à l'imagerie TEP utilisant le ^{89}Zr .

Devant toute suspicion de myélome, le radiomarquage des cellules CD38⁺ ou CD138⁺ permettra de visualiser les plasmocytes tumoraux exprimant ou surexprimant le CD38 ou CD138 afin d'assurer une prise en charge précoce des patients. Après traitement, le radiomarquage des cellules devrait permettre d'évaluer la maladie résiduelle de manière globale.

Actuellement au CHU de Toulouse, l'évaluation de la maladie résiduelle est testée par séquençage à haut débit, méthode potentiellement la plus sensible à l'heure actuelle. Cette technique permet de séquencer l'intégralité du génome des cellules cancéreuses afin d'y trouver des mutations responsables de la tumeur. Cela permet de dresser une carte d'identité de la tumeur et d'analyser les mécanismes moléculaires en cause. L'objectif à terme est de permettre aux médecins de disposer du profil génomique de chaque tumeur, de manière suffisamment fine et rapide pour l'intégrer à leur décision thérapeutique ou pour proposer à des patients des essais cliniques en vue de développer un traitement ciblé.

Le radiomarquage au ^{89}Zr d'un anticorps comme l'anti CD38 ou l'anti CD138 et le séquençage à haut débit sont deux approches différentes de l'évaluation de la maladie résiduelle, elles vont ainsi pouvoir être comparées. Cette approche génétique de NGS (next-generation sequencing) est très sensible mais elle se heurte cependant à l'hétérogénéité de localisation de la maladie myélomateuse. Ainsi, une aspiration médullaire au niveau sternal pour analyse de la maladie résiduelle par NGS peut être faussement négative si le patient

garde un foyer tumoral vertébral ou fémoral par exemple. La confirmation de rémission complète devrait être à la fois moléculaire et assurée par imagerie spécifique. L'autre avantage de l'utilisation combinée de ces 2 techniques est de pouvoir guider la biopsie utile pour la réalisation du NGS avec l'imagerie spécifique.

Des essais *in vivo* sur modèle murin vont donc être mis en place. Après une injection intraveineuse de l'anticorps marqué au ^{89}Zr , des études longitudinales pourront être réalisées sur une caméra $\mu\text{PET}/\text{CT}$, chez le même animal pendant une durée de 1 semaine. Plusieurs études seront alors réalisées, une comparaison de biodistribution de l'anticorps marqué au ^{89}Zr dans une souris dépourvue de tumeur et dans un modèle murin de myélome. Grâce à ces études, il sera possible de déterminer la cinétique de distribution tumorale. Au cours d'un traitement dans un modèle murin de myélome, on suivra l'évolution de la tumeur myélomateuse. Et enfin après traitement une estimation de la maladie résiduelle sera établie.

(b) Intérêt thérapeutique :

A plus long terme, le radiomarquage des plasmocytes avec un anticorps adapté pourra s'appliquer à la thérapeutique. En effet, la construction du radiotraceur repose sur la liaison de l'anticorps à un ligand qui représente une cage pour l'isotope radioactif. Une fois mis en place, il sera donc possible de remplacer le ^{89}Zr utilisé exclusivement pour le diagnostic par un isotope radioactif de thérapie comme l' ^{90}Y . En effet, la radioimmunothérapie consiste à concentrer dans la tumeur l'isotope radioactif émetteur β^- , très ionisant et de faible parcours dans la matière en utilisant un vecteur de la tumeur, ici l'anti CD38 ou anti CD138 sur lequel est fixé l'isotope. L'immunoalphathérapie (utilisant le ^{223}Ra , par exemple, émetteur α) peut aussi être envisagée mais nécessite encore de nombreuses études.

D. Les anticorps utilisés dans le traitement du myélome

Différents anticorps monoclonaux sont prometteurs dans les cas des rechutes du myélome ou de la maladie réfractaire aux traitements comme le daratumumab, l'elotuzumab et le lorvotuzumab mertansine (van de Donk and Lokhorst 2013).

Le daratumumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le CD38 des plasmocytes humains. C'est une molécule actuellement en essai clinique dans le myélome multiple, mais

elle pourrait également être efficace pour soigner d'autres maladies hématologiques où le CD38 est exprimé. Le daratumumab a reçu la désignation accélérée (Fast Track Designation) et la désignation de thérapie révolutionnaire (Breakthrough Therapy Designation) de la FDA américaine pour le traitement des patients atteints de myélome multiple qui ont rechuté après trois lignes de traitements antérieurs et qui n'ont pas d'autres options thérapeutiques. La désignation de thérapie révolutionnaire est un programme destiné à accélérer le développement et l'examen de médicaments qui ont montré une amélioration du service médical rendu pour traiter des maladies graves ou mortelles. Le daratumumab est actuellement en développement en mono-thérapie et en combinaison avec d'autres chimiothérapies. L'étude de phase I/II en cours GEN501 vise à recruter 78 patients lourdement pré-traités. L'objectif principal de cette étude est d'établir le profil d'innocuité du daratumumab tandis que les objectifs secondaires principaux sont d'évaluer l'efficacité du daratumumab et d'établir la dose maximale tolérée (DMT). Le daratumumab a de multiples mécanismes d'action, il active les mécanismes de défense immunitaire tels que la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Anticorps (ADCC), la cytotoxicité dépendante du complément (CDC), la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) et enfin l'apoptose et la modulation de l'activité enzymatique CD38. Dans des études précliniques, le daratumumab a montré son efficacité dans la mort cellulaire des plasmocytes malins et une synergie d'action avec les autres traitements du myélome.

Le CD38 est exprimé dans 100 % des cas de myélome. Ce qui le rend intéressant dans cette approche de théranostic. Il en est de même pour le CD138 encore appelé syndecan-1. Le B-B4, un anti CD138, pourrait être aussi un bon candidat au marquage avec le zirconium 89, celui-ci fait déjà partie d'études de phases I et II.

Le lorvotuzumab mertansine (LM) est un anticorps humanisé monoclonal anti CD56, il affiche une activité anti tumorale dans des études précliniques de modèle de myélome multiple. Le CD 56, étant associé au caractère malin du plasmocyte, peut aussi être envisagé dans la prise en charge. D'après Berdeja JG, ce CD56 est exprimé dans 78 % des cas de myélome. Sa toxicité semble limiter les doses et l'effet indésirable principal observé était la neuropathie périphérique. L'évaluation continue des niveaux et des schémas posologiques

optimaux sera important pour mieux définir l'utilité de ce traitement prometteur (Berdeja, 2014).

L'elotuzumab est un anticorps monoclonal qui cible CS1 (aussi connu sous le nom de CRACC, CD319 et SLAMF7), une glycoprotéine de surface cellulaire exprimée sur les cellules du MM. Dans les modèles précliniques, l'elotuzumab exerce son efficacité via les cellules NK et la médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Le CS1 est exprimée à la surface des cellules du myélome mais également à des niveaux inférieurs sur les cellules NK où elle agit comme un récepteur d'activation. D'après l'équipe de Collins, l'elotuzumab semble induire l'activation des cellules NK CS1+ favorisant la cytotoxicité contre les cellules CS1+ du MM mais non contre les cellules NK autologue CS1+ (Collins et al. 2013). L'elotuzumab en association avec le lénalidomide et la dexaméthasone obtient des résultats intéressants dans des études de phase III dans le cadre de rechute ou de maladie réfractaire.

E. Marquage des anticorps avec le Zirconium 89

L'utilisation d'anticorps, entiers ou recombinants, en imagerie TEP, nécessite leur marquage par un radio-isotope émetteur β^+ . La chimie de complexation est optimisée pour lier efficacement le traceur à la biomolécule, avec comme objectif, de ne pas altérer sa fonctionnalité. Le radio-isotope ne doit pas interférer avec la zone qui sert à la reconnaissance de l'antigène. Une des approches de marquage radioactif est la liaison du traceur à une amine primaire d'une protéine. La méthode directe consiste à fonctionnaliser le radioélément lui-même avec un groupement réagissant sur les amines généralement un succinimidyl.

D'autre part, le marquage radioactif peut faire intervenir un agent chélatant qui, fixé par liaison covalente à la protéine, interagit avec le radio métal. Dans cette méthode, c'est l'agent chélatant qui est fonctionnalisé (Tanaka and Fukase 2008). En ce qui concerne le couplage du radioélément ^{89}Zr , l'agent chélatant de référence est la desferrioxamine B (Df).

1) L'isotope radioactif (Zhang et al 2011)

Le zirconium est un métal de transition du groupe IVB du tableau périodique. Le ^{89}Zr se transforme en yttrium-89 stable par capture électronique (77%) et par émission β^+ (23%) (Deri et al. 2013). C'est un émetteur β^+ , il a donc un spectre continu d'énergie avec une

énergie maximale $E\beta_{\max} = 395,5$ keV. Après l'émission du positon, il y a formation de l'yttrium-89 métastable qui revient à l'état stable en émettant un rayonnement γ de 908.97 keV.

(a) Avantages et inconvénients

1. Avantages

Le premier avantage est sa période de 3,3 jours, temps compatible avec une distribution tumorale optimale de l'anticorps. En général, il faut attendre plusieurs jours afin d'atteindre un signal tumeur/bruit de fond de bonne qualité. Un autre avantage est sa méthode de production. En effet, sa synthèse ne nécessite pas de cible hautement enrichie et l'énergie requise pour sa fabrication est basse. Enfin, étant un radiométal, peu de ^{89}Zr se détache de l'anticorps après internalisation de la molécule.

2. Inconvénients

Le principal inconvénient est lié à l'énergie du rayonnement γ de 908,97 keV associé au retour à la stabilité ; ceci limite la dose injectée au patient. En effet, lors des essais cliniques réalisés, pour une activité injectée de 37 MBq, la dosimétrie (dose efficace) du patient s'élève à 20 mSv alors qu'elle est de 7,6 mSv pour une injection de 400 MBq de [^{18}F]-FDG. Un autre inconvénient est sa disponibilité. En Europe, il est produit à Amsterdam par la société CYCLOTRON^{VU}.

(b) Production du Zirconium 89

Le ^{89}Zr est un isotope artificiel qui doit être synthétisé à l'aide d'un cyclotron. Il peut être produit de deux manières.

La méthode la plus utilisée est celle utilisant la réaction nucléaire suivante $^{89}\text{Y} (p, n) ^{89}\text{Zr}$. Un faisceau de protons bombarde la cible d'yttrium montée sur un disque composé d'aluminium et de cuivre, il possède une énergie de 14 à 14,5 MeV. Le bombardement a lieu durant 2 à 3h et la séparation de l'isotope a lieu par chromatographie d'échange ou par extraction de solvant. Après un temps d'irradiation optimal, le pourcentage d'impuretés (^{88}Zr) peut être inférieur à 0,2%.

La seconde méthode, basée sur la réaction nucléaire $^{89}\text{Y} (d, 2n) ^{89}\text{Zr}$, peut être utilisée pour réduire au maximum le taux de ^{88}Zr . Pour cela, la cible d'yttrium est irradiée par un faisceau

de deuteron de 16 MeV et le ^{89}Zr peut être séparé de la cible par chromatographie échangeuse d'ions avec un rendement supérieur à 80%. On peut atteindre un taux de ^{88}Zr inférieur à 0,008%, à la fin du bombardement. Afin d'améliorer le rendement de la réaction nucléaire, il faut augmenter l'énergie du faisceau incident, cependant le taux de ^{88}Zr augmentera aussi. Actuellement, le plus gros producteur de Zirconium 89 est la société CYCLOTRON^{VU}. Le produit livré possède les caractéristiques suivantes :

- Concentration : Zirconium-89 dans 1 mol/L dans l'acide oxalique
- Activité volumique : 740 – 1850 MBq/mL
- Pas de d'entraîneur ajouté
- Pureté radio nucléidique > 99,9%
- pH <4
- Endotoxine < 17,5 EU/mL

2) Chimie du Zirconium 89 (Verel et al. 2003).

Actuellement, peu de centres maîtrisent le marquage des anticorps au ^{89}Zr . En Europe, le centre de référence est Amsterdam. La société CYCLOTRON^{VU} produit les anticorps marqués au ^{89}Zr selon les normes BPF et les expédient dans les pays du monde participant à des essais cliniques utilisant cet isotope.

L'anticorps utilisé par cette équipe des Pays-Bas est le Cetuximab. Les techniques acquises pour le marquage de cet anticorps pourront s'appliquer à l'anticorps choisi pour le ciblage du plasmocyte tumoral.

(a) La déféroxamine

La chimie du ^{89}Zr utilise un chélateur: la déféroxamine, le desferal®. Ce médicament est indiqué dans le traitement de l'hémochromatose primitive non curable par saignées. En effet, il s'agit d'un agent chélateur d'anions trivalents comme l'ion ferrique (Fe^{3+}) avec une constante de formation de 10^{31} et l'ion aluminium (Al^{3+}) avec une constante de formation de 10^{25} . La chélation s'effectue sur une base molaire : 1 g de déféroxamine peut théoriquement complexer 85 mg de fer ferrique (ou 41 mg d' Al^{3+}).

La posologie d'attaque est de 15 mg/kg/h pendant 4 à 6h avec une posologie maximale 80 mg/kg/j.

Le choix de ce chélateur repose sur l'expérience clinique. Il s'agit d'un médicament qui ne présente pas d'effets indésirables aux posologies usuelles (5,6 g/j maximum). Les quantités utilisées pour la chélation du ^{89}Zr (cation trivalent) sont de 0,5g soit 10 fois plus faibles que la posologie maximale autorisée.

(b) Changement de tampon

Avant de marquer l'anticorps, il est important de changer le tampon qui peut interférer avec le marquage. Pour cela est utilisée une colonne Séphadex PD 10 lavée avec du NaCl 0,9%. Une fois lavée, l'anticorps est déposé sur la colonne. L'anticorps est récupéré dans un volume de 1,5 mL. La concentration finale de l'anticorps dans le tampon NaCl 0,9% est de 3,33 mg/mL.

(c) Modification de l'anticorps

La modification de l'anticorps peut s'effectuer suivant 2 méthodes distinctes utilisant la déféroxamine (Df) qui chélate de façon stable le ^{89}Zr .

1. Méthode 1 (Verel et al. 2003)

Cette méthode est constituée de 6 étapes (Figure 53).

La première étape consiste à modifier la Df en la transformant en N-Succinyl déféroxamine (N-SucDf). Succinctement, il faut ajouter de l'anhydride succinique à du Df dilué dans de la pyridine.

La deuxième étape consiste à chélater l'ion ferrique (FeCl_3) sur la N-SucDf, il y a alors formation de la N-sucDf-Fe.

La troisième étape est l'estérification du N-sucDf-Fe qui devient alors la TFP-N-sucDf-Fe.

La quatrième étape est celle où le chélateur TFP-N-sucDf-Fe s'attache à l'anticorps.

Le pH de la solution doit être ajusté à 9,5-9,8 avec une solution de Na_2CO_3 0,1M. Il faut alors Ajouter le TFP-N-sucDf-Fe et incubé 30 minutes à température ambiante.

Le rapport chélate:anticorps est de 1:1.

Après les 30 minutes, ajouter 50 mL d'acide gentisique (100 mg/mL pH= 4-4,5) et ajuster le pH de la solution à 4,2-4,5 avec de l' H_2SO_4 0,25M.

Le TFP-N-sucDf-Fe s'attache à un résidu lysine de l'anticorps.

La cinquième étape consiste à déplacer l'ion ferrique. Pour cela, on ajoute 50 mL d'EDTA (25 mg/mL) puis on mélange. La solution est alors mise sur un agitateur pendant 30 minutes à 35°C.

A la fin des 30 minutes, la purification de la solution se fait sur une colonne d'exclusion sephadex PD 10 préalablement lavée avec de l'acide gentisique (5 mg/mL dans du NaCl 0,9%). Collecter la fraction contenant l'anticorps modifié.

La sixième étape est le marquage de l'anticorps modifié avec le ^{89}Zr .

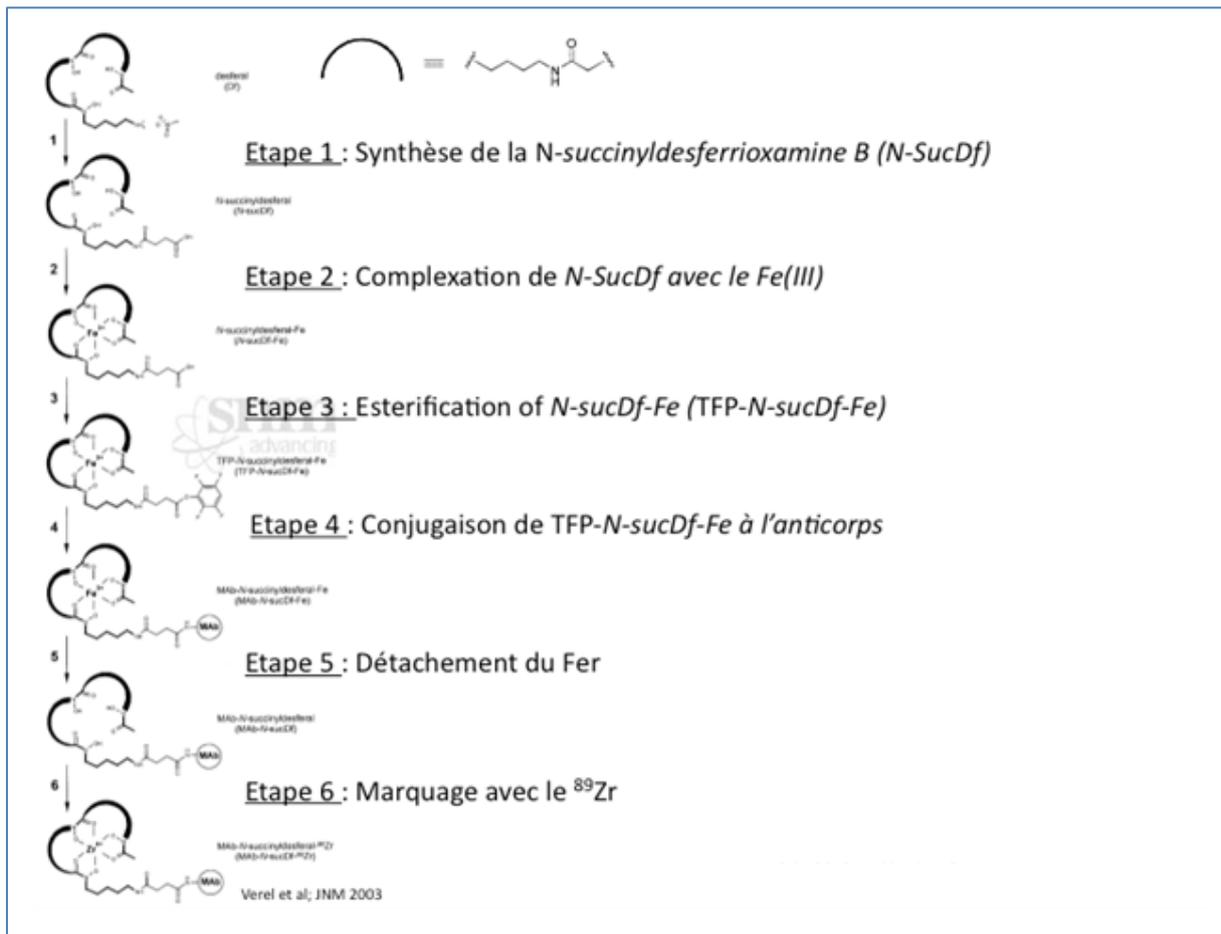


Figure 53 : Méthode de marquage d'un anticorps avec le zirconium 89 par la N-sucDf (méthode1)

Malgré le succès de cette stratégie, ce couplage demande 6 étapes, ce qui en fait une procédure longue et fastidieuse.

2. Méthode 2 (Perk et al. 2010)

Récemment, un nouveau chélateur dérivé de la Df a été rapporté pour simplifier le marquage (2 étapes) du ^{89}Zr , il s'agit du 1-(4-isothiocyanatophenyl)-3-[6,17-dihydroxy-7,10,18,21-tetroxo-27-[N-acetylhydroxyamino)-6,11,17,22-tetrazaheptaicosane]thiourée

ou p-isothiocyanatobenzyl- desferrioxamine B (Df-Bz-NCS). Le couplage de Df-Bz-NCS aux anticorps est très efficace et le faible ratio chélateur sur anticorps est de 1,5 ce qui peut éviter le changement de la pharmacocinétique et l'immunoréactivité de l'anticorps (Zhang et al., 2011). Cette seconde méthode en 2 étapes est plus simple (Figure 54).

L'étape numéro 1 consiste à lier le chélateur à un résidu lysine de l'anticorps. En effet, l'isothiocyanate forme un pont thiourée avec une amine primaire de l'anticorps. Pour cela, il faut utiliser un volume maximum de 1 mL de solution saline (2 à 10 mg/mL d'anticorps).

Il faut ajuster le pH de la solution d'anticorps à 8,9-9,1 avec du Na_2CO_3 0,1M (maximum 100 mL). Il faut ensuite dissoudre la Df-Bz-NCS dans du DMSO à une concentration comprise entre 2 et 10 mM (1,5 à 3,8 mg/mL) et ajouter 20 μL de cette solution (40 à 200 nmol) à la solution saline contenant 2 à 10 mg d'anticorps (13,2 à 66nmol). Il faut qu'il y ait trois fois plus de chélateur que d'anticorps (en concentration molaire). Mélanger. La concentration de DMSO doit rester inférieure à 2%.

Dans cette situation de couplage, il y a 0,3 à 0,9 Df-Bz-NCS par molécule d'anticorps.

Incuber le mélange sur l'agitateur 37°C pendant 30 minutes.

Après ces 30 minutes, placer le mélange sur une colonne Sephadex PD 10 lavée avec de l'acide gentisique (5 mg/mL dans de l'acétate de sodium pH= 5,4-5,6).

Collecter la fraction contenant l'anticorps modifié.

La deuxième étape est le marquage de l'anticorps modifié avec le ^{89}Zr .

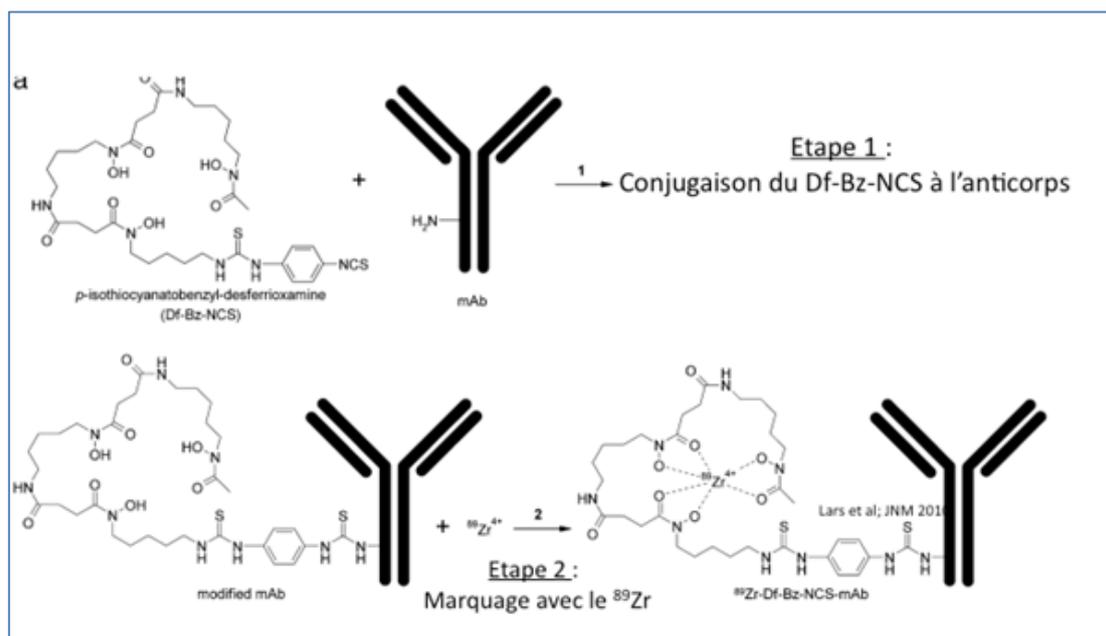


Figure 54 : Méthode de marquage d'un anticorps avec le Zirconium 89 par le Df-Bz-NCS (méthode 2)

(d) Radiomarquage avec le Zirconium 89 :

Pipeter l'activité voulue de ^{89}Zr et ajuster à un volume final de 200 μL avec de l'acide oxalique 1M. Le marquage doit se faire sous agitation douce.

Ajouter 90 μl de Na_2CO_3 2 M et attendre 3 minutes.

Ajouter 1mL de tampon HEPES 0,5 M pour atteindre un pH =7

Ajouter 710 μL de l'anticorps modifié.

La durée de marquage varie entre 30 et 60 minutes.

Après le marquage, il faut purifier le mélange sur une colonne Sephadex PD 10 lavée avec l'acide gentisique (5 mg/mL dans du NaCl 0,9% pH 4,9 à 5,3 pour la méthode 1) ou de l'acide gentisique (5 mg/mL dans de l'acétate de sodium 0,25 M pH= 5,4-5,6) pour la méthode 2.

Collecter la fraction contenant l'anticorps modifié.

Effectuer les contrôles qualités : CCM, CLHP, l'immunoréactivité, le SDS PAGE et l'essai sur les endotoxines LAL.

Le taux de complexation avec le ^{89}Zr est sensiblement le même quel que soit la méthode. Pourtant la chaîne latérale impliquée dans la liaison au ^{89}Zr du Df-Bz-NCS contient un soufre alors que celle du TFP-N-sucDf contient un oxygène. Cette différence n'a pas d'influence sur la complexation de l'isotope.

(e) Contrôles qualités :

1. Chromatographie Couche Mince (CCM)

Pour la phase mobile, il s'agit d'un mélange contenant 450 mL d'acide citrique 20 mM avec 50 mL d'acétonitrile. Le dépôt se fait sur une bande chromatographie adaptée.

L'anticorps reste au dépôt alors que le chélatant et le ^{89}Zr migre au front.

2. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Colonne : colonne d'exclusion Superdex 200 10/300 GL (GE healthcare)

Eluant : tampon phosphate

Débit : 0,5 mL/min

Un run typique donnera après injection de 20 μL de cetuximab marqué par exemple (Figure 55):

- ^{89}Zr -Ac : Tr = 29 min
- ^{89}Zr libre : Tr = 45 min

Le complexe $^{89}\text{Zr}\text{-Ac}$ et le ^{89}Zr libre ont des temps de rétention différents. De par son poids moléculaire le $^{89}\text{Zr}\text{-Ac}$ a un temps de rétention plus tôt.

Exemple de CLHP avec le Cetuximab

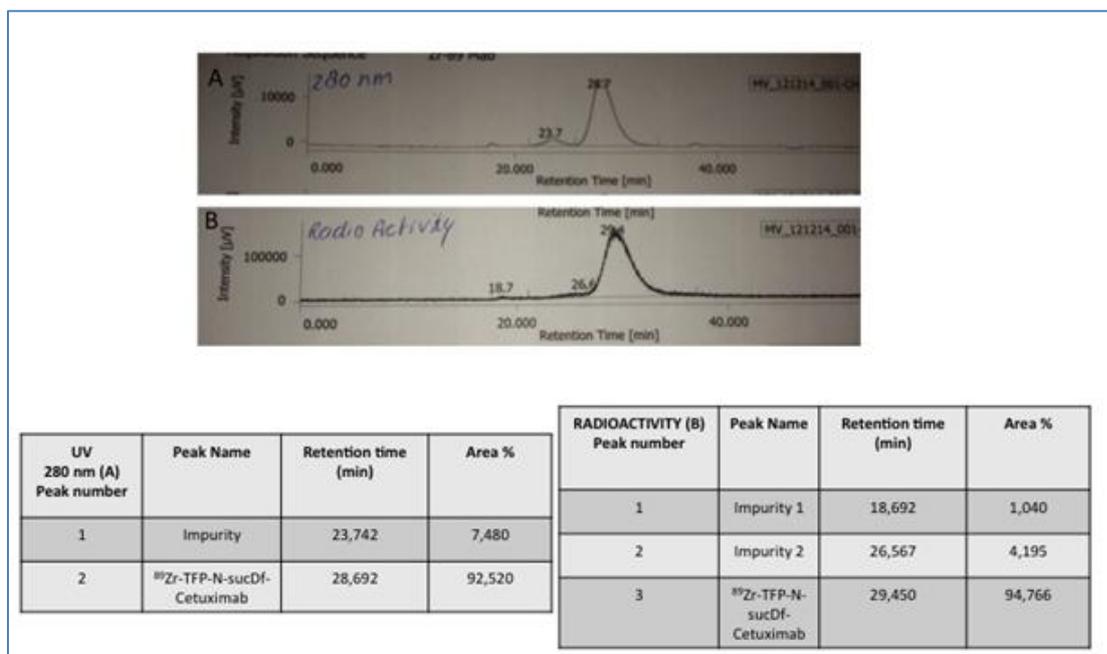


Figure 55 : Evaluation de la pureté radiochimique (PRC) du ^{89}Zr N-sucDf-Cetuximab
 A : A 280 nm : détection de l'anticorps. Tr= 28.7 minutes B : Radioactivité : détection du ^{89}Zr . Apparition d'un pic principal dont le Tr= 29.450 minutes correspondant au ^{89}Zr N- sucDf-Cetuximab PRC=95%

(f) Immunoréactivité

Il s'agit de réaliser des expériences de binding et d'immunoréactivité qui évaluent l'intégrité de l'anticorps après le marquage avec l'isotope radioactif. Pour cela, les tests sont réalisés sur des cellules tumorales. L'immunoréactivité est mesurée par la méthode Lindmo. Différentes concentrations de cellules cancéreuses sont utilisées. Avant de commencer, les cellules sont préalablement lavées deux fois. Pour chaque concentration cellulaire, deux tubes sont nécessaires afin de déterminer la liaison totale et la liaison non spécifique. Pour déterminer la liaison non spécifique un excès d'anticorps froid (1000 fois plus) a été ajouté préalablement aux tubes contenant l'anticorps marqués au ^{89}Zr .

Les tubes sont vortexés et placés à 4°C pendant 2h sous agitation. Après incubation, les tubes sont centrifugés 2 fois à 1500 tours par minutes pendant 5 minutes. A la fin de la deuxième centrifugation, 500 μl de surnageant sont prélevés. La radioactivité contenue sur les cellules et dans les surnageants est mesurée avec un compteur gamma (Automatic Gamma counter 1470 Wizard). Les coups par minute (cpm) obtenus dans les surnageants

sont soustraient aux cpm des tubes contenant les cellules. L'essai est toujours réalisé en triple.

Pour chaque concentration, la liaison spécifique de l'anticorps marqué au ^{89}Zr est calculée en soustrayant à la liaison totale les cpm obtenus pour la liaison non spécifique.

L'immunoréactivité de l'anticorps marqué au ^{89}Zr est calculée grâce au logiciel EXCEL. L'inverse de l'ordonnée à l'origine de la droite de régression linéaire est la fraction immunoréactive.

La méthode pour réaliser l'expérience d'immunoréactivité a été décrite pour le [^{89}Zr]-cetuximab. Il en sera de même avec l'anticorps choisi pour l'étude des plasmocytes tumoraux.

Exemple d'immunoréactivité avec le Cetuximab

Les cellules utilisées sont des cellules A431. Les concentrations cellulaires sont comprises entre $2,8 \cdot 10^6$ et $0,2 \cdot 10^6$ cellules. L'isotope ayant une période longue, l'incubation sous agitation douce à 4°C se fait pendant toute une nuit (Figure 56).

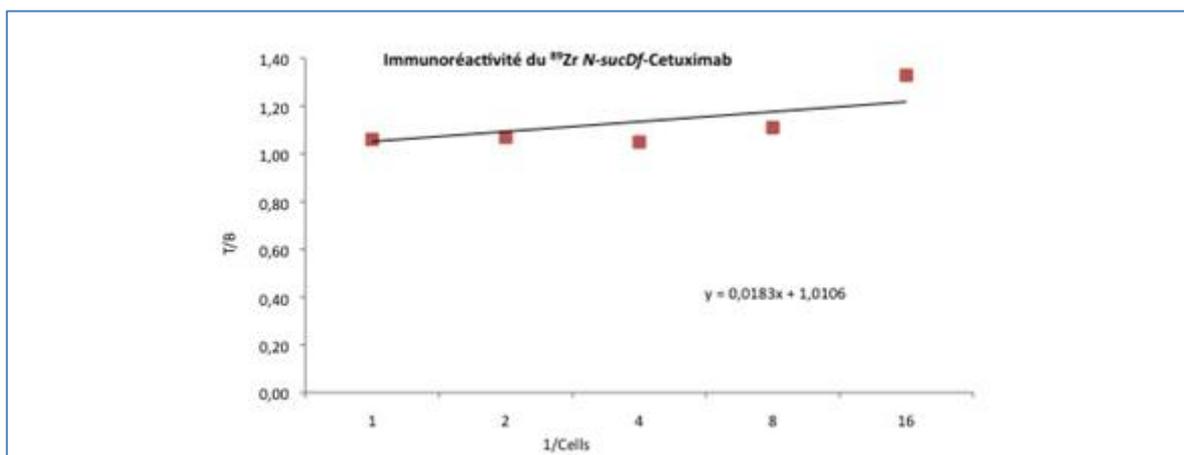


Figure 56 : Immunoréactivité du ^{89}Zr N-sucDf-Cetuximab sur la lignée cellulaire A 431
La fraction immunoréactive a été déterminée par une extrapolation linéaire de 5 concentrations cellulaires l'inverse de l'ordonnée à l'origine donne la fraction immunoréactive. Elle est proche de 99 %.

(g) Avantages et inconvénients des méthodes

Dans certaines conditions de conservation, le ^{89}Zr -Df-Bz-NCS-mAb est moins stable que l'anticorps marqué avec la méthode 1. En effet, la présence d'ion chlorure dans le tampon de conservation peut altérer l'intégrité de l'anticorps. Les rayonnements émis par le ^{89}Zr

peuvent conduire à la formation du composé ClO^- qui peut alors réagir avec le groupement thiol. Ceci peut conduire au clivage des ponts peptidiques.

Grâce à la présence de l'ion ferrique dans la méthode 1, il est possible de savoir exactement combien de molécules chélatrices se sont fixées sur un anticorps, grâce à la détection UV du Fe, à 430nm, par CLHP, après 20 minutes de complexation (Figure 57).

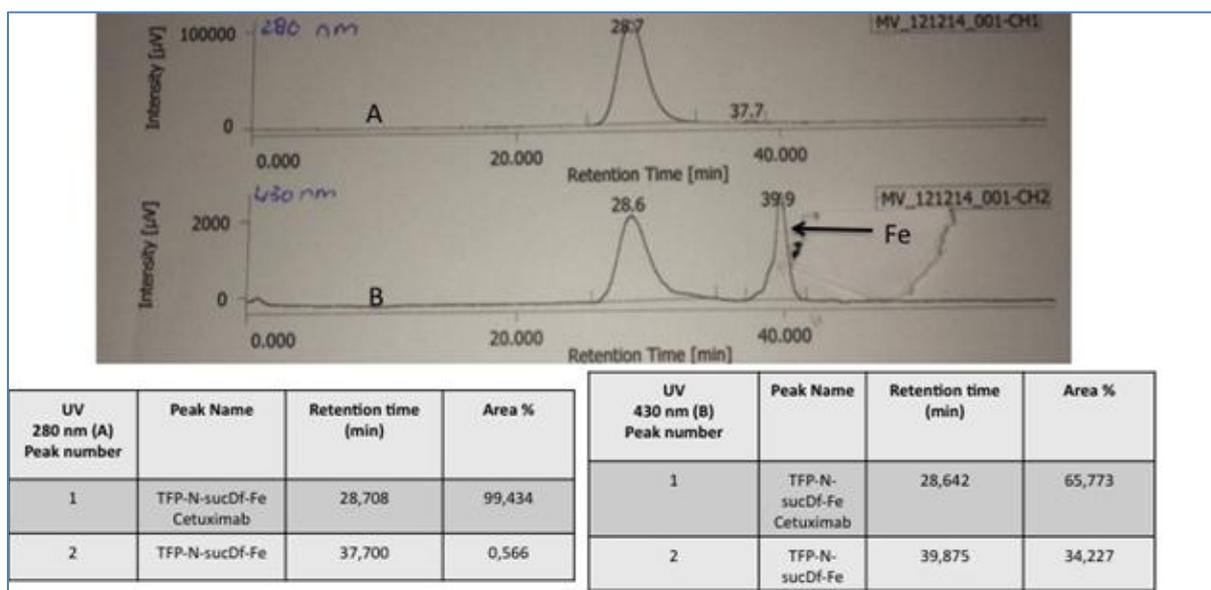


Figure 57 : Evaluation du nombre de TFP-N-sucDf-Fe conjugués au Cetuximab.

Après 20 minutes d'incubation, une CLHP est réalisée pour déterminer le nombre de groupes TFP-N-sucDf-Fe greffés à l'anticorps.

A : A 280 nm : détection de l'anticorps $\text{Tr}=28.7$ minutes

B : A 430 nm : détection du Fe. Apparition de 2 pics : un pic dont le $\text{Tr}=28.642$ minutes correspondant au TFP-N-sucDf-Fe Cetuximab et un pic dont le $\text{Tr}=39.875$ minutes correspondant au TFP-N-sucDf-Fe non conjugué.

Lors de la réaction de conjugaison il y a 3 fois plus (rapport molaire) de N- sucDf-Fe que d'anticorps. Ici, le pourcentage de conjugaison sur l'anticorps étant de 66 % : il y a 2 TFP-N-sucDf-Fe pour une molécule de Cetuximab.

La méthode 1 est longue et compliquée à mettre en œuvre par comparaison à la méthode 2. Les nombreuses étapes rendent le radiomarquage de l'anticorps difficile dans les conditions BPF pour des essais cliniques potentiels. En plus de sa rapidité de marquage, la méthode 2 possède un faible ratio chélatant : anticorps pouvant améliorer l'immunoréactivité.

(h) Autres méthode de marquage des anticorps

Historiquement, on peut noter la réaction entre N-(S-acetyl)thioacetyl-Df (SATA-Df) et les anticorps conjugués à un groupe maléimide (Meijs et al. 1996). Cette méthode de marquage a été abandonnée car le radio traceur tumoral était instable dans le plasma humain à 37°C.

Récemment, plusieurs ligands Df réagissant avec une fonction thiol ont été développés pour marquer l'anticorps sur une cystéine. Le groupe amine de Df est acétylé par des produits chimiques divers pour obtenir des réactifs aux thiols tels que le bromoacetyl-desferrioxamine (Df-Bac), iodoacetyl-desferrioxamine (Df-Iac) et maleimidocyclohexyl-desferrioxamine (Df-Chx-Mal) (Zhang et al., 2011).

Ces systèmes de couplage aux amines sont relativement efficaces, mais restent variables d'une séquence protéique à l'autre. Les fonctions amines sur un anticorps sont nombreuses, mais certaines présentes dans les régions variables sont essentielles à l'interaction antigène-anticorps, leur couplage au radioisotope peut alors perturber l'immunoréactivité de l'anticorps. C'est pourquoi, il est intéressant de mettre au point des couplages localisés. L'ingénierie des fragments d'anticorps permet, lors de la construction moléculaire, l'ajout de régions spécifiques qui permettront un couplage orienté du radiotraceur à la protéine. Pour cela, les anticorps sont modifiés par addition de résidus de cystéine positionnés de manière spécifique. Des essais réalisés sur le trastuzumab et les différents thio-trastuzumab conjugués avec un composé Df étaient marqués avec le ^{89}Zr avec un rendement élevé, ils ont montré un bon rapport tumeur:sang dans le modèle murin de cancer du sein.

(i) Utilisation d'antioxydant

Du fait de la longue période du ^{89}Zr , il est possible de le conserver. Il est cependant nécessaire de protéger l'anticorps contre les effets des rayonnements ionisants du ^{89}Zr en ajoutant des antioxydants, l'acide ascorbique étant le plus connu. Cependant son utilisation dans la conservation de l'anticorps radiomarqué est impossible car il provoque le détachement du ^{89}Zr du Df en réduisant le zirconium de l'état $^{89}\text{Zr}^{4+}$ à l'état $^{89}\text{Zr}^{2+}$. L'antioxydant utilisé est donc de l'acide gentisique à la concentration de 5 mg/mL.

Le marquage d'un anticorps anti CD38 ou anti CD138 au ^{89}Zr semble facilement extrapolable à la méthode utilisée avec le Cetuximab. L'équipe 13 du CRCT envisage donc de réaliser le développement d'un tel radiotraceur.

F. Perspectives : Radio immunothérapie et PRIT

La deuxième approche de ce projet aura donc pour but de mettre en place une prise en charge individualisée des patients. En effet, les patients diagnostiqués positifs avec le TEP/CT

à l'anti CD38 ou anti CD138 marqué avec le zirconium 89 pourront être éligibles à une radioimmunothérapie avec ces mêmes anticorps marqués avec un émetteur β^- ou α . Le remplacement de l'isotope émetteur γ de diagnostic par un isotope émetteur β^- ou α ne modifiera pas la distribution tissulaire de la molécule marquée. En revanche l'irradiation affectera les cellules infiltrées.

1) La radioimmunothérapie (RIT)

La RIT consiste à administrer des anticorps monoclonaux marqués avec un isotope radioactif qui amènent de façon spécifique des radionucléides à la surface des cellules tumorales, minimisant ainsi la toxicité au niveau des cellules saines (Zelenetz 1999). Cette thérapie associe les avantages de l'immunothérapie et de la radiothérapie. Son efficacité provient essentiellement de l'énergie des radioéléments déposée à proximité des cellules tumorales qui peut entraîner des dommages cellulaires létaux. La nature du radioélément est un facteur prépondérant dans l'efficacité de la RIT.

Elle a fait ses preuves, notamment en oncohématologie dans le traitement du lymphome malin non hodgkinien qui est très radiosensible. La mise sur le marché en 2004 de l'*Ibritumomab Tiuxetan*, anticorps monoclonal murin anti-CD20, marqué à l'yttrium 90 (Zevalin®-90Y, émetteur de rayonnement β^-) a démontré son efficacité. Il peut être utilisé en routine clinique dans le traitement des lymphomes folliculaires CD20 positifs chez les adultes réfractaires ou rechutant après traitement par rituximab, conduisant à des taux de réponse de l'ordre de 70 à 80 % avec 20 à 30 % de réponse complète.

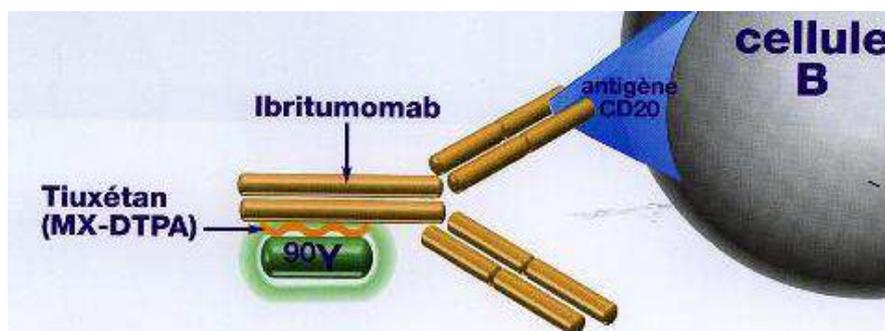


Figure 58 : Schéma représentant le Zévalin

La livraison sélective des radionucléides est une approche prometteuse pour le traitement des cancers. Son efficacité a été clairement documentée, dans le contexte clinique le plus

favorable, des tumeurs de petite taille disséminée, en particulier celles de la moelle osseuse, qui sont rapidement accessibles à l'anticorps injecté (Morschhauser et al. 2008). Cette approche semble donc intéressante dans la prise en charge thérapeutique du myélome. Pour les tumeurs solides, moins radiosensibles, l'efficacité de la RIT n'a pas eu le succès attendu en raison de la radiosensibilité inférieure, la pénétration difficile de l'anticorps dans la tumeur, et une dosimétrie du tissu sain excessive.

Effectivement, il existe une distance considérable avant que l'anticorps entre en contact avec les cellules cancéreuses au cœur de la tumeur. Après avoir atteint le tissu cible, l'anticorps rencontre d'abord l'antigène présent à la surface des cellules tumorales dans l'espace péri vasculaire. Dans les grandes tumeurs, les barrières physiologiques empêchent donc la diffusion rapide de l'anticorps.

L'efficacité de la radio-immunothérapie dans le traitement des tumeurs solides passerait par une prise en charge plus précoce des tumeurs de petites tailles, par l'utilisation de stratégies de pré ciblage et par l'utilisation de radio-isotopes émetteurs de particules α . Des approches novatrices de pré ciblage ont été mises au point afin d'améliorer la dose absorbée à la tumeur tout en limitant la toxicité du tissu sain.

(a) Les rayonnements utilisés en thérapeutique

Dans le domaine de la médecine nucléaire deux types de radioéléments sont utilisés en thérapie, les atomes se désintégrant par transformation β^- et ceux par transformation α . Dans la pratique diagnostique, le rayonnement utilisé doit avoir un long parcours à travers l'organisme, c'est à dire un grand pouvoir pénétrant, afin de pouvoir être détecté par les gamma cameras et engendrer le moins d'irradiation possible au sein de l'organisme. A l'inverse, pour la thérapie, l'isotope utilisé doit créer le maximum d'ionisations sur les cellules tumorales tout en essayant de préserver le tissu sain avoisinant.

Après irradiation, au niveau de ces cellules, on met en évidence des modifications du cycle de reproduction cellulaire (allongement, retard à la mitose) et une réduction de l'espérance de vie de la cellule.

La mort cellulaire immédiate, rapide survient pour des doses importantes, de l'ordre du millier de Gray. C'est un phénomène rare. Deux types cellulaires font exception à cette règle et meurent rapidement pour des doses moindres (de l'ordre du gray) : les lymphocytes et les ovocytes.

On distingue :

- la mort par nécrose cellulaire, avec arrêt des fonctions cellulaires et cytolysse, observé en intercinérèse.
- L'apoptose ou mort génétiquement programmée, l'exécution de ce programme de mort cellulaire dépend de la présence de modérateurs intracellulaires parmi lesquels la protéine P53. Celle-ci régule également le blocage du cycle cellulaire après une agression et intervient directement dans le processus de réparation.

L'apoptose joue un rôle en radiopathologie, soit en venant en addition des « morts nécrotiques » soit par élimination de cellules porteuses d'anomalies viables après réparations fautive. Il s'agit alors d'un mécanisme de contrôle de la cancérisation.

La mort à l'occasion de la division cellulaire est la principale cause de mort cellulaire radioinduite. Cette mort mitotique se définit comme la perte irréversible de la capacité de prolifération de la cellule, elle est aussi appelée mort différée. Les cellules irradiées semblent normales du point de vue morphologique et fonctionnel. Ce n'est qu'au moment de la mitose que les lésions s'exprimeront, cela peut se produire lors de la première mitose ou après quelques mitoses efficaces, la mort cellulaire apparaîtra d'autant plus vite que les mitoses sont rapprochées. Le résultat est l'extinction de la lignée cellulaire issue de la cellule irradiée. On considère qu'il n'y a pas de mort mitotique quand la cellule lésée a pu franchir six divisions.

Cet effet des rayonnements ionisants sur les cellules tumorales peut être direct comme indirect. L'effet bystander (Figure 59) est un effet de proximité concernant les cellules voisines des cellules irradiées. Tout se passe comme si des signaux de dommage étaient transmis des cellules irradiées vers les cellules voisines. Les vecteurs de ces signaux sont très probablement des médiateurs chimiques.

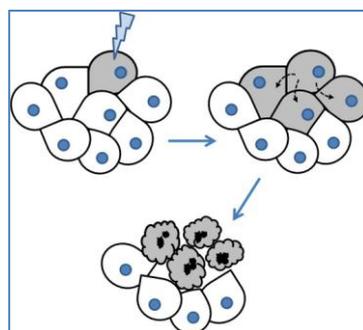


Figure 59 : Effet bystander

1. La transformation β^-

Elle est due à un excès de neutrons dans le noyau. Ce dernier donne un proton, un électron appelé β^- et un antineutrino. L'émission β^- est utilisée pour la thérapeutique car l'énergie transférée à la matière est élevée et le parcours dans la matière est faible, irradiant donc juste la zone ciblée. Le parcours de la particule dépend de son énergie.

Pour la radio immunothérapie les radionucléides utilisés sont l'iode 131 (^{131}I) ou l'yttrium 90 (^{90}Y) pour des raisons essentiellement liées à la facilité de production, leur chimie, l'aspect sécuritaire et dosimétrique et surtout les caractéristiques physiques telles que leur période et leur énergie (Tableau 10).

| | <i>Iode 131</i> | <i>Yttrium 90</i> |
|--------------------------------------|---------------------|-------------------|
| <i>Conjugaison</i> | Iodation directe | Chélation |
| <i>Type de radiation</i> | β et γ | β pur |
| <i>Emission β</i> | 0,8 Mev | 2,3 Mev |
| <i>Demi-vie (physique)</i> | 8 jours | 2,3 jours |
| <i>Distance de diffusion in-vivo</i> | 0,8 mm | 5,3 mm |
| <i>Distribution dans l'organisme</i> | Thyroïde | Os |

Tableau 10: Tableau comparatif entre l' ^{131}I et l' ^{90}Y

Dans le contexte du myélome, le seul avantage d'utilisation de l'iode semble être la technique de marquage, bien connue. L' ^{131}I va se lier de façon covalente aux résidus tyrosine du fragment Fc de l'anticorps. Cependant l'amélioration des techniques de radiomarquage et l'utilisation de groupes chélateurs de métaux ont permis d'utiliser d'autres radionucléides potentiellement utiles comme l' ^{90}Y .

L' ^{90}Y possède les avantages suivants par rapport à l' ^{131}I :

- Les particules β^- de l' ^{90}Y émises au niveau de la tumeur sont de plus forte énergie (2,3 Mev pour l' ^{90}Y par rapport au 0,8 Mev pour l'iode 131)(Krasner and Joyce 2001). Le parcours dans la matière est donc plus long. En effet, la distance où 90 % de l'énergie émise est absorbée est égale à 5,3 mm pour l' ^{90}Y par rapport à 0,8 mm pour l' ^{131}I . L' ^{90}Y produit un effet de «feux croisés » au cours duquel les cellules tumorales inaccessibles aux anticorps sont détruites par le rayonnement bêta émis par l'anticorps marqué, fixé sur d'autres cellules à proximité (Berger 1971).

- La demi-vie plus courte de l' ^{90}Y (64 heures, par rapport à 192 heures pour l' ^{131}I) est comparable à la demi-vie biologique de l'anticorps radiomarqué et limite ainsi la toxicité des isotopes libres circulants vis-à-vis des tissus sains.

- L' ^{90}Y est un émetteur β^- pur, il n'y a donc pas d'émission γ , ce qui permet son utilisation en hôpital de jour.

- L'émission de rayonnement γ par l'iode 131 peut exposer l'entourage du patient. Elle nécessite donc d'hospitaliser les patients parfois dans des services spécialisés équipés de systèmes de protection, adaptés aux rayonnements γ .

Dans une étude récente, quatre patients en rechute après 3 lignes de traitement ont subi une radio-immunothérapie utilisant l'anti CD138 marqué à l'iode 131, un des patients sur quatre a montré une réponse partielle. La distribution de l'anticorps marqué dans les cellules tumorales a été mise en évidence dans les minutes qui ont suivi l'injection. En ce qui concerne les organes sains, une captation hépatique non négligeable a été observée avec 50 % de la dose injectée à 90 minutes, qui peut être liée à l'expression du CD138 sur les hépatocytes. (Rousseau et al. 2012).

2. La transformation α

Elle ne se rencontre que pour des noyaux lourds dont le nombre de charge est supérieur à 52. Elle est due à l'émission d'un noyau d'hélium.

Les émetteurs alpha ont un caractère destructeur puissant du fait de la taille de la particule éjectée. Cette taille limite également la zone d'interaction avec les cellules voisines. Quelques dixièmes de millimètres de matières suffisent à arrêter ce rayonnement. La particule α a donc un profil idéal pour être utilisée dans la destruction des cellules cancéreuses. On parlera d'alphathérapie ou d'alpha-immunothérapie.

Si les radio-isotopes émetteurs β^- utilisés actuellement en radio-immunothérapie sont bien adaptés à des tumeurs de quelques millimètres de diamètre, cela n'est pas nécessairement le cas pour les nodules tumoraux contenant seulement quelques cellules. En effet, le rayonnement β^- de type particulaire a un parcours limité de l'ordre du millimètre pour l' ^{131}I et du centimètre pour l' ^{90}Y . Les particules alpha ont la caractéristique d'avoir un parcours beaucoup plus petit. L'énergie transférée à la matière est plus de 100 fois plus élevée que celui du rayonnement particulaire β^- . Elles ont en conséquence une cytotoxicité beaucoup plus élevée que celle des particules β^- . Pour une cible tumorale de 1 mm de diamètre fixant

de façon homogène le radio-immunoconjugué, il suffit d'une seule particule alpha (au lieu de 3 500 particules β^-) pour délivrer une dose qui détruit 63 % des cellules tumorales. (Geerlings 1993). L'irradiation de cibles tumorales microscopiques par des particules alpha est donc beaucoup plus efficace en termes de cytotoxicité que l'irradiation par des particules β^- . Pourtant, les applications médicales sont limitées par les caractéristiques radiophysiques des radionucléides émetteurs alpha disponibles.

A L'heure actuelle la littérature reste encore pauvre concernant l'immuno-alpha-thérapie. Les travaux prometteurs portent essentiellement sur le bismuth 213. L'efficacité de l'alpha radioimmunothérapie a été évaluée in vitro sur des cellules de myélome ciblées avec un anticorps monoclonal anti CD138 couplé au ^{213}Bi et semble obtenir de bons résultats, jusqu'à 40% des cellules ont été retrouvées mortes par apoptose (Couturier et al. 1999). Le bismuth 213 a une période physique courte de 46 min, ce qui impose un marquage rapide de l'immunoconjugué et une distribution également rapide du radio-immunoconjugué après son injection intraveineuse. Les cellules tumorales du myélome, étant localisées dans la moelle osseuse, il sera possible de les cibler facilement avec des anticorps marqués au ^{213}Bi . Une étude in vivo sur un modèle murin a montré que le CD138 marqué au ^{213}Bi avait une efficacité thérapeutique prometteuse pour la prise en charge de la maladie résiduelle du MM, avec une toxicité hématologique transitoire modérée et passagère en termes de radio immunothérapie. De plus la décroissance rapide du ^{213}Bi limite sa diffusion via la circulation sanguine ce qui explique une moindre toxicité hépatique (Chérel et al. 2013).

La RIT est donc une approche intéressante mais la taille de l'anticorps et la distribution hépatique sont responsables d'une irradiation des organes sains. Le développement de méthodes de préciblage est donc essentiel pour mieux cibler la tumeur et diminuer le bruit de fond ainsi que l'irradiation des tissus sains.

2) La PRIT : radio immunothérapie pré ciblée (Frampas et al. 2013)

La radio immunothérapie pré ciblée (PRIT) est une approche prometteuse qui consiste à découpler le transport de l'anticorps spécifique de la tumeur et la distribution du radionucléide. Il en résulte un rapport beaucoup plus élevé dans la tumeur que dans le tissu sain, ce qui est favorable pour la thérapie et l'imagerie.

De nombreuses approches ont été proposées, trois modèles sont retenus :

- Le système de reconnaissance biotine-avidine/streptavidine

- Les anticorps bi-spécifiques anti-tumeur et anti-haptène
- Le système de liaison ADN/ADNc

Cette technique est basée sur des éléments immuno-conjugués bi-spécifiques, ils vont se lier à l'antigène cible mais aussi à une petite molécule qui va apporter le radionucléide. Cette dernière molécule doit être de petite taille afin de se distribuer rapidement et de se lier à l'anticorps préciblé (modifié pour cette liaison). La petite taille de la molécule marquée lui permet également d'être éliminée rapidement de la circulation.

(a) Le système de reconnaissance biotine-avidine/streptavidine

Dans un premier temps, on injecte l'anticorps spécifique de la cible tumorale lié à la biotine. Ce complexe se distribue dans tout l'organisme et se dirige lentement vers les cellules tumorales. En raison de la grande taille du conjugué Ac-biotine, ce dernier est présent dans la circulation sanguine pendant plusieurs jours, il est donc nécessaire de l'éliminer avant l'injection de la biotine radiomarquée. Un ou deux jours plus tard, on injecte donc l'avidine (protéine basique à pH neutre, tétravalente, PM 66000 Da extraite de l'oeuf) qui possède une forte affinité pour la biotine (liaison non covalente). L'avidine glycosylée rapidement éliminée par le foie, entraînent avec elle le complexe Ac-biotine en excès dans le compartiment sanguin. La liaison biotine-avidine se faisant beaucoup plus rapidement que la liaison anticorps-antigène, il faut attendre quelques jours avant de procéder à l'injection. Puis, trente minutes plus tard, la streptavidine (protéine de PM 60000 Da extraite des streptocoques) est injectée atteignant la tumeur et se liant avec une grande affinité pour la biotine liée à l'anticorps. Enfin, lorsque la concentration de l'anticorps dans la tumeur est à son maximum et beaucoup plus élevée que dans les organes sains, le radionucléide lié à une molécule de biotine est injectée rapidement et atteint la tumeur où spécifiquement elle se lie à l'anticorps pré-localisée.

Cette technique permet donc de concentrer la radioactivité au niveau de la tumeur et de diminuer l'exposition des tissus sains (Figure 60).

La PRIT a été évaluée chez un modèle murin de myélome. Pour cela, un anti CD38 a été utilisé avec le système de préciblage streptavidine/biotine et l'⁹⁰Y comme radio-isotope. Les résultats ont montré un ratio tumeur sur sang de 638:1, vingt-quatre heures après la PRIT,

contre 1:1 après une RIT sans méthode de préciblage. 100 % des animaux étaient en rémission sept jours après (Green et al. 2014).

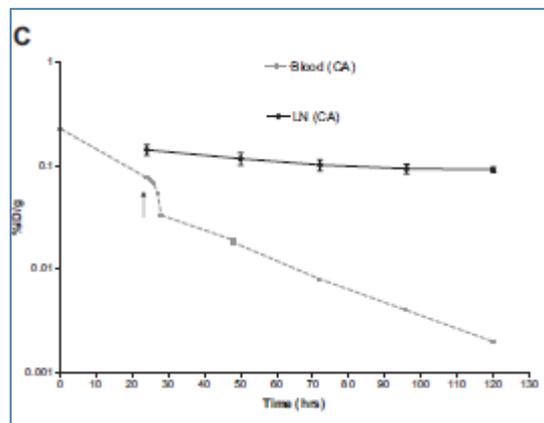


Figure 60 : L'Effet d'un agent de clairance sanguine
CA : Clearing Agent
LN : nodule lymphoïde
%ID/g :taux d'¹¹¹Indium-DOTA-biotin/g de tissu

(b) Les anticorps bi-spécifiques anti-tumeur et anti-haptène.

Cette méthode alternative consiste à injecter tout d'abord un anticorps bispécifique non marqué. Quelques jours plus tard un haptène bivalent radio marqué est injecté, il se lie rapidement à cet anticorps pré localisé. Dans ce système, l'affinité de l'haptène est limitée. Il se lie avec avidité à l'Ac lié à la surface des cellules tumorales tandis que les complexes Ac-haptène dans la circulation sanguine sont éliminés par filtration rénale. La dosimétrie à la tumeur est supérieure à celle du compartiment sanguin.

Le préciblage par l'intermédiaire d'anticorps monoclonaux bispécifiques (anti-tumeur, anti-haptène) et d'haptènes bivalents radioactifs améliore la distribution tumorale de l'isotope. Il augmente donc les performances de la radio immunoscintigraphie et de la radio immunothérapie.

(c) Le système de liaison ADN/ADNc

Ce système de préciblage est basé sur l'interaction de très haute affinité d'oligonucléotides complémentaires. Leur sensibilité aux nucléases hydrolysant les fonctions phosphodiester limitait leur utilisation. Depuis les MORFs sont apparus, des oligomères morphilino phosphorodiamidate, des analogues d'ADN synthétique soluble dans l'eau, stable aux nucléases et hautement spécifiques de son MORF complémentaire (Liu et al. 2002). Plusieurs

études précliniques ont été réalisées avec le ^{188}Rh (Liu, Dou, Baker, et al. 2010) et le ^{90}Y (Liu et al. 2011) et tendent à confirmer l'intérêt de cette méthode de préciblage, avec des ratios élevés tumeur/tissu. Malheureusement aucune étude clinique n'est en cours.

Dans un premier temps, l'anticorps d'intérêt est conjugué avec un MORF puis est injecté. Puis le MORF complémentaire couplé au radioélément via un chélate comme le DTPA est administré après avoir laissé le temps au complexe de s'épurer de la circulation sanguine. Ce MORFc va donc aller s'hybrider au MORF greffé à l'anticorps permettant une concentration de l'activité dans la tumeur (Liu et al. 2002). Des systèmes de préciblage dérivant des différentes méthodes à la fois ont aussi été testés. Dans un article de 2010, l'anticorps a été couplé à la biotine et au MORF. Un jour plus tard, l'avidine a permis une épuration rapide des complexes encore dans la circulation sanguine. Enfin trois heures plus tard, le MORFc marqué a été injecté. Ce dernier va alors s'hybrider sur la tumeur préciblée. En plus de la réduction du bruit de fond attendu par cette méthode, une activité importante a été conservée au niveau de la tumeur (Liu, Dou, Chen, et al. 2010).

Le préciblage a donc un rôle important pour augmenter considérablement l'activité du radio-isotope dans le tissu cible et épargner les tissus sains. Par l'intermédiaire de polymères conjugués à ces MORFS une amplification de l'efficacité de ce préciblage semble possible (Chen et al. 2008). Par ailleurs une amélioration importante de l'affinité d'un MORF bivalent sur son équivalent monovalent a été rapportée. Enfin, un des avantages de l'utilisation de ces oligomères est aussi la facilité avec laquelle ces effecteurs peuvent être construits et la facilité avec laquelle la dimension moléculaire séparant les sites de liaison peut être raccourci ou allongée (He et al. 2010). En fonction de la localisation et de la taille de la tumeur, ces systèmes peuvent donc être ajustés pour une meilleure pharmacocinétique possible.

La PRIT est donc une technique très prometteuse mais complexe. Elle évolue en permanence avec la recherche de nouvelles constructions moléculaires et le développement de la radiochimie. La pharmacocinétique ainsi obtenue améliore la dosimétrie du patient en fonction des radionucléides.

CONCLUSION

Le myélome est la deuxième hémopathie après les lymphomes. Malgré les progrès réalisés en thérapeutique, cette pathologie tumorale reste encore incurable. Son diagnostic est souvent posé de manière tardive. Effectivement il n'existe pas de signes précoces spécifiques de cette maladie. En effet, si l'on s'intéresse à l'imagerie du myélome, le diagnostic repose sur la radiographie du squelette, restant le gold standard, même si le scanner corps entier semble pouvoir la remplacer. De même, l'IRM du rachis lombaire est incluse dans les recommandations de consensus 2009 de cette hémopathie. Des images radiographiques du crâne et des côtes doivent tout de même être effectuées si l'on opte pour ces techniques modernes d'imagerie.

Pour le suivi du traitement, la TEP/CT au [^{18}F]FDG et l'IRM ont montré leur efficacité. Comme nous l'avons vu, la sensibilité de la TEP/CT au [^{18}F]FDG pourrait prédire très précocement la réponse au traitement. Bien que cette méthode soit très sensible, elle n'est malheureusement pas spécifique du myélome. De plus, la consommation du [^{18}F]FDG est augmentée dans les régions inflammatoires ainsi qu'au niveau des sites infectieux, deux situations fréquentes chez les patients atteints de myélome. Par conséquent, le développement d'un traceur diagnostique plus spécifique du myélome est très intéressant. Au cours de ce travail, nous avons essayé de montrer l'intérêt grandissant de l'imagerie moléculaire isotopique dans le développement de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques en oncologie. Le myélome multiple semble particulièrement candidat pour ce concept. Le radio marquage d'anticorps monoclonaux au zirconium 89, dirigés spécifiquement contre des marqueurs membranaires des plasmocytes tumoraux, est une approche à visée diagnostique. Ce radioélément, émetteur β^+ , est particulièrement intéressant car il est utilisé en imagerie TEP, méthode d'imagerie actuellement parmi les plus sensibles notamment lorsqu'elle est couplée au CT. De plus, sa période radioactive est compatible avec la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux. Cette approche nous semble donc particulièrement adaptée à la détection de la maladie résiduelle.

D'autre part, l'approche de théranostic développée dans ce travail, permet de montrer qu'il est possible de marquer un anticorps avec un isotope radioactif émetteur β^+ pour le

diagnostic afin d'identifier les patients éligibles à une radio immunothérapie. Puis, avec ce même anticorps, on remplace l'isotope radioactif de diagnostic par un radioélément émetteur β^- ou α pour une prise en charge thérapeutique individualisée du patient.

Ces nouveaux traceurs immunoTEP ouvrent la voie de l'imagerie moléculaire spécifique de la cellule tumorale qui semble extrêmement prometteuse pour le diagnostic, le suivi et l'évaluation de la maladie résiduelle d'un patient. Il semble donc possible, dans un avenir proche, de réaliser une imagerie diagnostique sensible et spécifique ainsi qu'une thérapie ciblée sur la cellule tumorale avec une même molécule.

Références bibliographiques

- ANSM. 2011. "RCP ELUMATIC 2-50 GBq Générateur Radiopharmaceutique."
- Avet-Loiseau, et al. 2007. "Genetic Abnormalities and Survival in Multiple Myeloma: The Experience of the Intergroupe Francophone Du Myélome." *Blood* 109 (8): 3489–95.
- Avet-Loiseau, et al. 2002. "Oncogenesis of Multiple Myeloma: 14q32 and 13q Chromosomal Abnormalities Are Not Randomly Distributed, but Correlate with Natural History, Immunological Features, and Clinical Presentation." *Blood* 99 (6): 2185–91.
- Bartel, et al. 2009. "F18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography in the Context of Other Imaging Techniques and Prognostic Factors in Multiple Myeloma." *Blood* 114 (10): 2068–76.
- Bataille, R, J Grenier, and J Sany. 1984. "Beta-2-Microglobulin in Myeloma: Optimal Use for Staging, Prognosis, and Treatment--a Prospective Study of 160 Patients." *Blood* 63 (2): 468–76.
- Bataille, et al. 2006. "The Phenotype of Normal, Reactive and Malignant Plasma Cells. Identification of 'Many and Multiple Myelomas' and of New Targets for Myeloma Therapy." *Haematologica* 91 (9): 1234–40.
- Baur, et al. 2002. "Magnetic Resonance Imaging as a Supplement for the Clinical Staging System of Durie and Salmon?" *Cancer* 95 (6): 1334–45.
- Berdeja, Jesus G. 2014. "Lorvotuzumab Mertansine: Antibody-Drug-Conjugate for CD56+ Multiple Myeloma." *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 19: 163–70.
- Berger, M J. 1971. "Distribution of Absorbed Dose around Point Sources of Electrons and Beta Particles in Water and Other Media." *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, March, Suppl 5:5–23.
- Bergsagel, et al. 1996. "Promiscuous Translocations into Immunoglobulin Heavy Chain Switch Regions in Multiple Myeloma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (24): 13931–36.
- Bruno, et al. 2005. "Novel Targeted Drugs for the Treatment of Multiple Myeloma: From Bench to Bedside." *Leukemia* 19 (10): 1729–38.
- Chatal, J F, P Peltier, M Bardiès, A Chétanneau, P Thedrez, A Faivre-Chauvet, and J F Gestin. 1992. "Does Immunoscintigraphy Serve Clinical Needs Effectively? Is There a Future for Radioimmunotherapy?" *European Journal of Nuclear Medicine* 19 (3): 205–13.
- Chen, et al. 2008. "Synthesis and in Vitro Characterization of a Dendrimer-MORF Conjugate for Amplification Pretargeting." *Bioconjugate Chemistry* 19 (8): 1518–25.
- Chérel, et al. 2013. "213Bi Radioimmunotherapy with an Anti-mCD138 Monoclonal Antibody in a Murine Model of Multiple Myeloma." *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 54 (9): 1597–1604.
- Collins, et al. 2013. "Elotuzumab Directly Enhances NK Cell Cytotoxicity against Myeloma via CS1 Ligation: Evidence for Augmented NK Cell Function Complementing ADCC." *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 62 (12): 1841–49.
- Corre, J. et al. 2012. "Bioactivity and Prognostic Significance of Growth Differentiation Factor GDF15 Secreted by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma." *Cancer Research* 72 (6): 1395–1406.
- Couturier, et al. 1999. "Validation of 213Bi-Alpha Radioimmunotherapy for Multiple Myeloma." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 5 (10 Suppl): 3165s–3170s.

- "CR2011-Fr_b2.pdf." 2014. Accessed April 2. http://myeloma.org/pdfs/CR2011-Fr_b2.pdf.
- De Bie, S H, T C Ferreira, E K Pauwels, and F J Cleton. 1992. "Immunoscintigraphy for Cancer Detection: 'A Thousand Ills Require a Thousand Cures.'" *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 118 (1): 1–15.
- Delmon-Moingeon, et al. 1990. "Uptake of the Cation hexakis(2-Methoxyisobutylisonitrile)-Technetium-99m by Human Carcinoma Cell Lines in Vitro." *Cancer Research* 50 (7): 2198–2202.
- Delorme, Stefan, and Andrea Baur-Melnyk. 2011. "Imaging in Multiple Myeloma." *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progrès Dans Les Recherches Sur Le Cancer* 183: 133–47.
- Deri, Melissa A, Brian M Zeglis, Lynn C Francesconi, and Jason S Lewis. 2013. "PET Imaging with ⁸⁹Zr: From Radiochemistry to the Clinic." *Nuclear Medicine and Biology* 40 (1): 3–14.
- Dimopoulos, et al. 2009. "International Myeloma Working Group Consensus Statement and Guidelines Regarding the Current Role of Imaging Techniques in the Diagnosis and Monitoring of Multiple Myeloma." *Leukemia* 23 (9): 1545–56.
- Durie, B G, and S E Salmon. 1975. "A Clinical Staging System for Multiple Myeloma. Correlation of Measured Myeloma Cell Mass with Presenting Clinical Features, Response to Treatment, and Survival." *Cancer* 36 (3): 842–54.
- Durie, Brian G M. 2006. "The Role of Anatomic and Functional Staging in Myeloma: Description of Durie/Salmon plus Staging System." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 42 (11): 1539–43.
- Durie, Brian G M, Alan D Waxman, Allesandro D'Agnolo, and Cindy M Williams. 2002. "Whole-Body (18)F-FDG PET Identifies High-Risk Myeloma." *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 43 (11): 1457–63.
- Even-Sapir, Einat, Eyal Mishani, Gideon Flusser, and Ur Metser. 2007. "18F-Fluoride Positron Emission Tomography and Positron Emission Tomography/computed Tomography." *Seminars in Nuclear Medicine* 37 (6): 462–69.
- Facon, et al. 2001. "Chromosome 13 Abnormalities Identified by FISH Analysis and Serum beta2-Microglobulin Produce a Powerful Myeloma Staging System for Patients Receiving High-Dose Therapy." *Blood* 97 (6): 1566–71.
- Fechtner, Kerstin, Jens Hillengass, Stefan Delorme, Christiane Heiss, Kai Neben, Hartmut Goldschmidt, Hans-Ulrich Kauczor, and Marc-André Weber. 2010. "Staging Monoclonal Plasma Cell Disease: Comparison of the Durie-Salmon and the Durie-Salmon PLUS Staging Systems." *Radiology* 257 (1): 195–204.
- Florent Cachin. 2006. "Evaluation de La Réponse Thérapeutique En Cancérologie: Place de L'imagerie Isotopique."
- Fonseca, Rafael, Bart Barlogie, Regis Bataille, Christian Bastard, P Leif Bergsagel, Marta Chesi, Faith E Davies, et al. 2004. "Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report." *Cancer Research* 64 (4): 1546–58.
- Fonti, et al. 2008. "18F-FDG PET/CT, 99mTc-MIBI, and MRI in Evaluation of Patients with Multiple Myeloma." *Journal of Nuclear Medicine* 49 (2): 195–200.
- Frampas et al. 2013. "Improvement of Radioimmunotherapy Using Pretargeting." *Frontiers in Oncology* 3: 159.
- Geerlings, M W. 1993. "Radionuclides for Radioimmunotherapy: Criteria for Selection." *The International Journal of Biological Markers* 8 (3): 180–86.

- Green, et al. 2014. "A Preclinical Model of CD38-Pretargeted Radioimmunotherapy for Plasma Cell Malignancies." *Cancer Research* 74 (4): 1179–89.
- Hallek, M, P L Bergsagel, and K C Anderson. 1998. "Multiple Myeloma: Increasing Evidence for a Multistep Transformation Process." *Blood* 91 (1): 3–21.
- Harousseau, Jean-Luc. 2009. "Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Multiple Myeloma." *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 7 (9): 961–70.
- HAS. 2010. "Tumeur Maligne, Affection Maligne Du Tissu Lymphatique Ou Hématopoïétique : Myélome Multiple."
- Hawkins, et al. 1992. "Evaluation of the Skeletal Kinetics of Fluorine-18-Fluoride Ion with PET." *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 33 (5): 633–42.
- He, Jiang, Yi Wang, Shuping Dou, Xinrong Liu, Surong Zhang, Guozheng Liu, and Donald Hnatowich. 2010. "Affinity Enhancement Pretargeting: Synthesis and Testing of a ^{99m}Tc-Labeled Bivalent MORF." *Molecular Pharmaceutics* 7 (4): 1118–24.
- Hwang, William Ying Khee, and Jefferson Foote. 2005. "Immunogenicity of Engineered Antibodies." *Methods (San Diego, Calif.)* 36 (1): 3–10.
- IRSN. 2012. "Doses Délivrées Aux Patients En Scanographie et En Radiologie Conventionnelle Rapport DRPH/SER n°2010!12."
- Ivančević, V, C Perka, O Hasart, D Sandroock, D L Munz, and V Ivanèeviae. 2002. "Imaging of Low-Grade Bone Infection with a Technetium-99m Labelled Monoclonal Anti-NCA-90 Fab' Fragment in Patients with Previous Joint Surgery." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 29 (4): 547–51.
- Kelloff, et al. 2005. "The Progress and Promise of Molecular Imaging Probes in Oncologic Drug Development." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (22): 7967–85.
- Köhler, G, and C Milstein. 1975. "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity." *Nature* 256 (5517): 495–97.
- Krasner, C, and R M Joyce. 2001. "Zevalin: ⁹⁰yttrium Labeled Anti-CD20 (ibritumomab Tiuxetan), a New Treatment for Non-Hodgkin's Lymphoma." *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2 (4): 341–49.
- Kuipers, et al. 1999. "Fluorescence in Situ Hybridization Analysis Shows the Frequent Occurrence of 14q32.3 Rearrangements with Involvement of Immunoglobulin Switch Regions in Myeloma Cell Lines." *Cancer Genetics and Cytogenetics* 109 (2): 99–107.
- Liu, et al. 2010. "A Preclinical ¹⁸⁸Re Tumor Therapeutic Investigation Using MORF/cMORF Pretargeting and an antiTAG-72 Antibody CC49." *Cancer Biology & Therapy* 10 (8): 767–74.
- Liu, et al. 2010. "Adding a Clearing Agent to Pretargeting Does Not Lower the Tumor Accumulation of the Effector as Predicted." *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceutics* 25 (6): 757–62.
- Liu, et al. 2011. "⁹⁰Y Labeled Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer for Pretargeting Radiotherapy." *Bioconjugate Chemistry* 22 (12): 2539–45.
- Liu, et al. 2002. "Tumor Pretargeting in Mice Using (^{99m}Tc)-Labeled Morpholino, a DNA Analog." *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 43 (3): 384–91.

- Look, R M, S W Lim, A D Waxman, P K Gupta, M M Fuerst, D A Kusuanco, G N Lawrence, and F J Giles. 1996. "Technetium-99m Sestamibi Scanning in Multiple Myeloma Stem Cell Transplantation." *Leukemia & Lymphoma* 20 (5-6): 453–56.
- Mariette, et al. 1999. "Prognostic Value of Vertebral Lesions Detected by Magnetic Resonance Imaging in Patients with Stage I Multiple Myeloma." *British Journal of Haematology* 104 (4): 723–29.
- Meijs, et al. 1996. "A Facile Method for the Labeling of Proteins with Zirconium Isotopes." *Nuclear Medicine and Biology* 23 (4): 439–48.
- Morschhauser, et al. 2008. "Phase III Trial of Consolidation Therapy with Yttrium-90-Ibritumomab Tiuxetan Compared with No Additional Therapy after First Remission in Advanced Follicular Lymphoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (32): 5156–64.
- Narquin, et al. 2013. "Comparison of Whole-Body Diffusion MRI and Conventional Radiological Assessment in the Staging of Myeloma." *Diagnostic and Interventional Imaging* 94 (6): 629–36.
- Pene, Frédéric, Emilie Courtine, Alain Cariou, and Jean-Paul Mira. 2009. "Toward Theragnostics." *Critical Care Medicine* 37 (1 Suppl): S50–58.
- Perk, et al. 2010. "P-Isothiocyanatobenzyl-Desferrioxamine: A New Bifunctional Chelate for Facile Radiolabeling of Monoclonal Antibodies with Zirconium-89 for Immuno-PET Imaging." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 37 (2): 250–59.
- Piwnica-Worms, D, V V Rao, J F Kronauge, and J M Croop. 1995. "Characterization of Multidrug Resistance P-Glycoprotein Transport Function with an Organotechnetium Cation." *Biochemistry* 34 (38): 12210–20.
- Regelink, et al. 2013. "Comparison of Modern and Conventional Imaging Techniques in Establishing Multiple Myeloma-Related Bone Disease: A Systematic Review." *British Journal of Haematology* 162 (1): 50–61.
- Rosebrough, et al. 1988. "Thrombus Imaging with Indium-111 and Iodine-131-Labeled Fibrin-Specific Monoclonal Antibody and Its F(ab')₂ and Fab Fragments." *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 29 (7): 1212–22.
- Rousseau, et al. 2012. "Dosimetry Results Suggest Feasibility of Radioimmunotherapy Using Anti-CD138 (B-B4) Antibody in Multiple Myeloma Patients." *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 33 (3): 679–88.
- Schiepers, et al. 1997. "Fluoride Kinetics of the Axial Skeleton Measured in Vivo with Fluorine-18-Fluoride PET." *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 38 (12): 1970–76.
- Schroff, R W, K A Foon, S M Beatty, R K Oldham, and A C Morgan Jr. 1985. "Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy." *Cancer Research* 45 (2): 879–85.
- Schwochau, K, K H Linse, H J Steinmetz, and L Astheimer. 1993. "Preparation, Characterization and Biological Evaluation of Cationic ⁹⁹Tc/^{99m}Tc-Dioxime Complexes." *Nuclear Medicine and Biology* 20 (3): 317–24.
- Seaman, Marc E, Gianmarco Contino, Nabeel Bardeesy, and Kimberly A Kelly. 2010. "Molecular Imaging Agents: Impact on Diagnosis and Therapeutics in Oncology." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 12: e20.

- Severin, et al. 2011. "89Zr Radiochemistry for Positron Emission Tomography." *Medicinal Chemistry (Shāriqah (United Arab Emirates))* 7 (5): 389–94.
- Sfiridaki, et al. 2011. "Angiogenesis-Related Cytokines, RANKL, and Osteoprotegerin in Multiple Myeloma Patients in Relation to Clinical Features and Response to Treatment." *Mediators of Inflammation* 2011: 1–7.
- Silvestris, Franco, Paola Cafforio, Marco Tucci, and Franco Dammacco. 2002. "Negative Regulation of Erythroblast Maturation by Fas-L(+)/TRAIL(+) Highly Malignant Plasma Cells: A Major Pathogenetic Mechanism of Anemia in Multiple Myeloma." *Blood* 99 (4): 1305–13.
- Sommer, et al. 2011. "Signal Characteristics of Focal Bone Marrow Lesions in Patients with Multiple Myeloma Using Whole Body T1w-TSE, T2w-STIR and Diffusion-Weighted Imaging with Background Suppression." *European Radiology* 21 (4): 857–62.
- Tan, et al 2011. "Current and Future Imaging Modalities for Multiple Myeloma and Its Precursor States." *Leukemia & Lymphoma* 52 (9): 1630–40.
- Tanaka, Katsunori, and Koichi Fukase. 2008. "PET (positron Emission Tomography) Imaging of Biomolecules Using Metal-DOTA Complexes: A New Collaborative Challenge by Chemists, Biologists, and Physicians for Future Diagnostics and Exploration of in Vivo Dynamics." *Organic & Biomolecular Chemistry* 6 (5): 815–28.
- Van de Donk, Niels W C J, and Henk M Lokhorst. 2013. "New Developments in the Management and Treatment of Newly Diagnosed and Relapsed/refractory Multiple Myeloma Patients." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 14 (12): 1569–73.
- Van der Veer, et al. 2011. "The Therapeutic Human CD38 Antibody Daratumumab Improves the Anti-Myeloma Effect of Newly Emerging Multi-Drug Therapies." *Blood Cancer Journal* 1 (10): e41.
- Van Lammeren-Venema, et al. 2012. "18F-Fluoro-Deoxyglucose Positron Emission Tomography in Assessment of Myeloma-Related Bone Disease: A Systematic Review." *Cancer* 118 (8): 1971–81.
- Verel, et al. 2003. "89Zr Immuno-PET: Comprehensive Procedures for the Production of 89Zr-Labeled Monoclonal Antibodies." *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 44 (8): 1271–81.
- Walker, et al. 2012. "Imaging of Multiple Myeloma and Related Plasma Cell Dyscrasias." *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 53 (7): 1091–1101.
- Wuilleme, Intergroupe Francophone de Myélome, et al. 2005. "Ploidy, as Detected by Fluorescence in Situ Hybridization, Defines Different Subgroups in Multiple Myeloma." *Leukemia* 19 (2): 275–78.
- Yokota, T, D E Milenic, M Whitlow, and J Schlom. 1992. "Rapid Tumor Penetration of a Single-Chain Fv and Comparison with Other Immunoglobulin Forms." *Cancer Research* 52 (12): 3402–8.
- Zelenetz, A D. 1999. "Radioimmunotherapy for Lymphoma." *Current Opinion in Oncology* 11 (5): 375–80.
- Zhang, Yin, Hao Hong, and Weibo Cai. 2011. "PET Tracers Based on Zirconium-89." *Current Radiopharmaceuticals* 4 (2): 131–39.

Titre : Etude du myélome multiple au travers de l'imagerie médicale.

Résumé :

Le myélome multiple est la deuxième hémopathie maligne la plus fréquente. Elle est caractérisée par la prolifération d'un clone plasmocytaire infiltrant la moelle osseuse et la production excessive d'immunoglobulines monoclonales. C'est une pathologie qui reste encore incurable malgré les améliorations de la prise en charge. Le diagnostic et la stadification de cette maladie reposent sur la classification de Durie et Salmon composée par des critères biologiques et anatomiques avec la détection des lésions osseuses ostéolytiques par la radiographie du squelette, bien que ces dernières années les techniques d'imagerie modernes ont été de plus en plus explorées.

L'objectif de cette thèse a été de réaliser un état de l'art des différentes techniques d'imagerie pour le diagnostic, la stadification et le pronostic de la maladie. Alors que l'IRM semble être la meilleure approche diagnostique de la moelle osseuse, la TEP/CT au [¹⁸F] FDG (Tomography Emission Positron/Computed Tomography au [¹⁸F]fluorodeoxyglucose), une méthode d'imagerie à la fois moléculaire et anatomique, a l'avantage d'être sensible, surtout pour l'évaluation de la réponse au traitement. Elle est cependant peu spécifique du myélome. La mise au point de traceurs spécifiques de la cellule tumorale avec des techniques d'imagerie sensibles comme la TEP est donc un enjeu intéressant pour suivre l'évolution du plasmocyte malin. Pour cela, les anticorps sont les molécules de choix, ils peuvent être complexés avec des isotopes radioactifs tels que le zirconium 89 (émetteur β^+ , diagnostic) ou l'yttrium 90 (émetteur β^- , thérapie). Cette approche diagnostique permettrait une détection sensible et spécifique des lésions actives et de la maladie résiduelle. De plus, l'imagerie immunoTEP permettrait de distinguer les patients éligibles à une radioimmunothérapie (RIT), utilisant cet anticorps couplé à un émetteur β^- . Grâce à la RIT préciblée, une prise en charge individualisée des patients deviendrait alors possible.

Titre en anglais : The study of multiple myeloma through medical imaging

Mots-clés : myélome multiple, imagerie moléculaire, radiomarquage, anticorps, zirconium 89, immunoTEP

Discipline : Pharmacie

UFR des sciences pharmaceutiques
UNIVERSITE de Bordeaux