# Marquage d'un anticorps au Zirconium 89 pour la détection des lymphomes

Lesly Fellous

▶ **To cite this version:**

Lesly Fellous. Marquage d'un anticorps au Zirconium 89 pour la détection des lymphomes. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01146760

**HAL Id: dumas-01146760**

**https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01146760**

Submitted on 16 Jun 2015

**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.

**UNIVERSITE DE ROUEN**

**UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**

Année 2014 N°

# THESE

**pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le

par

*Fellous Lesly*

# *Marquage d'un anticorps au Zirconium 89 pour la détection des lymphomes*

Président du jury : Bohn, Pierre, *docteur en pharmacie*

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2014 - 2015**

**U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN**

**----------**

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESSEURS : **Professeur Michel GUERBET**

**Professeur Benoit VEBER**

**Professeur Pascal JOLY**

**Professeur Stéphane MARRET**

I - **MEDECINE**

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

| | | |
|---|---|---|
| Mr Frédéric **ANSELME** | HCN | Cardiologie |
| Mme Isabelle **AUQUIT AUCKBUR** | HCN | Chirurgie plastique |
| Mr Bruno **BACHY** *(surnombre)* | HCN | Chirurgie pédiatrique |
| Mr Fabrice **BAUER** | HCN | Cardiologie |
| Mme Soumeya **BEKRI** | HCN | Biochimie et biologie moléculaire |
| Mr Jacques **BENICHOU** | HCN | Bio statistiques et informatique médicale |
| Mr Jean-Paul **BESSOU** | HCN | Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire |
| Mme Françoise **BEURET-BLANQUART** *(surnombre)* | HCN | Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité |
| Mr Guy **BONMARCHAND** (*surnombre)* | HCN | Réanimation médicale |
| Mr Olivier **BOYER** | UFR | Immunologie |
| Mr Jean-François **CAILLARD** *(surnombre)* | HCN | Médecine et santé au travail |
| Mr François **CARON** | HCN | Maladies infectieuses et tropicales |
| Mr Philippe **CHASSAGNE** | HCN | Médecine interne (gériatrie) |
| Mr Vincent **COMPERE** | HCN | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale |
| Mr Antoine **CUVELIER** | HB | Pneumologie |
| Mr Pierre **CZERNICHOW** | HCH | Epidémiologie, économie de la santé |
| Mr Jean-Nicolas **DACHER** | HCN | Radiologie et imagerie médicale |
| Mr Stéfan **DARMONI** | HCN | Informatique médicale et techniques de communication |
| Mr Pierre **DECHELOTTE** | HCN | Nutrition |

| | | |
|---|---|---|
| Mme Danièle **DEHESDIN** *(surnombre)* | HCN | Oto-rhino-laryngologie |
| Mr Frédéric **DI FIORE** | CB | Cancérologie |
| Mr Fabien **DOGUET** | HCN | Chirurgie Cardio Vasculaire |
| Mr Jean **DOUCET** | SJ | Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie |
| Mr Bernard **DUBRAY** | CB | Radiothérapie |
| Mr Philippe **DUCROTTE** | HCN | Hépato-gastro-entérologie |
| Mr Frank **DUJARDIN** | HCN | Chirurgie orthopédique - Traumatologique |
| Mr Fabrice **DUPARC** | HCN | Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| Mr Eric **DURAND** | HCN | Cardiologie |
| Mr Bertrand **DUREUIL** | HCN | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale |
| Mme Hélène **ELTCHANINOFF** | HCN | Cardiologie |
| Mr Thierry **FREBOURG** | UFR | Génétique |
| Mr Pierre **FREGER** | HCN | Anatomie - Neurochirurgie |
| Mr Jean François **GEHANNO** | HCN | Médecine et santé au travail |
| Mr Emmanuel **GERARDIN** | HCN | Imagerie médicale |
| Mme Priscille **GERARDIN** | HCN | Pédopsychiatrie |
| Mr Michel **GODIN** *(surnombre)* | HB | Néphrologie |
| M. Guillaume **GOURCEROL** | HCN | Physiologie |
| Mr Philippe **GRISE** *(surnombre)* | HCN | Urologie |
| Mr Olivier **GUILLIN** | HCN | Psychiatrie Adultes |
| Mr Didier **HANNEQUIN** | HCN | Neurologie |
| Mr Fabrice **JARDIN** | CB | Hématologie |
| Mr Luc-Marie **JOLY** | HCN | Médecine d'urgence |
| Mr Pascal **JOLY** | HCN | Dermato - Vénéréologie |
| Mme Annie **LAQUERRIERE** | HCN | Anatomie et cytologie pathologiques |
| Mr Vincent **LAUDENBACH** | HCN | Anesthésie et réanimation chirurgicale |
| Mr Xavier **LE LOET** | HCN | Rhumatologie |
| Mr Joël **LECHEVALLIER** | HCN | Chirurgie infantile |
| Mr Hervé **LEFEBVRE** | HB | Endocrinologie et maladies métaboliques |
| Mr Thierry **LEQUERRE** | HB | Rhumatologie |
| Mr Eric **LEREBOURS** | HCN | Nutrition |
| Mme Anne-Marie **LEROI** | HCN | Physiologie |
| Mr Hervé **LEVESQUE** | HB | Médecine interne |
| Mme Agnès **LIARD-ZMUDA** | HCN | Chirurgie Infantile |
| Mr Pierre Yves **LITZLER** | HCN | Chirurgie cardiaque |
| Mr Bertrand **MACE** | HCN | Histologie, embryologie, cytogénétique |
| M. David **MALTETE** | HCN | Neurologie |
| Mr Christophe **MARGUET** | HCN | Pédiatrie |

| | | |
|---|---|---|
| Mme Isabelle **MARIE** | HB | Médecine interne |
| Mr Jean-Paul **MARIE** | HCN | Oto-rhino-laryngologie |
| Mr Loïc **MARPEAU** | HCN | Gynécologie - Obstétrique |
| Mr Stéphane **MARRET** | HCN | Pédiatrie |
| Mme Véronique **MERLE** | HCN | Epidémiologie |
| Mr Pierre **MICHEL** | HCN | Hépato-gastro-entérologie |
| Mr Bruno **MIHOUT** *(surnombre)* | HCN | Neurologie |
| Mr Jean-François **MUIR** | HB | Pneumologie |
| Mr Marc **MURAINE** | HCN | Ophtalmologie |
| Mr Philippe **MUSETTE** | HCN | Dermatologie - Vénéréologie |
| Mr Christophe **PEILLON** | HCN | Chirurgie générale |
| Mr Jean-Marc **PERON** *(surnombre)* | HCN | Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale |
| Mr Christian **PFISTER** | HCN | Urologie |
| Mr Jean-Christophe **PLANTIER** | HCN | Bactériologie - Virologie |
| Mr Didier **PLISSONNIER** | HCN | Chirurgie vasculaire |
| Mr Bernard **PROUST** | HCN | Médecine légale |
| Mr François **PROUST** | HCN | Neurochirurgie |
| Mme Nathalie **RIVES** | HCN | Biologie du développement et de la reproduction |
| Mr Jean-Christophe **RICHARD** *(détachement)* | HCN | Réanimation médicale - Médecine d'urgence |
| Mr Horace **ROMAN** | HCN | Gynécologie - Obstétrique |
| Mr Jean-Christophe **SABOURIN** | HCN | Anatomie - Pathologie |
| Mr Guillaume **SAVOYE** | HCN | Hépato-gastrologie |
| Mme Céline **SAVOYE–COLLET** | HCN | Imagerie médicale |
| Mme Pascale **SCHNEIDER** | HCN | Pédiatrie |
| Mr Michel **SCOTTE** | HCN | Chirurgie digestive |
| Mme Fabienne **TAMION** | HCN | Thérapeutique |
| Mr Luc **THIBERVILLE** | HCN | Pneumologie |
| Mr Christian **THUILLEZ** | HB | Pharmacologie |
| Mr Hervé **TILLY** | CB | Hématologie et transfusion |
| Mr Jean-Jacques **TUECH** | HCN | Chirurgie digestive |
| Mr Jean-Pierre **VANNIER** | HCN | Pédiatrie génétique |
| Mr Benoît **VEBER** | HCN | Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale |
| Mr Pierre **VERA** | CB | Biophysique et traitement de l'image |
| Mr Eric **VERIN** | CRMPR | Médecine physique et de réadaptation |
| Mr Eric **VERSPYCK** | HCN | Gynécologie obstétrique |
| Mr Olivier **VITTECOQ** | HB | Rhumatologie |
| Mr Jacques **WEBER** | HCN | Physiologie |

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

| | | |
|---|---|---|
| Mme Noëlle **BARBIER-FREBOURG** | HCN | Bactériologie – Virologie |
| Mr Jeremy **BELLIEN** | HCN | Pharmacologie |
| Mme Carole **BRASSE LAGNEL** | HCN | Biochimie |
| Mme Valérie **BRIDOUX HUYBRECHTS** | HCN | Chirurgie Vasculaire |
| Mr Gérard **BUCHONNET** | HCN | Hématologie |
| Mme Mireille **CASTANET** | HCN | Pédiatrie |
| Mme Nathalie **CHASTAN** | HCN | Physiologie |
| Mme Sophie **CLAEYSSENS** | HCN | Biochimie et biologie moléculaire |
| Mr Moïse **COEFFIER** | HCN | Nutrition |
| Mr Stéphanie **DERREY** | HCN | Neurochirurgie |
| Mr Manuel **ETIENNE** | HCN | Maladies infectieuses et tropicales |
| Mr Serge **JACQUOT** | UFR | Immunologie |
| Mr Joël **LADNER** | HCN | Epidémiologie, économie de la santé |
| Mr Jean-Baptiste **LATOUCHE** | UFR | Biologie cellulaire |
| Mr Thomas **MOUREZ** | HCN | Bactériologie |
| Mr Jean-François **MENARD** | HCN | Biophysique |
| Mme Muriel **QUILLARD** | HCN | Biochimie et biologie moléculaire |
| Mr Vincent **RICHARD** | UFR | Pharmacologie |
| Mr Mathieu **SALAUN** | HCN | Pneumologie |
| Mme Pascale **SAUGIER-VEBER** | HCN | Génétique |
| Mme Anne-Claire **TOBENAS-DUJARDIN** | HCN | Anatomie |
| Mr Olivier **TROST** | HCN | Chirurgie Maxillo Faciale |

**PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE**

| | | |
|---|---|---|
| Mme Dominique **LANIEZ** | UFR | Anglais |
| Mr Thierry **WABLE** | UFR | Communication |

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

| | |
|---|---|
| Mr Thierry **BESSON** | Chimie Thérapeutique |
| Mr Jean-Jacques **BONNET** | Pharmacologie |
| Mr Roland **CAPRON** (PU-PH) | Biophysique |
| Mr Jean **COSTENTIN** (Professeur émérite) | Pharmacologie |
| Mme Isabelle **DUBUS** | Biochimie |
| Mr Loïc **FAVENNEC** (PU-PH) | Parasitologie |
| Mr Jean Pierre **GOULLE** | Toxicologie |
| Mr Michel **GUERBET** | Toxicologie |
| Mme Isabelle **LEROUX - NICOLLET** | Physiologie |
| Mme Christelle **MONTEIL** | Toxicologie |
| Mme Martine **PESTEL-CARON** (PU-PH) | Microbiologie |
| Mme Elisabeth **SEGUIN** | Pharmacognosie |
| Mr Rémi **VARIN** (PU-PH) | Pharmacie clinique |
| Mr Jean-Marie **VAUGEOIS** | Pharmacologie |
| Mr Philippe **VERITE** | Chimie analytique |

### MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|---|---|
| Mme Cécile **BARBOT** | Chimie Générale et Minérale |
| Mme Dominique **BOUCHER** | Pharmacologie |
| Mr Frédéric **BOUNOURE** | Pharmacie Galénique |
| Mr Abdeslam **CHAGRAOUI** | Physiologie |
| Mr Jean **CHASTANG** | Biomathématiques |
| Mme Marie Catherine **CONCE-CHEMTOB** | Législation pharmaceutique et économie de la santé |
| Mme Elizabeth **CHOSSON** | Botanique |
| Mme Cécile **CORBIERE** | Biochimie |
| Mr Eric **DITTMAR** | Biophysique |
| Mme Nathalie **DOURMAP** | Pharmacologie |
| Mme Isabelle **DUBUC** | Pharmacologie |
| Mr Abdelhakim **ELOMRI** | Pharmacognosie |

| | |
|---|---|
| Mr François **ESTOUR** | Chimie Organique |
| Mr Gilles **GARGALA** (MCU-PH) | Parasitologie |
| Mme Najla **GHARBI** | Chimie analytique |
| Mme Marie-Laure **GROULT** | Botanique |
| Mr Hervé **HUE** | Biophysique et mathématiques |
| Mme Laetitia **LE GOFF** | Parasitologie - Immunologie |
| Mme Hong **LU** | Biologie |
| Mme Sabine **MENAGER** | Chimie organique |
| Mr Mohamed **SKIBA** | Pharmacie galénique |
| Mme Malika **SKIBA** | Pharmacie galénique |
| Mme Christine **THARASSE** | Chimie thérapeutique |
| Mr Frédéric **ZIEGLER** | Biochimie |

**PROFESSEURS ASSOCIES**

| | |
|---|---|
| Mme Cécile **GUERARD-DETUNCQ** | Pharmacie officinale |
| Mr Jean-François **HOUIVET** | Pharmacie officinale |

**PROFESSEUR CERTIFIE**

| | |
|---|---|
| Mme Mathilde **GUERIN** | Anglais |

**ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE**

| | |
|---|---|
| Mr Jérémie **MARTINET** | Immunologie |
| Mme Sandrine **DAHYOT** | Bactériologie |

**ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

| | |
|---|---|
| Mr Romy **RAZAKANDRAINIBE** | Parasitologie |
| Mr François **HALLOUARD** | Galénique |
| Mme Caroline **LAUGEL** | Chimie organique |
| Mr Souleymane **ABDOUL-AZIZE** | Biochimie |
| Mme Maïté **NIEPCERON** | Microbiologie |

**LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES**

| | |
|---|---|
| Mme Cécile **BARBOT** | Chimie Générale et minérale |
| Mr Thierry **BESSON** | Chimie thérapeutique |
| Mr Roland **CAPRON** | Biophysique |
| Mr Jean **CHASTANG** | Mathématiques |
| Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB** | Législation et économie de la santé |
| Mme Elisabeth **CHOSSON** | Botanique |
| Mr Jean-Jacques **BONNET** | Pharmacodynamie |
| Mme Isabelle **DUBUS** | Biochimie |
| Mr Loïc **FAVENNEC** | Parasitologie |
| Mr Michel **GUERBET** | Toxicologie |
| Mr François **ESTOUR** | Chimie organique |
| Mme Isabelle **LEROUX-NICOLLET** | Physiologie |
| Mme Martine **PESTEL-CARON** | Microbiologie |
| Mme Elisabeth **SEGUIN** | Pharmacognosie |
| Mr Mohamed **SKIBA** | Pharmacie galénique |
| Mr Philippe **VERITE** | Chimie analytique |

## III – MEDECINE GENERALE

**PROFESSEUR**

| | | |
|---|---|---|
| Mr Jean-Loup **HERMIL** | UFR | Médecine générale |

**PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS**

| | | |
|---|---|---|
| Mr Emmanuel **LEFEBVRE** | UFR | Médecine Générale |
| Mr Alain **MERCIER** | UFR | Médecine générale |
| Mr Philippe **NGUYEN THANH** | UFR | Médecine générale |

**MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS**

| | | |
|---|---|---|
| Mr Pascal **BOULET** | UFR | Médecine générale |
| Mme Elisabeth **MAUVIARD** | UFR | Médecine générale |
| Mme Yveline **SEVRIN** | UFR | Médecine générale |
| Mme Marie Thérèse **THUEUX** | UFR | Médecine générale |

**ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS**

**PROFESSEURS**

| | |
|---|---|
| Mr Serguei **FETISSOV** (med) | Physiologie (ADEN) |
| Mr Paul **MULDER** (phar) | Sciences du Médicament |
| Mme Su **RUAN** (med) | Génie Informatique |

**MAITRES DE CONFERENCES**

| | |
|---|---|
| Mr Sahil **ADRIOUCH** (med) | Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905) |
| Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med) | Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079**)** |
| Mme Carine **CLEREN** (phar) | Neurosciences (Néovasc) |
| Mme Pascaline **GAILDRAT** (phar) | Génétique moléculaire humaine (UMR 1079) |
| Mr Nicolas **GUEROUT** (phar) | Chirurgie Expérimentale |
| Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med) | Physiologie (Unité Inserm 1076) |
| Mr Frédéric **PASQUET** | Sciences du langage, orthophonie |
| Mme Isabelle **TOURNIER** (phar) | Biochimie (UMR 1079) |

**CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS** : Mme Véronique **DELAFONTAINE**

| | |
|---|---|
| *HCN - Hôpital Charles Nicolle* | *HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME* |
| *CB - Centre Henri Becquerel* | *CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray* |
| *CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation* | *SJ – Saint Julien Rouen* |

# Sommaire

Objet de la thèse ..... 8
Introduction ..... 10
Matériels et Méthodes ..... 61
Résultats ..... 87
1-Rituximab ..... 88
2-Anti-TACI ..... 107
Discussion ..... 117
Conclusion ..... 121

# Liste des abréviations :

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

ABC : Activated B-cell like

ALCL : Anaplasic large-cell lymphoma

ALK : Anaplastic lymphoma kinase

ATCC : American Type Culture Collection

BCL2 : B-cell lymphoma 2 protein

BCL6 : B-cell lymphoma 6 protein

BSA : Albumine bovine sérique

CEA : Antigène carcynoembryonnaire

CHB : Centre Henri Becquerel

CPM : Coup Par Minute

CT-scanner : Computed Tomography-scanner

DD : Death Domain

DTT : Dithiothreitol

Df : Desferal

Df-Bz-NCS : p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine

DOTA : Acide tétra-azacyclododécane-tétra-acétique

DTPA : Acide diéthylène triamine penta acétique

EBV : Epstein Barr Virus

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting

FADD : Fas-associated death domain protein

FDA : Food and Drug Administration

FDG : Fluoro-Desoxy-Glucose

FI : Fraction immunoréactive

FOXP1 : Forkhead box protein P1

GCB : Germinal Center B-Cell like

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

IPI : Index Pronostique International

IRM : Imagerie par résonance magnétique

ITLC : Instant thin-layer chromatography

IKK : Inhibiteur de la Kinase κB

LDGCB : Lymphome Diffus à Grande Cellule B

LMO2 : LIM domain only 2

LNH : Lymphome non-Hodgkinien

LH : Lymphome de Hodgkin

MBq : Méga Becquerel

MUM1 : Multiple Myeloma oncogen 1

NK : Natural Killer

NF-κb : Nuclear Factor-kappa B

N-SucDf : N-succinyldesferrioxamine B

OMS : Organisation mondial de la santé

PBS : Phosphate Buffered Salin

PRC : Pureté Radiochimique

RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

REAL : Revised European American Lymphoma Classification

ROI : Régions d'interets

Rpm : Tour par minute

RT-MLPA : Reverse Transcriptase-Multiplex ligation-dependent probe amplification

SATA : N-succinimidyl-S-acetylthioacetate

SCFV : Single-chain-Fragment-variable

SMCC : Succinimidyl-4-N-maleimidomethyl cyclohexane-1-carboxylate

SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography

TEP : Tomographie par émissions de positons

TIM : TRAF-interacting motifs

TNF : Tumor necrosis factor

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor

TRAIL : TNF-related-apoptosis-inducing ligand

TRADD : TNF-receptor-associated death domain protein

TRAFs : TNFR-receptor-associated factor

VH : Variable de chaîne lourde (Height)

VL : Variable de chaîne légère (Light)

WB : Western Blot

# Liste des tableaux :

Tableau 1 : Classification des différents types de lymphomes malins selon la classification de l'OMS (2008). . . . . .13
Tableau 2 : Avantages et des inconvénients pour les différentes formes d'Ac. . . . . 45
Tableau 3 : Données physique de $^{89}$Zr. . . . . 47
Tableau 4 : Analyse spectrométrie gamma du $^{89}$Zr. . . . . .48
Tableau 5 : Données physiques de $^{124}$I. . . . . 49
Tableau 6 : Etudes précliniques recensées par Vosjan de 2003 à 2012. . . . . 52
Tableau 7 : Etudes cliniques recensées par Vosjan de 2006 à 2012. . . . . .52
Tableau 8 : Comparatif des deux méthodes. . . . . 59
Tableau 9: Taux de viabilité et concentration moyenne des différentes lignées cellulaires. . .88
Tableau 10 : Concentration moyenne des lignées cellulaires. . . . . .92
Tableau 11 : Concentration moyenne des lignées cellulaires. . . . . .107

# Liste des figures :

Figure 1 : Répartition en % des différents types de lymphomes non hodgkiniens en France. 16
Figure 2 : Représentation des différents types de lymphomes en fonction du stade de maturation atteint. . . . . 17
Figure 3 : Incidence par âge en 2012 - Lymphome diffus à grandes cellules B. . . . . .18
Figure 4 : Société Française d'Hématologie. LDGCB. Faible grossissement (x25). . . . . .19
Figure 5 : Société Française d'Hématologie. LDGCB. Fort grossissement (x400). . . . . 20
Figure 6 : Exemple d'analyse de puces ADN. . . . . 23
Figure 7 : Exemple d'analyse de puces ADN. . . . . 23
Figure 8 : Survie globale des patients LDGCB. . . . . .24
Figure 9 : Survie globale des patients après première chimiothérapie. . . . . .25
Figure 10: Progression de vie et de survie globale pour patient LDGCB sous traitement R-CHOP. . . . . 26
Figure 11 : Arbre décisionnel pour classification des LDGCB ; Colorations immunoperoxydases. . . . . 27
Figure 12 : Analyse de puces ADN de l'expression de gène d'expression cible de NF-κB. . 28
Figure 13 : Activation cellulaire de la voie de signalisation Nf-κB. . . . . 30
Figure 14 : Différents groupes de TNFR et activation voies de signalisation intracellulaire. .33
Figure 15: Facteurs du succès de réalisation d'une imagerie en oncologie médiée par les anticorps. . . . . 34
Figure 16 : Schéma du principe de fonctionnement d'une tomographie par émission de positons. . . . . .36
Figure 17 : Schéma du principe de ciblage d'une tumeur par une molécule marquée. . . . . 37
Figure 18 : Iodation directe d'un peptide. . . . . 39
Figure 19 : Réactif de Bolton-Hunter. . . . . .40
Figure 20 : Fragment Fab et Fc. . . . . .43
Figure 21 : Différent fragments d'Ac obtenus par ingénierie moléculaire. . . . . .44
Figure 22: Courbes du % de la dose incubées/g en fonction du temps (Heures) dans la tumeur et dans le sang. . . . . .51
Figure 23 : Couplage entre le chélateur (Df) et un anticorps. . . . . 56
Figure 24 : Cycle succinimide. . . . . 57
Figure 25 : Schéma des six étapes pour la synthèse du Zr-N-SucDf-Ac. . . . . 57

Figure 26 : Ac modifié avec le nouveau chélateur bifonctionnel Df-Bz-NCS. . . . . .58
Figure 27: Présentation des différents chélateurs utilisés pour le marquage d'anticorps au $^{89}$Zr au cours du temps. . . . . 59
Figure 28: Lame de Kova. . . . . 69
Figure 29 : La cytométrie en flux. . . . . 70
Figure 30 : Différentes étapes clés du fonctionnement de la RT-MLPA. . . . . 72
Figure 31 : Principe de fonctionnement colonne de dessalage. . . . . .73
Figure 32: D'après Johnson. Représentation schématique de la méthode au BCA. . . . . 75
Figure 33: Différentes étapes du Western Blot. . . . . .76
Figure 34: ITLC. . . . . 79
Figure 35: Principe de fonctionnement de l'HPLC. . . . . 80
Figure 36 : Cytogramme et Histogramme lignées cellulaire ± anti-CD20. . . . . .89
Figure 37 : Analyse des RT-MLPA des lignées cellulaires. . . . . 90
Figure 38 : Etablissement de la gamme standard. . . . . 91
Figure 39: Gel de polyacrylamide- integrité Rituximab-Df-Bz-NCS. . . . . .93
Figure 40: WB-Spécificité Rituximab. . . . . 94
Figure 41: WB- Spécificité Rituximab-Df-Bz-NCS. . . . . .94
Figure 42 : ITLC - Chromatographie du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab. . . . . .96
Figure 43 : ITLC - Radiochromatographie du $^{89}$Zr seul. . . . . .97
Figure 44 : HPLC - Radiochromatographie du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab. . . . . .98
Figure 45 : Stabilité (%) de la préparation à différents temps dans du plasma et du Nacl. . . .99
Figure 46 : Saturation des récepteurs des différentes lignées cellulaires. . . . . 100
Figure 47 : Compétition entre le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab et le Rituximab froid. . . . . .101
Figure 48 : Détermination de la fraction immunoréactive, lignée VAL. . . . . .102
Figure 49 : Détermination de la fraction immunoréactive, lignée REC. . . . . .103
Figure 50 : Fusion MicroPET-Nanospect/CT après l'injection de $^{18}$F-FDG. Souris REC et DHL. . . . . 104
Figure 51 : Fusion MicroPET-Nanospect/CT après l'injection de $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab ; Souris REC. . . . . 105
Figure 52 : Fusion MicroPET-Nanospect/CT après l'injection de $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab : Souris DHL. . . . . .106
Figure 53 : Gel de polyacrylamide - Intégrité Anti-TACI-Df-Bz-NCS. . . . . .109
Figure 54 : WB – Spécificité Anti-TACI-Df-Bz-NCS. . . . . .110

Figure 55 : ITLC – Radiochromatographie du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Anti-TACI. . . . . .112
Figure 56 : Lecture de lame de coupe de tissu tumoral chez souris DHL et REC. . . . . 114
Figure 57 : Lecture de lame de coupe de ganglion de patient à LDGCB GCB et non GCB. 115

# Objet de la thèse

Le lymphome diffus à grandes cellules B est le type de lymphome non hodgkinien le plus répandu. La dernière version de la classification OMS de 2008 présente les différents sous-types de LDGCB, on y distingue un sous-type ABC, un sous-type GCB et un sous-type dit « non ABC-non GCB ». Ces sous-types présentent différents pronostics. La survie globale est meilleure pour le sous-type GCB que pour le sous-type ABC, il en est de même après chimiothérapies usuelles CHOP et R-CHOP.
L'activation de la voie de signalisation NF-κB est une caractéristique commune au LDGCB de sous-type ABC. En effet, le sous-type ABC exprime plus fortement certains gènes qui sont des gènes cibles de cette voie de signalisation.

L'objectif de ce travail est de pouvoir détecter cette voie de signalisation, et donc le sous-type ABC, afin d'optimiser au mieux sa prise en charge. Le récepteur membranaire TACI présente la particularité d'activer la voie de signalisation NF-κB. Ce récepteur pourrait être mis en évidence par la mise au point d'un anticorps radioactif ayant pour cible le récepteur TACI. Le radioisotope utilisé sera le Zirconium-89, émetteur β+, détectable après injection par un examen de tomographie par émission de positons.

La première étape de ce travail sera d'évaluer la faisabilité d'effectuer un marquage radioactif sur un anticorps simple à obtenir et à manipuler. Pour cela, nous utiliserons un anticorps monoclonal (Rituximab) sur lequel nous effectuerons le radiomarquage, ainsi que les différents contrôles qualité nécessaires qui nous permettront de valider notre méthode de travail et les différentes étapes critiques de fabrication. De plus, nous tenterons d'injecter le produit préparé chez le petit animal.
Dans un deuxième temps, nous effectuerons le radiomarquage d'une immunoglobuline anti-TACI en suivant les procédures établies grâce au radiomarquage du Rituximab. L'anti TACI radiomarqué pourrait permettre de distinguer le sous-type ABC parmi les différents lymphomes non hodgkinien.

# Introduction

1-Les Lymphomes ..... 11
1-1-Généralités ..... 11
1-2- Le Lymphome B diffus à grandes cellules ..... 16
1-3-LDGCB : Sous-types ABC/GCB ..... 22
1-4- les LDGCB et la voie de signalisation NF-κB ..... 27
2-L'imagerie ..... 34
2-1-Imagerie pour le diagnostic *in vivo* ..... 34
2-2-Imagerie nucléaire ..... 35
3-Le marquage radioactif ..... 37
3-1-Principe du marquage ..... 37
3-2-Les marquages de protéines ..... 37
4-Les anticorps et la radio-immunologie ..... 41
4-1- Historique ..... 41
4-2-Les différents fragments d'anticorps ..... 42
5-$^{89}$Zr-immuno-PET ..... 46
5-1-Le Zirconium-89 ..... 46
5-2-Anticorps et imagerie *via* $^{89}$Zr-immuno-PET ..... 50
6-Applications au marquage d'un Ac pour le diagnostic différentiel de lymphome de sous-type ABC ..... 53
6-1-Choix de la cible ..... 53
6-2-Choix de l'anticorps ..... 54
6-3-Choix chélateur ..... 55
6-4 Choix protocole préparation ..... 59

# 1-Les Lymphomes

## 1-1-Généralités

### 1-1-1-Historique des lymphomes

Sir Thomas Hodgkin dirige une étude en 1832 sur une maladie caractérisée par une augmentation de taille des ganglions lymphatiques et de la rate, après avoir exclu le diagnostic de tuberculose et de syphilis qui étaient alors les pathologies présentant le plus souvent ce type de lésions à cette époque [1]. Virchow lui emboite le pas en 1845 en différenciant les leucémies, où les cellules tumorales se trouvent dans le sang, des lymphomes où les cellules tumorales sont seulement localisées dans les ganglions [2]. A la fin du XIX$^{e}$ siècle, deux médecins donnent leurs noms aux cellules d'aspect anormal qu'ils décrivent comme n'existant pas dans d'autres lésions, l'identification des cellules de Reed-Sternberg devient alors essentielle au diagnostic du lymphome de Hodgkin [3-4]. C'est Nathan Edwin Brill qui a fait la première et durable contribution à notre compréhension des différentes manifestations histopathologiques des lymphomes en identifiant et en précisant les distinctions entre les types de lymphomes (par l'utilisation d'un modèle/structure folliculaire) pour les ganglions lymphatiques, et en décrivant les lymphomes folliculaires dans sa publication de 1925 [5]. On distingue donc le lymphome hodgkinien (où l'on retrouve les cellules de Reed-Sternberg), du lymphome malin non hodgkinien (sans les cellules de Reed -Sternberg). Dans les années 1960-70, d'importantes avancées dans le domaine de l'immunologie sont réalisées, avec l'identification des lignées lymphocytaires B, T, Natural killer, ainsi que leurs stades de différenciation. Se rajoutent à cela de nombreuses avancées sur les molécules jouant un rôle dans le système immunologique et hématopoïétique.

Au cours du XXe siècle et jusqu'à nos jours, de nombreux changements de la classification des lymphomes ont eu lieu, devenant de plus en plus élaborés grâce à l'évolution des connaissances médicales.

## 1-1-2-Classification

Comme le décrit Bruch [6], la première nomenclature historique des leucémies et lymphomes a été publiée en 1903 et ne contenait que 4 groupes. Aujourd'hui, le référentiel de l'OMS paru en 2008 compte 439 pages pour près de 2500 références. Ces différentes classifications permettent de distinguer les différents types de lymphomes sont le reflet du niveau de connaissances et des moyens techniques d'une époque donnée.

Dès 1930, les classifications étaient basées sur l'aspect morphologique de la maladie, comme avec celle de Rappaport en 1956. Peu de temps après, dans les années 1960-1970 de multiples classifications existent. En 1974, grâce à l'intégration des données immunologiques, Karl Lennert permet une modernisation de cette classification en introduisant une classification anatomo-pathologique [7]. En 1988, la version révisée ultérieure de cette classification prit en compte l'apport de l'immunochimie et distingua les phénotypes B et T [8]. Elle devint par la même occasion une référence européenne. Pendant ce temps, des classifications voient le jour en Grande-Bretagne, outre-Atlantique comme celle de Lukes et Collins [9].

De nombreuses confusions naissent entre les pathologistes et les cliniciens. Une conciliation est tentée en 1982 avec la Working Formulation [10] qui, par son approche uniquement morphologique sans distinguer les lymphomes B et T, fut un échec. Au début des années 90, un groupe d'étude international regroupant des pathologistes et des cliniciens est créé. La classification est alors abordée sous un nouvel angle incluant les critères biologiques et cliniques. En 1994, la classification REAL (Revised European American Lymphoma Classification) voit le jour [11], elle sera validée en 1997.

En 2001, apparaît la publication de la classification OMS, fruit d'un travail de collaboration entre pathologistes internationaux, hématologues et oncologues. Reprenant les principes du classement REAL, elle introduit avec les mêmes approches - en plus des néoplasies lymphoïdes - les néoplasies myéloïdes et histiocytaires.

La classification OMS propose un inventaire de maladies défini par des critères distincts : morphologiques, immunophénotypiques, génétiques et cliniques. La classification OMS (2001) inclut les lymphomes B, les lymphomes T/NK et les lymphomes (ou maladies) de

Hodgkin. En 2008, l'OMS publie une dernière version où sont présentées environ 90 entités différentes [12].

On y distingue 3 catégories essentielles :

-les lymphomes de Hodgkin

-les lymphomes B

-les lymphomes T/NK.

Pour les lymphomes B et T/NK, il existe :

-les lymphomes immatures → développés à partir de cellule B et T précurseurs

-les lymphomes matures → développés à partir de cellule B et T à des stades de différenciation plus avancés.

**B-cell lymphoma Precursor lymphomas**
1) B lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS
2) B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities

**Mature B-cell lymphomas**
1) Small lymphocytic lymphoma
2) Splenic marginal zone lymphoma
3) Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable (including splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma)*
4) Lymphoplasmacytic lymphoma
5) Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
6) Nodal marginal zone lymphoma
7) Pediatric nodal marginal zone lymphoma*
8) Follicular lymphoma
9) Pediatric follicular lymphoma*
10) Primary cutaneous follicle center lymphoma
11) Mantle cell lymphoma
12) Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)
- DLBCL, NOS
- T cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
- Primary DLBCL of the CNS
- Primary cutaneous DLBCL, leg type
- EBV positive DLBCL of the elderly*
13) DLBCL associated with chronic inflammation
14) Lymphomatoid granulomatosis, grade 3 (approached as DLBCL)
15) Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
16) Intravascular large B-cell lymphoma
17) ALK positive large B-cell lymphoma
18) Plasmablastic lymphoma
19) Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease
20) Primary effusion lymphoma
21) Burkitt lymphoma
22) B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma
23) B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma

**T-cell and NK-cell lymphoma Precursor lymphomas**
T lymphoblastic leukemia/lymphoma

**Mature T- and NK-cell lymphomas**
1) Hydroa vacciniforme-like lymphoma
2) Adult T-cell leukemia/lymphoma
3) Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type
4) Enteropathy-associated T-cell lymphoma
5) Hepatosplenic T-cell lymphoma
6) Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
7) Mycosis fungoides
8) Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
9) Primary cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma
10) Primary cutaneous CD8 positive aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma*
11) Primary cutaneous CD4 positive small/medium T-cell lymphoma*
12) Peripheral T-cell lymphoma, NOS
13) Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
14) Anaplastic large cell lymphoma, ALK positive
15) Anaplastic large cell lymphoma, ALK negative*

**Hodgkin Lymphoma (HL)**
1) Nodular lymphocyte predominant HL
2) Classical HL (CHL)
- Nodular sclerosis CHL
- Lymphocyte-rich CHL
- Mixed cellularity CHL
- Lymphocyte-depleted CHL

Immunodeficiency-associated lymphoma#
- Lymphoma associated with primary immune disorders
- Lymphoma associated with HIV infection
- Post-transplant Lymphoproliferative Disorders (PTLD)
1) Monomorphic PTLD (B- and T/NK-cell types)
2) Classical Hodgkin lymphoma type PTLD
- Other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphomas

NOS: not otherwise specified
*Provisional entities (insufficient evidence for distinct diseases)
#Clinical information is required for making a diagnosis; classified according to the lymphoma types to which they correspond

Tableau 1 : Classification des différents types de lymphomes malins selon la classification de l'OMS (2008).

Voici les principales modifications dans cette nouvelle version :

- Les différents sous-types de lymphomes diffus à grandes cellules B (LDGCB)

- L'introduction d'entités provisoires « Borderline » (Lymphome B inclassable, intermédiaire entre LDGCB et Lymphome de Burkitt)

- Reconnaissance de lésions précurseurs : « Early lesions »

- Individualisation d'entités particulières :
    - Localisation (Lymphome folliculaire du duodénum, LDGCB cutané primitif « de type jambe », LDGCB primitifs du SNC)
    - Âge (Lymphome de la zone marginale ganglionnaire de l'enfant, Lymphome folliculaire de l'enfant, LDGCB EBV+ du sujet âgé)

- Lymphomes folliculaires et grade histologique (grade basé sur la proportion de centroblastes)

- Au sein des lymphomes T/NK matures :
    - EBV et lymphome NK/T de type nasal
    - ALCL ALK- (Anaplasic large-cell lymphoma- anaplastic lymphoma kinase)
    - Lymphomes sous-cutanés ab/gd

Dans cette nouvelle classification, les lymphomes B à grandes cellules font l'objet de modifications relativement importantes. Une catégorie probablement hétérogène persiste, il s'agit de celle des lymphomes B diffus à grandes cellules sans spécification (*not otherwise specified* [NOS]). Dans ce groupe, on distingue des variantes morphologiques (centroblastique, immunoblastique, anaplasique et d'autres plus rares). Il existe également des « sous-groupes moléculaires » avec une signature soit de type cellules B des centres germinatifs (GCB), soit de type lymphocytes B activés (ABC).

## 1-1-3-Incidence globale

Les lymphomes malins représentent 3 à 5 % de tous les cancers de l'adulte. L'incidence annuelle globale peut être estimée à 10 nouveaux cas pour 100 000 habitants. Cette pathologie est plus fréquente chez l'homme (60%) que chez la femme (40%). Il s'agit du 6$^{ème}$ cancer en termes d'incidence en France.
Ces dernières années, sa fréquence a considérablement augmenté, avec une incidence près de deux fois supérieure en 20-25 ans [13].

**Les lymphomes de Hodgkin (LH)** :

Les LHs représentent environ 10 % des lymphomes. On estime à 1 880 le nombre de nouveaux cas de LH classique en France en 2012, dont 55 % survenant chez l'homme. Les taux d'incidence standardisés sur la population mondiale sont de 3,0 chez l'homme et de 2,7 chez la femme, soit un rapport hommes/femmes de 1,1. C'est principalement, mais non exclusivement, une maladie de l'adulte jeune, surtout entre 20 et 40 ans [14].

**Les lymphomes non-Hodgkiniens (LNH)** :

Avec 10 224 nouveaux cas recensés en France en 2005, soit une incidence de 20,3 cas pour 100 000 habitants, il s'agit de l'hémopathie maligne la plus fréquente ; avec un taux de progression annuel (entre 1980 et 2005) de 2.7 % chez l'homme, de 2,9 % chez la femme. Ils atteignent aussi bien le sujet âgé, que l'enfant, l'adolescent et l'adulte jeune ; leurs profils cliniques et évolutifs varient surtout selon le type de lymphome non hodgkinien considéré.

## 1-2-Le Lymphome B diffus à grandes cellules

### 1-2-1-Avant propos

Le lymphome diffus à grandes cellules B est caractérisé par une prolifération diffuse de grandes cellules lymphoïdes effaçant partiellement ou totalement l'architecture ganglionnaire. Le lymphome diffus à grandes cellules B est le type de LNH le plus courant. Il représente 30 à 40 % de tous les cas de LNH. Le LDGCB est un lymphome de type B. Le développement de ce lymphome se fait à partir d'un stade de maturation spécifique de la cellule B, notamment au niveau ganglionnaire lors de la formation du follicule secondaire.

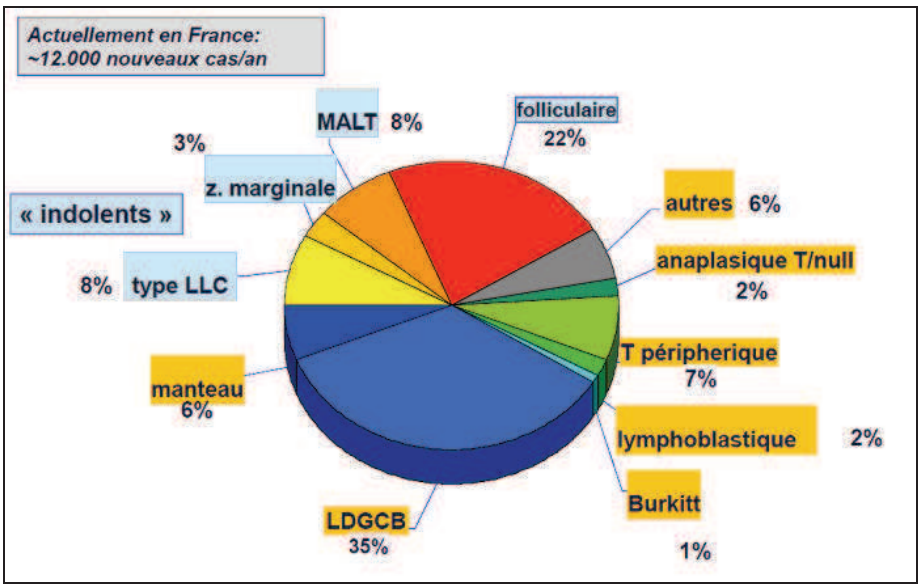



Figure 1 : Répartition en % des différents types de lymphomes non hodgkiniens en France.

Ces lymphomes sont caractérisés par une prolifération diffuse de grandes cellules effaçant l'architecture ganglionnaire normale, et par une évolution spontanément agressive. Un examen anatomopathologique d'une biopsie est nécessaire pour établir leurs diagnostics.

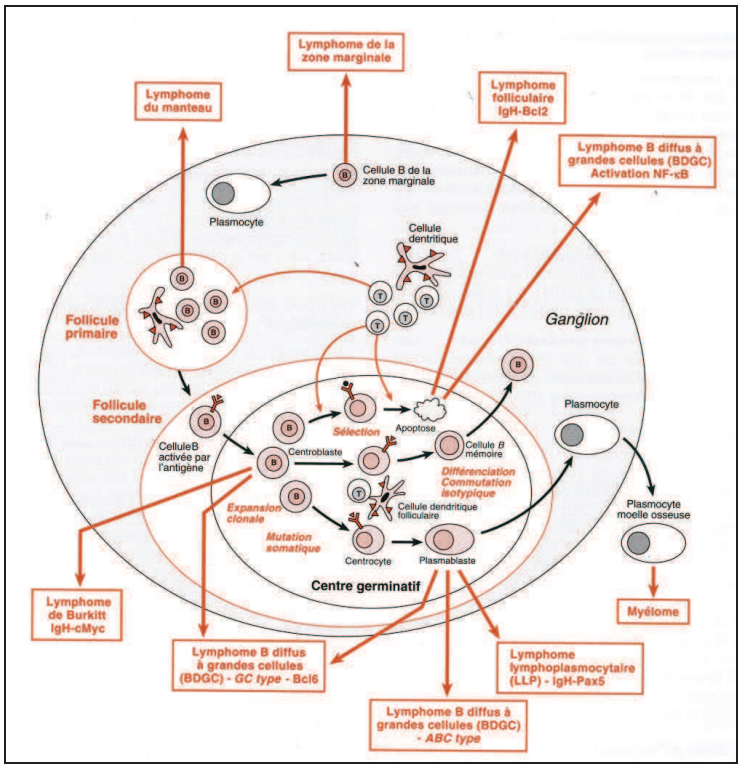



Figure 2 : Représentation des différents stades de maturation des lymphocytes B et les différents types de lymphomes en fonction du stade de maturation atteint.

## 1-2-2-Incidence

Le LDGCB est la 3ème hémopathie maligne en incidence, derrière le Myélome multiple/Plasmocytome et la leucémie lymphoïde chronique/leucémie lymphocytique, d'après l'estimation nationale de l'incidence des cancers en France [14]. En 2012, en France, on estime à environ 4 000 le nombre de nouveaux cas de LDGCB, une majorité apparaissant chez l'homme (60%). A l'échelle mondiale, les taux d'incidences décrivent un rapport homme/femme de 2. L'âge médian de survenue d'un LDGCB est de 69 ans chez l'homme et 74 ans chez la femme. Les taux d'incidence dépassent 10 pour 100 000 personnes/années dès l'âge de 60 ans pour l'homme, et pour la femme vers les 70 ans, pour un maximum respectivement de 45 et 25 pour 100 000 personnes/années entre 84 et 88 ans.

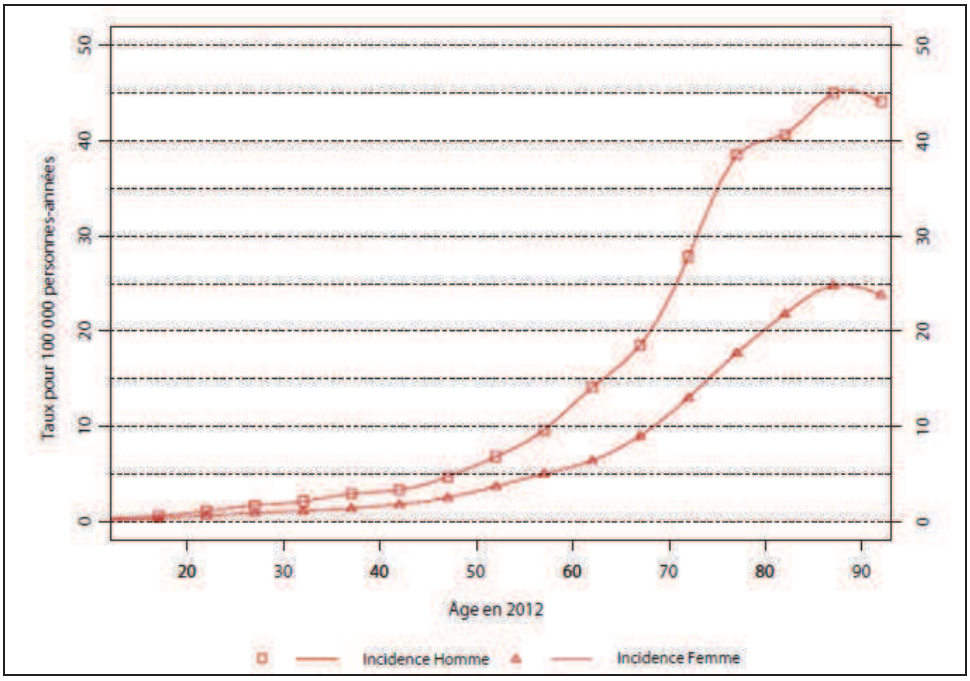



Figure 3 : Incidence par âge en 2012 - Lymphome diffus à grandes cellules B. [14]

L'incidence des LDGCB a peu varié pendant les quinze dernières années. A noter une progression des taux chez l'homme pour les catégories d'âge élevé, passant de 3.5 à 4.5 (augmentation de 1,4% par an entre 1995 et 2012), contrairement aux femmes, qui elles, ont des taux qui diminuent après l'année 2005, tendant vers 2.2 pour 100 000 personnes/années (diminution de 3,3% entre 2005 et 2012). A noter que les LDGCB découlant de la transformation de lymphomes indolents ne sont pas considérés comme des cas incidents et donc pas inclus dans ce travail.

## 1-2-3-Diagnostic (selon le référentiel de la Société Française d'Hématologie)

L'augmentation de volume d'un ou de plusieurs ganglions, ainsi que les signes cliniques (fièvre au long cours, prurit inexpliqué) qui peuvent être observés sont des symptômes évocateurs d'un lymphome.

### 1-2-3-1-Conduite à tenir

La ponction ganglionnaire peut orienter rapidement le diagnostic. Si elle montre des cellules métastatiques de cancer solide, voire des cellules lymphomateuses (comme par exemple les

cellules de Sternberg d'un LH), la biopsie exérèse ganglionnaire s'impose pour affirmer le diagnostic, en préciser le type histologique et participer au pronostic et à la décision thérapeutique.

Le ganglion prélevé sera envoyé au laboratoire d'anatomie pathologique.

**1-2-3-2-Examen d'anatomopathologie**

Un examen d'anatomopathologie classique permet de distinguer le Lymphome de Hodgkin (cellule de Reed-Sternberg) et les Lymphomes Non-Hodgkiniens.

Pour le LNH, l'examen permettra d'observer :

- les caractéristiques morphologiques (architecture de la tumeur, aspect des cellules tumorales) permettent de distinguer 3 sous-types : centroblastique (le plus fréquent), immunoblastique et anaplasique.

- les caractéristiques immunologiques des cellules observées par l'immunophénotypage qui retrouve communément les marqueurs B comme le CD19, le CD20, le CD22, le CD79a mais aussi le CD10 (30 à 60%), Bcl-6 (Bcell lymphoma 6 protein) (60 à 90%) et MUM1 (Multiple Myeloma oncogen 1) (35 à 65%).

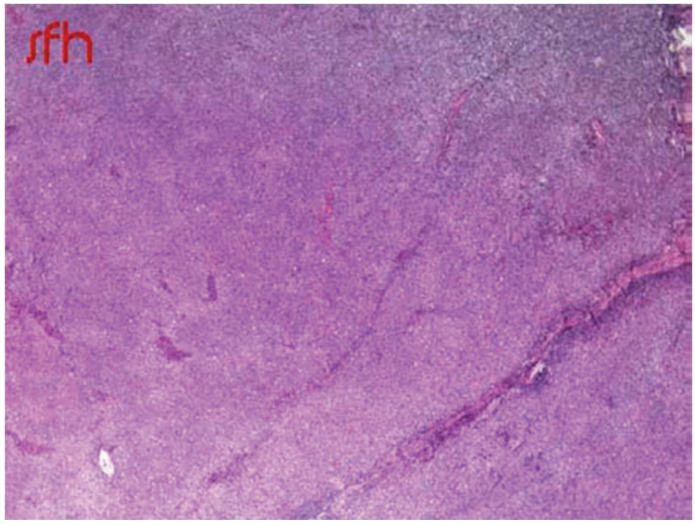



Figure 4 : Société Française d'Hématologie. LDGCB. Faible grossissement (x25) : la prolifération cellulaire lymphomateuse a totalement envahi le ganglion de manière diffuse, entrainant la disparition (destruction) de l'architecture ganglionnaire (coloration Hémalun-Eosine-Safran)

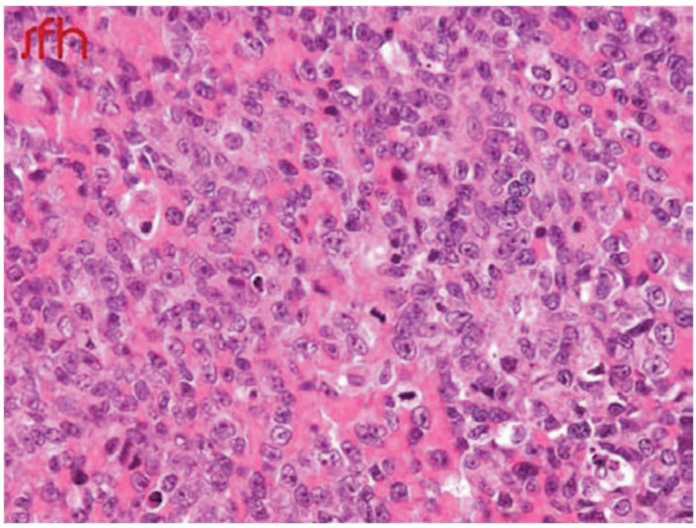


Figure 5 : Société Française d'Hématologie. LDGCB. Fort grossissement (x400) les cellules lymphomateuses ont une grande taille et un noyau avec une chromatine claire contenant un ou plusieurs nucléoles ; de nombreuses mitoses sont visibles (coloration Hémalun-Eosine-Safran)

### 1-2-3-3-Examen cytogénétique

L'examen doit être complété par un examen cytogénétique recherchant des anomalies acquises, clonales, non-aléatoires.
L'altération génétique la plus fréquemment décrite est la translocation du gène *BCL6* (3q27 30% des cas), suivi de la translocation du gène *BCL2* (B-cell lymphoma protein 2) (18q21) dans 20 à 30% des tumeurs et de la translocation du gène *C-MYC* dans 10% des cas [15].
Le diagnostic de LDGCB est affirmé à ce stade et son type histologique déterminé.

### 1-2-3-4-Examen pour évaluer l'extension et l'évolutivité de la maladie

De nombreux examens devront être faits :

-Bilan d'extension : examens cliniques, biologiques (hémogramme, biopsie osteomédullaire, ponction lombaire...) et d'imagerie (TEP-scan).

Au terme du bilan d'extension, le lymphome sera classé selon les différents **stades d'Ann Arbor.**

Stade I : Un seul territoire ganglionnaire atteint.
Stade II : Au moins 2 territoires ganglionnaires atteints du même côté du diaphragme.
Stade III : Atteinte ganglionnaire sus- et sous-diaphragmatique.
Stade IV : Atteinte viscérale (foie, poumon) ou médullaire.

## 1-2-4-Pronostics

### 1-2-4-1-Cliniques

Un système de score international permet d'établir un facteur pronostique clinique, appelé l'IPI (Index Pronostique International) [16].

L'IPI est établi à partir de 5 facteurs : l'âge (supérieur à 60 ans), le stade clinique (III ou IV), un index de performance (égal ou supérieur à 2), un taux de Lactate Déshydrogénase (élevé), l'atteinte d'au moins de 2 sites extra-nodaux.

L'IPI constitue un modèle prédictif significatif à court terme du devenir des patients atteints d'un lymphome agressif. Quatre sous-groupes IPI sont définis :

-Faible risque (0 facteur).
-Faible risque intermédiaire (1 facteur).
-Haut risque intermédiaire (2 facteurs).
-Haut risque (3 facteurs ou plus).

Cependant, parmi chacun de ces sous-groupes, des différences considérables en termes de survie sont constatées, suggérant qu'il existe d'autres marqueurs pronostiques non pris en compte par les critères de l'IPI.

### 1-2-4-2-Cytogénétiques

En cytogénétique, l'impact pronostique des translocations impliquant les oncogènes *C-MYC*, *BCL2* et *BCL6* a été rapporté dans plusieurs études. Ainsi, la translocation du gène *C-MYC* est de manière consensuelle associée à un pronostic défavorable [17].

#### 1-2-4-3-Immunohistochimiques

Plusieurs marqueurs immunohistochimiques ont été rapportés comme ayant un impact pronostique indépendant de l'IPI. L'expression protéique de Bcl-2, de CD5, de FOXP1 (Forkhead box protein P1) ou encore de P53 serait associée à un pronostic défavorable alors que l'expression protéique de Bcl-6, CD10 ou encore de LMO2 (LIM domain only 2) à une évolution plus favorable de la maladie [15].

## 1-3-LDGCB : Sous-types ABC/GCB

Les LDGCB présentent différents profils d'expression génétique et différents profils immunohistochimiques (par l'expression de différents marqueurs) permettant d'individualiser différents sous-types. On distingue le sous-type ABC qui présente un profil d'expression génique identique à celui des cellules B activées. Un second sous-type GCB qui présente un profil d'expression génique identique à celui des cellules du centre germinatif. Une troisième sous-catégorie existe par des proliférations intermédiaires et décrite comme « non GCB-non ABC » [18].

### 1-3-1-Puce ADN

Grâce à la technologie de la puce ADN, il est possible d'analyser le niveau d'expression des gènes dans une cellule par rapport à un échantillon de référence. Ces nouvelles techniques ont permis d'identifier les deux grandes sous-catégories. Avec, d'une part, des proliférations ayant un profil d'expression génique identique à celui de cellules du centre germinatif (GCB), et d'autre part des proliférations dont le profil est au contraire semblable à celui des cellules lymphoïdes B sanguines activées (ABC).

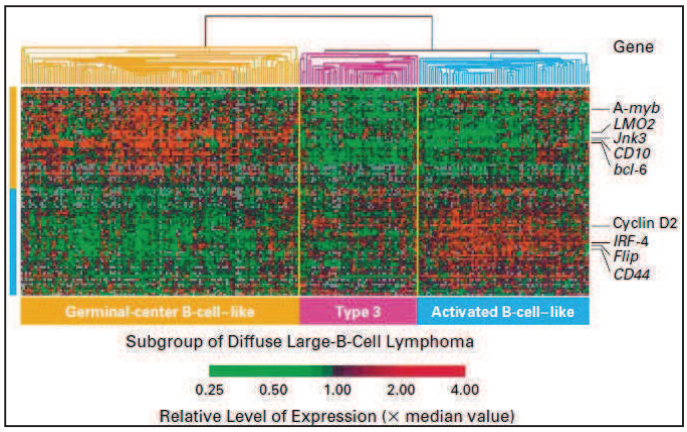



Figure 6 et 7 : Alizadeh et Rosenwald. Exemple d'analyse de puces ADN présentant l'expression plus ou moins importante de gènes pour des LDGCB ABC et GCB. L'expression relative est affichée selon l'échelle de couleur indiquée. La couleur rouge apparaît si le gène est surexprimé, et inversement la couleur verte apparaît si le gène est peu exprimé. Chaque colonne représente un sous-type de LDGCB différents et chaque ligne représente un gène. [18-19]

## 1-3-2-Anomalies cytogénétiques

La morphologie de ces sous-groupes est identique malgré la présence d'anomalies cytogénétiques différentes :

- Les lymphomes de type centre germinal (GCB) présentent entre autres une translocation (14 ; 18) impliquant le gène *BCL-2* et une amplification de *C-rel* sur le chromosome 2p [19].

- Les lymphomes de type activé (ABC) présentent plus fréquemment des gains chromosomiques de 3q, de 18q21 et des translocations du gène *BCL-6* [20].

## 1-3-3-Pronostics

### 1-3-3-1-Survie globale

Dans différentes études, le pronostic des LDGCBs est différent en fonction du sous-groupe d'expression génique [18]. Il existe une différence significative dans l'estimation de la survie globale à 5 ans des LDGCBs ABC et GCB. La survie globale s'est révélée bien meilleure pour les GCB que pour les ABC (76% vs 16%). Cette même survie globale a pu être déterminée pour différents scores de l'index IPI, démontrant que les patients avec un bas score ont une meilleure survie globale que les patients avec un haut score. Chez ces patients avec un score IPI faible, il a pu être démontré que les patients avec un sous-type ABC avaient une bien moins bonne survie que les patients avec un sous-type GCB.

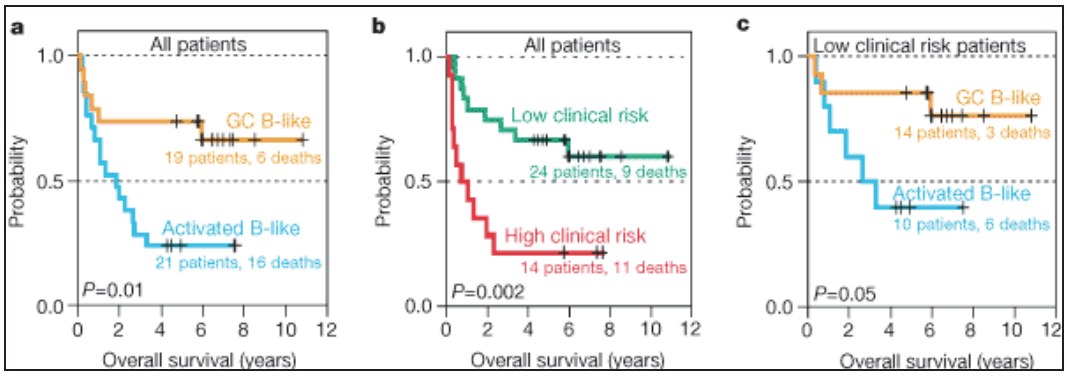



Figure 8 : Alizadeh. a : Courbe Kaplan–Meier de la survie globale des patients LDGCB regroupés selon leur profil d'expression génique. b : Courbe Kaplan–Meier de la survie globale des patients LDGCB regroupés en fonction de leur indice pronostique international (IPI). Patient à faibles risques (IPI score 0–2) et à haut risque (IPI score 3–5) sont tracés séparément. c : Courbe Kaplan–Meier de la survie globale des patients LDGCB à faible risque (IPI score 0–2) regroupés en fonction de leur profil d'expression génique (ABC/GCB). [18]

Le type moléculaire de LDGCB, défini par l'expression génétique et le score IPI influence donc la survie des patients atteints.

### 1-3-3-2-Réponse aux traitements

Une discussion au cours d'une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) est nécessaire à la mise en place d'une prise en charge. Le patient est informé du diagnostic, et des suites thérapeutiques. Cette décision est prise sur la base d'un diagnostic précis et suivant les données de l'IPI.

La distinction de l'expression génétique a donc un intérêt pronostique important, mais aussi un intérêt pour la réponse de chacun de ces sous-types au traitement de référence.

Rozenwald, pose l'hypothèse que le profil d'expression génique des LDGCB peut être utilisé indépendamment de l'IPI pour prédire le devenir d'un traitement par chimiothérapie [19]. Il en conclut qu'après un traitement CHOP, les patients GCB ont une survie globale à 5 ans pour 60% d'entre eux alors qu'elle est de 35% pour les ABC (figure 9).

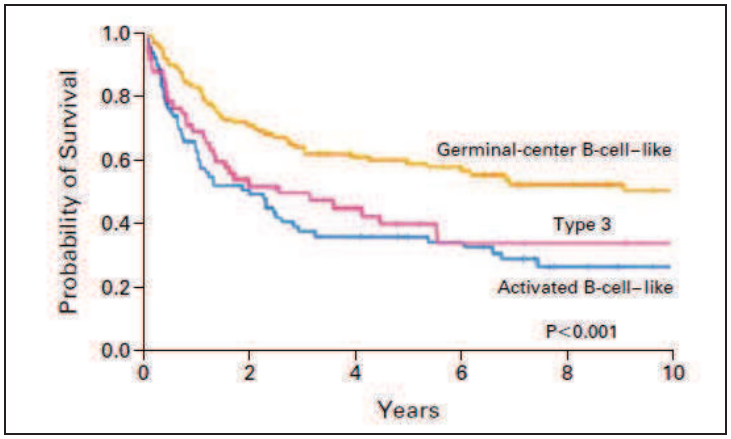



Figure 9 : Rozenwald. Courbe de Kaplan-Meier de la probabilité de survie globale après première chimiothérapie chez 240 patients en fonction du sous-type de LDGCB. [19]

De même pour Lenz G. [21], pour qui une cohorte de patients sous traitement R-CHOP (Rituximab + Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisolone) présentant le sous-type GCB a une survie globale et une survie sans progression plus importante que les patients ABC. Pour ce qui est de l'ajout du Rituximab, il a permis d'augmenter la survie globale de 10 à 15% pour les deux sous-types.

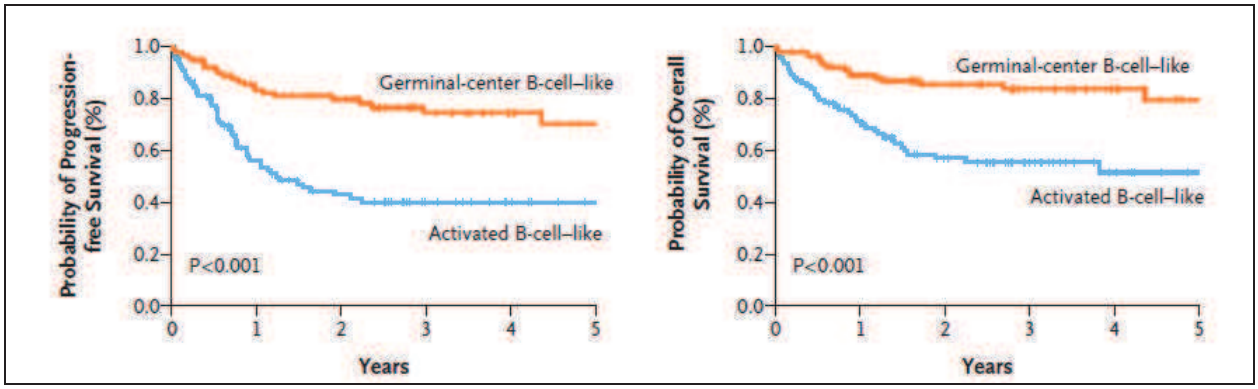



Figure 10 : Lenz. Courbe de Kaplan-Meier de la probabilité de progression de vie et de survie globale pour des patients sous traitement R-CHOP. [21]

Cette distinction a donc aussi un intérêt thérapeutique, car la réponse aux traitements classiques est différente en fonction du sous-type. Donc, si le patient présente un sous-type, par exemple ABC, cela pourrait permettre de s'orienter vers un traitement plus adapté par rapport aux protocoles de chimiothérapie usuels.

### 1-3-4-Immunohistochimie

Suite à l'impact du pronostic en fonction du sous-type de LDGCB, des profils immunohistochimiques ont été proposés comme prédicateurs du profil génétique. La méthode de Hans peut donc être utilisée, elle indique le sous-type de LDGCB potentiel en fonction de l'expression de 2 gènes GCB (CD10 et BCL-6) et d'un gène ABC (MUM-1) [22].

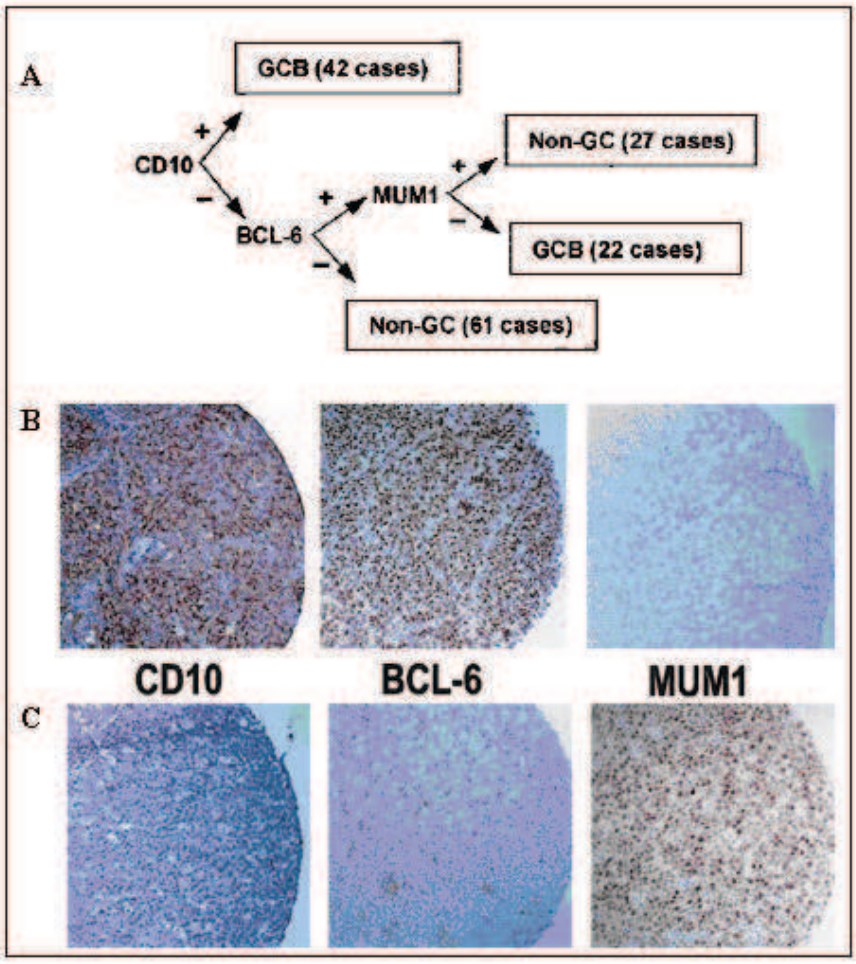



Figure 11 : Hans. A : Arbre décisionnel d'analyse immunohistochimique (de puces tissulaires immunoperoxydase) pour classification des LDGCB en fonction de l'expression de gènes. B : Grossissement × 100. Les colorations immunoperoxydases d'un cas de GCB qui est positif pour CD10 et bcl-6, mais négatif pour MUM1. C : Grossissement × 100. Les colorations immunoperoxydases d'un cas de non-GCB qui est négatif pour CD10 mais montre de rares cellules bcl-6 et est positif pour MUM1. [22]

## 1-4-Les LDGCB et la voie de signalisation NF-κB

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe différents sous-types génotypiques de LDGCB. Les trois sous-types de DLBCL sont appelés « germinal center B-cell like » (GCB), activated B-cell-like (ABC) et primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL). Ces sous-types se développent à partir de différents stades de différenciation des lymphocytes B normaux et utilisent des voies oncogéniques distinctes. De plus, ces différents sous-types ne présentent pas les même pronostiques de survie et de réponses aux traitements. Les LDGCB ABC étant donc de moins bons pronostiques que les GCB.

## 1-4-1-Spécificité du sous-type ABC

Davis [23] montre que certains gènes se retrouvent plus fortement exprimés dans les lignées ABC.

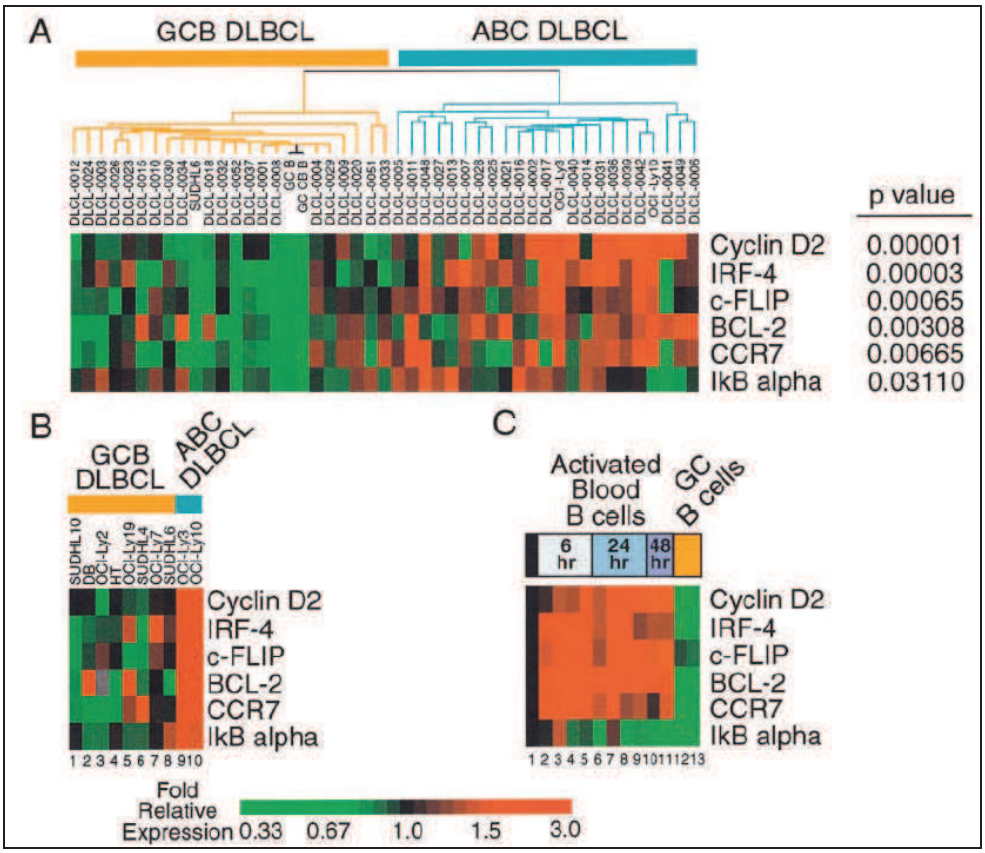



Figure 12 : Davis. Analyse de puces ADN de l'expression de gène d'expression cible de NF-κB. L'expression relative est affichée selon l'échelle de couleur indiquée. A : Expression pour LDGCB d'une biopsie d'échantillons de ganglions lymphatiques. Les cas de LDGCB sont sous-divisés en sous-types GCB et ABC B : Expression dans les lignées cellulaires de LDGCB. C : Expression dans cellules B normales. [23]

Ces gènes (Cycline D2, IRF-4, c-FLIP, BCL-2, CCR7 et IκBα) présentent une expression significativement différente ($P < 0,05$) entre les sous-types de LDGCBs. Ils sont hautement exprimés dans un grand nombre de LDGCB ABC et tendent à être peu exprimés dans les GCB.

Davis indique que ces gènes sont des gènes cibles de la voie de signalisation NF-κb (nuclear factor-kappa B), il suggère donc que l'activation de la voie de signalisation NF-κB est une caractéristique commune à de nombreux cas de LDGCB ABC. De plus, il soutient que

l'inhibition de l'activité de NF-κB est toxique pour les cellules de LDGCB ABC et non pour des lignées cellulaires dérivées de GCB.

Ces constatations démontrent que les deux sous-types de LDGCB ont des mécanismes pathogéniques distincts et précisent que le ciblage de l'activation de NF-κB pourrait permettre d'établir une thérapie dans les LDGCB ABC.

## 1-4-2-NF-κB

Les voies de signalisations intracellulaires incluant le facteur de transcription Nuclear Factor-κB sont activées pendant la différenciation cellulaire normale et durant les réponses immunitaires. L'activité transcriptionnelle dépendant de NF-κB est médiée par des dimères faisant partie de la famille de NF-κB (p50/105, p52/100, p65/RelA, RelB, ou c-Rel) et est régulée par la famille d'inhibiteur IκB, principalement IκBα qui se lie aux dimères de NF-κB et les retient dans le cytoplasme.

Lors de la phosphorylation par IKK (Inhibiteur de la Kinase κB), IκBα subit une ubiquitination et une dégradation par le protéasome, et libère donc des dimères de NF-κB qui peuvent effectuer une translocation vers le noyau et activer la transcription de gènes cibles [24-25].
Les gènes cibles de NF-κB codent pour des médiateurs de diverses réponses immunitaires ainsi que pour des régulateurs de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. L'expression de ces gènes cibles varie en fonction du type de cellules dans laquelle le NF-κB est activé.

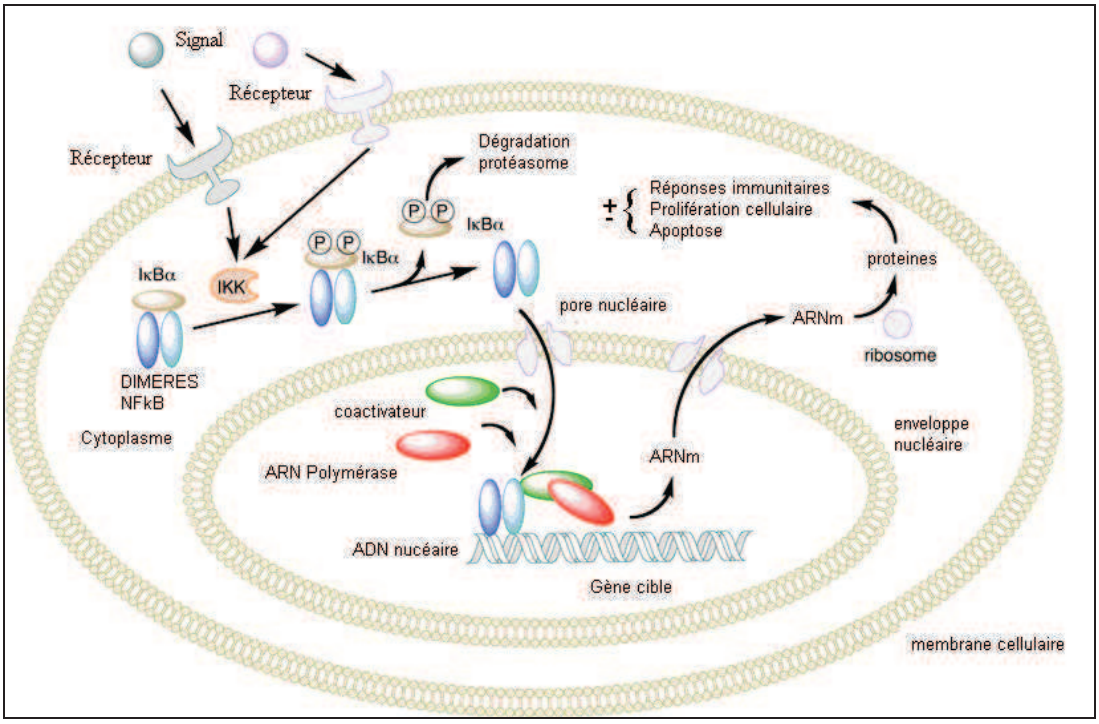



Figure 13 : Activation cellulaire de la voie de signalisation Nf-κB. L'activation du récepteur par un signal induit la formation du complexe IKK. Le complexe IKK phosphoryle alors la protéine inhibitrice IκB, entrainant sa dissociation du dimère NF-κB. La protéine IκB est ubiquitinée et dégradée. NF-κb rejoint le noyau où il induit la transcription de gènes spécifiques.

L'activité de NF-κB est critique pour le développement et la survie des cellules B normales. L'activité transcriptionnelle de NF-κB dans les cellules B implique principalement des hétérodimères constitués d'une sous-unité de transactivation (c- Rel ou RelA) et d'une sous-unité non-tansactivatrice (p50, la forme transformée de NF- B1 ou p52, la forme transformée de NF- B2).

Différentes études suggèrent que l'activation de NF-κB pour un patient cancéreux peut avoir une importance pathogénique, cependant d'autres travaux sont nécessaires pour démontrer un lien direct entre l'activité de NF-κB et les résultats cliniques [26].

L'activation du signal NF-κB est induite suite à la fixation d'un ligand à un récepteur spécifique. Cette voie de signalisation apoptotique est initiée par une famille de molécules regroupées dans la superfamille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor), aussi appelée voie extrinsèque.

## 1-4-3-Les récepteurs au TNF

La superfamille des TNF/TNFR (tumor necrosis factor receptor) comprend 29 récepteurs et 19 ligands [27]. Les récepteurs sont principalement des protéines transmembranaires de type I (partie N-terminale extracellulaire) présentant des motifs riches en cystéine (CRD) au niveau de leur domaine extracellulaire, participant à leur interaction avec leur ligand respectif. Trois ou quatre CRDs en moyenne constituent les récepteurs du TNF (1 pour BAFFR à 6 pour CD30).

Comme le décrit Pasero [28], les membres de la superfamille des récepteurs au TNF sont classés en sous-groupes selon la présence ou l'absence d'un domaine d'environ 80 acides aminés, appelé « domaine de mort » (DD : death domain) dans leur partie intracytoplasmique.

### 1-4-3-1-Groupe 1

Ce groupe comprend :

- les récepteurs comportant un DD : TNF-R1, Fas, DR3, NGFR, EDAR, DR6,
- les récepteurs de TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing ligand) : DR4 et DR5.

Après fixation du ligand spécifique, le récepteur s'active par trimérisation, provoquant la formation d'un complexe multiprotéique appelé le « complexe de signalisation induisant la mort », (death inducing signaling complex, DISC). Celui-ci regroupe le récepteur, des protéines adaptatrices : FADD (Fas-associated death domain protein) ou TRADD (TNF-receptor-associated death domain protein) et des procaspases.

L'activation de ces « récepteurs de mort » a pour conséquence l'activation de la cascade des caspases (cysteine-dependent aspartate-specific protease) qui, par leur site de clivage, vont cibler des protéines cellulaires et ainsi engendrer des modifications biochimiques et morphologiques typiques de l'apoptose.

### 1-4-3-2-Groupe 2

Ce groupe comprend la plupart des récepteurs au TNF :

-TNFR2, LTbR, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, HVEM, BCMA, GITR, TROY et XEDAR ...

Ces récepteurs ne comportent pas de DD, ils sont caractérisés par la présence, dans leur domaine cytoplasmique, d'un motif TIM (TRAF-interacting motifs) permettant d'interagir avec des protéines de la famille des TRAFs (TNFR-receptor-associated factor).

Ils sont reliés par TRAF aux cascades de signalisations des sérine–thréonine kinases : IKK (Nf-κB), JUN N-terminal kinase (JNK)/p38, ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase).

### 1-4-3-3-Autres récepteurs

Enfin, parmi les TNFR, il existe aussi des récepteurs ne possédant pas de domaine intracellulaire :

-Le DcR1 et DcR2 ancrés à la membrane par un groupement phosphatidylinositol,

-L'OPG, soluble, ayant un rôle de leurre, fixant le ligand, l'empêchant donc de stimuler les récepteurs membranaires.

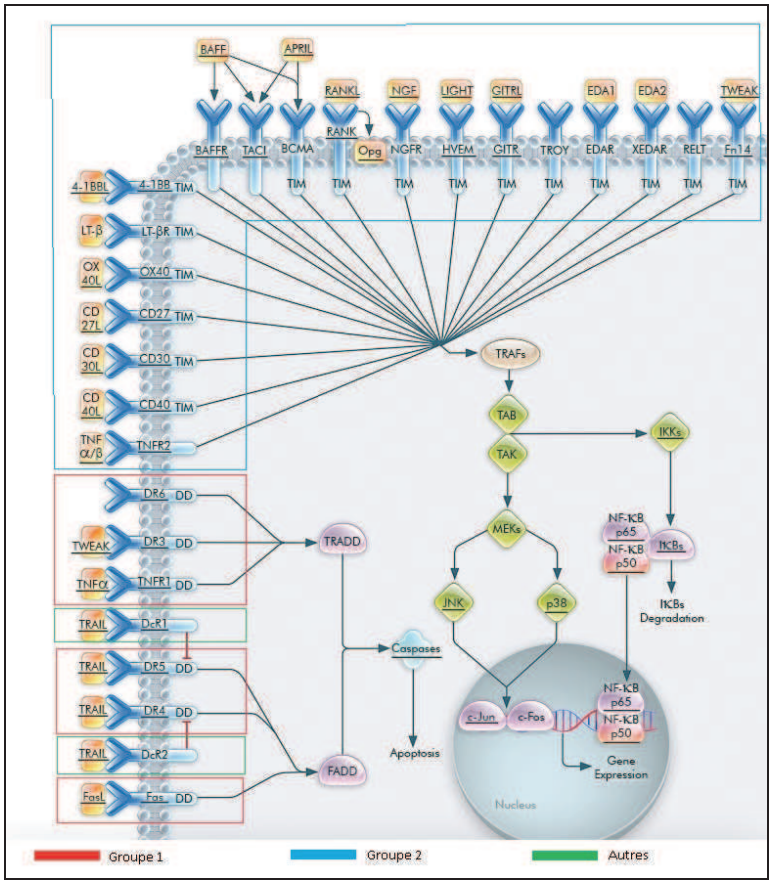



Figure 14 : Différents groupes de TNFR et activation voies de signalisation intracellulaire. Les récepteurs du groupe 1, après fixation du ligand, s'activent en formant un complexe DISC (Récepteur + FADD ou TRADD + Procaspases), induisant l'apoptose. Les récepteurs du groupe 2, sans DD, avec un motif TIM cytoplasmique, permettant d'interagir avec des protéines TRAFs induisant les cascades de signalisation : IKK (NF-κB), (JNK)/p38, ERK/MAPK. Et les autres récepteurs ne possédant pas de domaine intracellulaire.

Cette classification simplifiée distinguant les récepteurs en fonction de la présence - ou non - du DD ne représente pas la complexité des voies de signalisation après activation des TNFRs. Pour exemple, Pasero décrit que certains récepteurs du 1$^{er}$ groupe peuvent recruter des protéines TRAFs et que des récepteurs ne possédant pas le DD peuvent induire l'apoptose directement, ou indirectement, par des mécanismes peu connus [28].

# 2-L'imagerie

## 2-1-Imagerie pour le diagnostic *in vivo*

La technique d'imagerie médicale la plus ancienne est la radiographie par rayons X (fin 19ème siècle). Dans les années 1970, grâce à l'émergence de l'informatique, se développe la tomodensitométrie, plus couramment appelée CT-scanner (CT : Computed Tomography). Ces scanners permettent alors, après reconstruction, de construire des vues en coupe ou des vues en trois dimensions. Ils sont principalement effectués en première intention préventive. Ces techniques permettent notamment d'obtenir un excellent contraste entre les os et les tissus mous. Mais le contraste faible entre les différents tissus mous rend difficile la localisation précise de tumeurs au sein de ces tissus.

Plus récemment, vers les années 1970-80 de nouveaux systèmes d'imagerie *in vivo* ont permis de mieux visualiser les tumeurs, comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'imagerie nucléaire (TEP : Tomographie par émissions de positons).

La combinaison de trois éléments permet d'obtenir un important signal de contraste par rapport au tissu normal et peut ainsi prédire le succès d'un diagnostic par imagerie : la cible, la sonde et la technique d'imagerie [29].

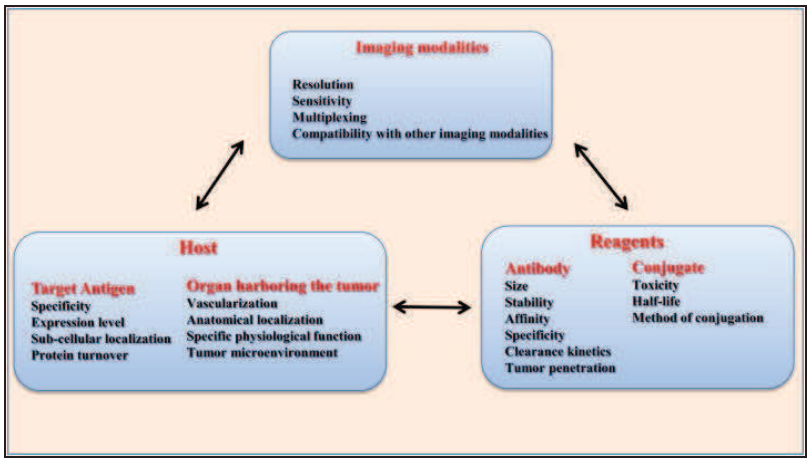



Figure 15: Schéma représentant les facteurs associés dans le succès de réalisation d'une imagerie en oncologie médiée par les anticorps. Association à établir entre les modalités de la technique d'imagerie, les propriétés du traceur et la nature et localisation de l'antigène ciblé. [29]

## 2-2-Imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire est utilisée pour le diagnostic non invasif des cancers depuis près de 30 ans. Elle est divisée en deux classes : l'imagerie à émission de positons (TEP) et la tomographie par émission monophotonique (TEMP ou single photon emission computed tomography, SPECT).

L'imagerie SPECT est issue de la distribution des traceurs radioactifs qui émettent des photons gamma depuis le tissu cible. La gamma caméra tourne autour du patient pour obtenir plusieurs projections et pouvoir reconstituer une image 3D. Malgré cela, l'imagerie gamma conventionnelle reste limitée par la faible qualité des images scintigraphiques. Les deux principaux facteurs de dégradation des images sont dûs, comme pour l'imagerie TEP, aux phénomènes physiques que sont l'atténuation et la diffusion, inhérentes au rayonnement traversant la matière [30].

L'imagerie TEP met à profit l'émission par le radioisotope d'un positon, qui après un court trajet à partir de son point de départ où il échange son énergie cinétique avec le milieu, s'annihile ensuite avec un électron en émettant deux photons antiparallèles d'une énergie égale à 511 keV. Ces deux photons sont alors détectés en coïncidence par deux détecteurs opposés.

Différents radioisotopes peuvent être utilisés en TEP tels que iode-124($^{124}$I), cuivre-64 ($^{64}$Cu), gallium-68 ($^{68}$Ga), yttrium-86 ($^{86}$Y), brome-76 ($^{76}$Br) et le zirconium-89 ($^{89}$Zr). Cependant, afin de réaliser rapidement des images tomographiques, le radioisotope le plus classiquement employé est le Fluor-18 ($^{18}$F, demi-vie = 110 minutes).

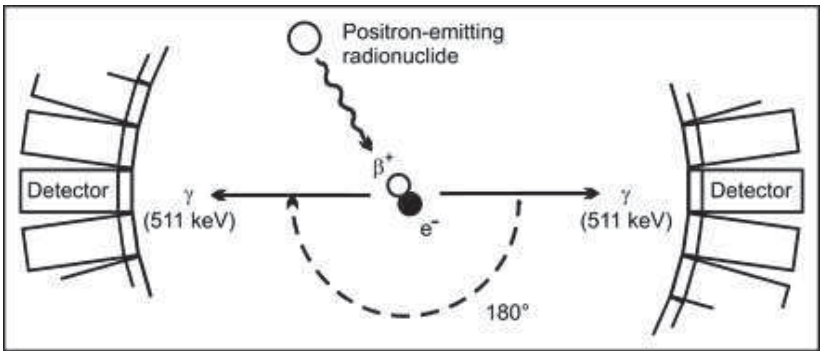



Figure 16 : Schéma du principe de fonctionnement d'une tomographie par émission de positons. Identification des positons car une fois leur énergie perdue, ils s'annihilent avec un électron du milieu pour donner deux photons gamma d'énergie 511 keV émis à 180° l'un de l'autre. Les deux photons d'annihilation gamma atteignent simultanément une paire de détecteurs opposés.

Si l'on doit comparer les deux techniques dans l'imagerie nucléaire, la TEP se révèle être la méthode de choix en termes de sensibilité et de suivi de l'évolution de la cible [31]. A noter le remplacement progressif de l'imagerie TEP seule par la TEP/CT, l'ajout du CT scanner permettant d'apporter une information anatomique et morphologique correspondante aux résultats fonctionnels déterminés par la TEP.

Pour toutes ces techniques d'imagerie - et plus particulièrement dans le cadre de l'immuno-TEP - la sensibilité dépend plus de la densité en antigène tumoral spécifique que de la taille à proprement dite de la tumeur. Cette technique permet également d'apprécier le fait que les antigènes cibles sont exprimés uniformément dans toutes les localisations tumorales (envahissement ganglionnaire / métastases), alors que la ponction ganglionnaire ne permet de connaître cette expression que dans le ganglion ponctionné.

Il est donc nécessaire d'avoir à disposition des traceurs les plus spécifiques possibles. Il existe un réel besoin de développer des techniques qui pourront être utilisées pour le diagnostic personnalisé permettant une stratégie thérapeutique adaptée. Cette technique reste cependant complémentaire aux examens classiques (échographie, scanner), elle est utilisée si ces derniers sont douteux ou pour un diagnostic de récidive.

# 3-Le marquage radioactif

## 3-1-Principe du marquage

Pour un diagnostic ciblé, le marqueur (radio-isotope) doit être associé à une molécule ciblant la tumeur telle que des anticorps (Ac), des peptides, des petits ligands ou encore des copolymères synthétiques.

Dans le cas de biomarqueurs protéiques, les molécules les plus souvent utilisées pour le diagnostic des cancers sont les anticorps ou leurs dérivés en raison de leurs grandes spécificités.

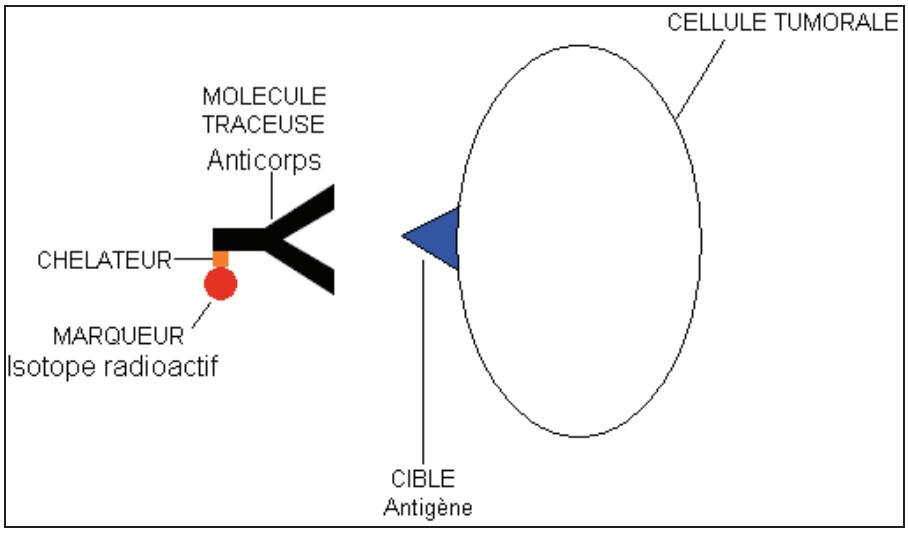



Figure 17 : Schéma du principe de ciblage d'une tumeur par un anticorps marqué.

## 3-2-Les marquages de protéines

Le marquage d'un anticorps nécessite donc plusieurs étapes permettant l'association entre un anticorps et un isotope radioactif par l'intermédiaire, ou non, d'un chélateur. Ces couplages devront être effectués sans altérer la fonctionnalité de chacun des composants.

Il existe plusieurs types de marquages que nous allons brièvement décrire de manière non exhaustive.

### 3-2-1-Le marquage radioactif à l'iode

Ce marquage est la méthode la plus utilisée pour l'obtention d'un radioligand. En effet, les méthodes d'incorporation de l'iode radioactif font appel à une chimie simple et accessible. La chimie de marquage à l'iode des protéines et des anticorps s'est considérablement développée ces dernières années. Le choix de la réaction de marquage des peptides va dépendre de leur taille, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques et de la présence de groupements réactifs.

Deux méthodes majeures d'incorporation du radioélément peuvent être utilisées :

- La méthode directe : l'iode radioactif est fixé directement sur la molécule biologiquement active par une substitution électrophile directe.

- La méthode indirecte : le radiomarquage est réalisé par l'intermédiaire d'un groupement prosthétique qui sera ensuite greffé sur le peptide ou la protéine à radiomarquer.

Dans les deux cas, l'iode, qui se présente sous forme réduite (NaI) vient réagir avec le groupement phénol d'une tyrosine ou avec la chaîne latérale d'un résidu histidine. Ces groupements sont préalablement oxydés à l'aide d'un agent oxydant (chloramine-T et dérivé (Iodogen ;NBS), lactopéroxidase, méthode électrochimique) [32].

<u>Iodation directe du peptide</u> :

Il faut que le peptide ou la protéine possède au moins une tyrosine (ou histidine) sur les acides aminés des chaînes polypeptidiques. La fixation de l'iode se fait alors en ortho du groupement phénolique. On pourra alors obtenir des produits monomarqués ou polymarqués, s'il y a une incorporation de deux atomes d'iode en ortho sur le même groupement phénolique, ou qu'il y a substitution sur plusieurs tyrosines du même peptide [33].

Une purification chromatographique permettra de ne récupérer que le dérivé iodé possédant les propriétés désirées.

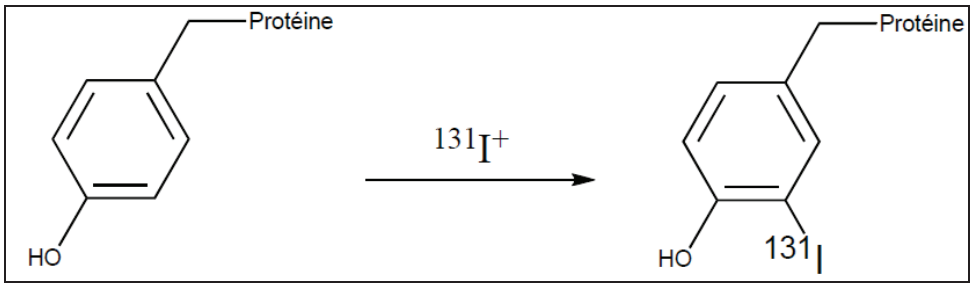



Figure 18: Iodation directe d'un peptide.

Méthode indirecte par addition d'un groupement réactif préalablement iodé :

Certaines molécules ne peuvent être iodées par voie directe pour diverses raisons : du fait de leur faible réactivité vis-à-vis des halogènes, de l'absence de site d'halogénation, de leur proximité du site actif, de l'instabilité de l'iodation ou de l'absence de tyrosine ou histidine sur la protéine. Il est alors nécessaire de fixer l'iode sur un groupement prosthétique bifonctionnel appelé synthon.
Ce dernier doit posséder, d'une part, un site d'iodation permettant un marquage stable, et d'autre part un site d'ancrage qui réagit avec les groupements NH2 ou COOH de la molécule à marquer [34].

Les principales fonctions utilisées pour ce couplage sont de type isothiocyanate ou N-hydroxysuccinimidyl qui réagiront sur les groupes résiduels NH2 ou SH présents au niveau des lysines et cystéines de la protéine.

L'iodation indirecte est réalisée en deux temps :

- l'iode est fixée au synthon prosthétique,
- l'ensemble est couplé à la protéine.

Pour le couplage de l'iode, les groupements les plus utilisés sont le réactif de Bolton-Hunter, les sels de diazonium et les organostanniques [35].

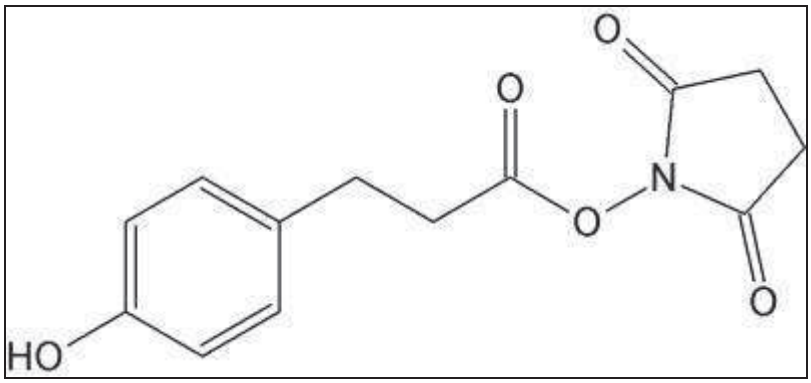



Figure 19 : Réactif de Bolton-Hunter (N-succinimidyl-3[4-hydroxyphenyl] propionate) dont le noyau aromatique est activé par le groupe OH pour permettre l'iodation. L'ancrage est réalisé au niveau de l'hydroxysuccinimide très réactif qui forme un amide avec le site NH2 libre des peptides.

Ce marquage a quelques inconvénients. En effet, le marquage ne peut être effectué que sur certains acides aminés (tyrosines, histidines, lysines ou le groupement $NH_2$-terminal). De plus, l'atome d'iode étant volumineux, si le marquage s'effectue près du site actif, cela peut affecter l'affinité de la protéine pour sa cible.

### 3-2-2-Le marquage radioactif par des isotopes métalliques

Pour la réalisation de ce type de marquage, on couple dans un premier temps un groupe prosthétique chélatant avec sa protéine. Puis, dans un second temps, on effectue le radiomaquage. Ici, le groupe prosthétique est constitué d'un agent chélatant bifonctionnel activé permettant la liaison à la protéine et la liaison au radionucleide.

Différents chélateurs existent, le DOTA (acide tétra-azacyclododécane-tétra-acétique) est considéré comme le plus fiable pour l'imagerie TEP, car il présente une bonne affinité et stabilité avec de nombreux radio-isotopes comme le $^{68}$Ga [36] ou le $^{64}$Cu [37].

# 4-Les anticorps et la radio-immunologie

## 4-1-Historique

Il y a plus d'un siècle, en 1890, Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato ont trouvé la présence d'une substance de neutralisation dans le sang qui pourrait contrer des infections. Cela a permis de découvrir que l'injection d'une faible dose de toxine diphtérique pouvait conférer à un individu naïf un état d'immunité [38]. Ainsi naissait la sérothérapie, initiant une révolution médicale : celle des anticorps thérapeutique. Ce terme d'anticorps fut utilisé par Paul Ehrlich en 1891 pour définir ces gammas globulines du sérum, et durant les années 1950, Rodney Porter décrit partiellement leurs structures [39]. Les plasmocytes, producteurs d'anticorps sont identifiés dans la même période par Fagreaus [40].

La radio-immunologie voit le jour dans les années 1940, lorsque la technique de marquage des protéines, sans en modifier leurs spécificités, par de l'iode-131 a été mise au point [41]. En 1953, c'est en utilisant cette technique que Pressman et Korngold démontrent que les anticorps s'accumulent préférentiellement dans la tumeur par rapport au tissu normal [42]. L'essor de cette méthode devient immense, surtout depuis les travaux effectués en 1960 par R. Yalow (ce qui lui valut le prix Nobel en 1977) et S. Berson qui développent le principe de dosages par radio-immunologie en mesurant des quantités infimes d'anticorps anti-insuline dans le plasma de patients diabétiques [43]. Il devint rapidement évident que cette méthode pouvait être utilisée pour doser des centaines d'autres substances biologiquement actives (virus, médicaments, protéines). Ainsi, son champ d'application se développa rapidement. En 1975, Kohler et Milstein révolutionnent la biologie en publiant une méthode permettant de créer efficacement des anticorps monoclonaux, technique dite des hybridomes [44]. Ces techniques ont suscité de gros espoirs pour l'utilisation de ces anticorps en imagerie ou en thérapie.

Dans le début des années 1970, pour la localisation par imagerie des marqueurs tumoraux dans des modèles animaux, il a été étudié l'utilisation des Ac polyclonaux marqués avec des radioisotopes. L'émergence de dispositifs d'imagerie à détection gamma et l'arrivée des

anticorps monoclonaux (souris puis chimérique souris-homme et enfin humain) a permis d'étendre ces recherches à la localisation de tumeurs chez l'homme [45].
L'intérêt majeur était donc de pouvoir identifier aisément des lésions métastatiques. Une multitude d'anticorps ou de fragments d'anticorps ont ainsi été développés pour l'immunoscintigraphie, où la première étude clinique à été effectuée vers les années 1980 [46].

## 4-2-Les différents fragments d'anticorps

Par leur spécificité contre des antigènes, les anticorps sont des agents utiles pour le diagnostic et le traitement du cancer. Leur utilité dans l'imagerie peut être limitée par leur grande masse (150 kDa), car ils subsistent plus longtemps dans la circulation (quelques jours à quelques semaines) et prennent de fait plus de temps pour s'accumuler de manière optimale dans les tumeurs (1 à 2 jours) [47]. En raison de l'amélioration des connaissances sur la modulation de leurs immunogenicité, pharmacocinétique, de la conjugaison avec divers agents d'exploration comme les radionucleides ; les anticorps et leurs différentes formes se révèlent un excellent outil pour cibler les antigènes tumoraux.

### 4-2-1-Fab'2 et Fab

Le Fab et le $F(ab')_2$, d'un poids respectif de 55 et 110 kDa, sont obtenus par voie enzymatique, par digestion enzymatique de la papaïne pour l'obtention de fragment Fab ou de la pepsine pour le fragment Fab'2.
Fab est formé de la chaîne légère entière ($V_L$+$C_L$) et d'une partie de la chaîne lourde ($V_H$+$C_H$1). Fab'2 est formé de deux fragments Fab reliés par un pont disulfure.

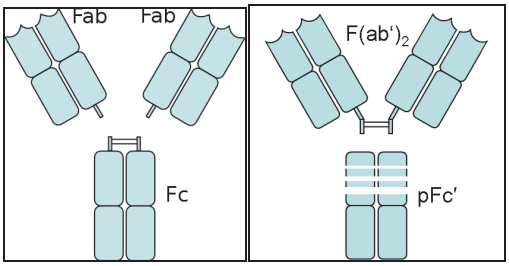



Figure 20 : Les fragment Fab et Fc (fragment constant des chaînes lourdes au-delà de la région charnière) sont obtenus par l'action enzymatique de la papaïne. Le Fab'2 et le pFc' (deux moitiés C terminales de la région Fc restant unies par des liaisons non covalentes) sont obtenus par l'action enzymatique de la pepsine.

Certains produits contenant ce type de fragment sont approuvés par la FDA (Food and Drug Administration). C'est le cas de l'arcitumomab couplé au $^{99m}$Tc, et dirigé contre l'antigène carcynoembryonnaire (CEA) pour le diagnostic des récidives de cancers colorectaux ; ou de l'imciromab , un fragment $^{111}$In-Fab se fixant à la myosine et utilisé pour le diagnostic des nécroses du myocarde. Le sulesomab (Leukoscan®), un fragment Fab' couplé au $^{99m}$Tc, est lui indiqué pour localiser une infection ou une inflammation des os pour des suspicions d'ostéomyélite.

Il existe d'autres fragments d'anticorps obtenus par ingénierie moléculaire.

### 4-2-2-scFv (single-chain-Fragment-variable)

Les scFv, de 25 kDa sont constitués de régions variables de chaînes lourdes et légères assemblées sur une même chaîne peptidique (VH+VL).

### 4-2-3-Minibody (scFv-CH3)

Le minibody est un fragment dimérique de 75 kDa, composé de deux monomères scFv reliés par une région constante (CH3).

## 4-2-4-Diabody, Triabody et Tetrabody

Le diabody est l'association de deux scFv, d'un poids de 50 kDa. Le diabody est composé de deux sites de liaison. Chaque site de liaison est formé par un domaine VH (variable de chaînes lourdes) d'un premier scFv relié au domaine VL (variable de chaînes légères) du second scFv.

La réduction de la longueur du peptide de liaison peut alors forcer l'association en trimère (triabody : 75 kDa) ou en tétramères (tetrabody : 110 kDa) [48].

## 4-2-5-Nanobody

Le Nanobody, d'environ 15 kDa, est composé d'un seul domaine dépourvu de chaîne légère et dont le site de liaison de l'antigène se situe uniquement dans l'extrémité N-terminale de la chaîne lourde (domaine VHH).
Les camélidés présentent la particularité de produire ce type d'anticorps spécifiques très affins [49].

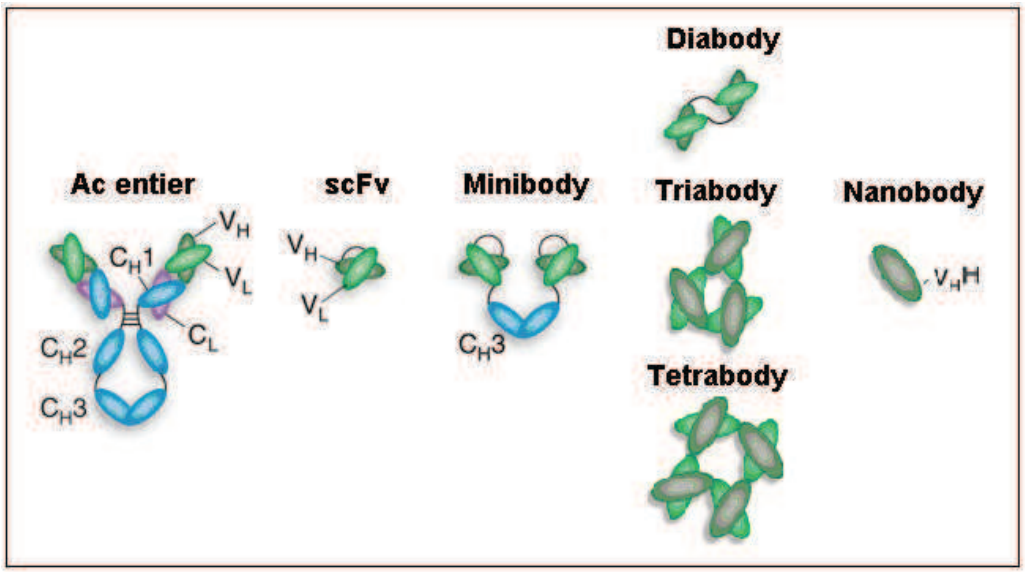



Figure 21 : Représentation des différents fragments d'Ac obtenus par ingénierie moléculaire. En vert clair les régions variables légères, en vert foncé les régions variables lourdes, en bleu les régions constantes lourdes et en violet les régions constantes légères.

## 4-2-6-Avantages / Désavantages

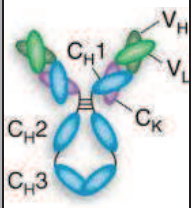
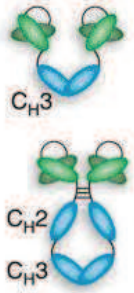
| | Anticorps entier | Fab | F(ab)2 | scFv | Diabody | Minibody ou (scFv)2-Fc | Nanobody |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Type d'Anticorps** |  | | | | |  | |
| **Avantages** | -Hautement spécifique et sensible sur les antigènes | -Ciblage de la tumeur rapide<br><br>-Pénétration tumorale efficace<br><br>-Faible bruit de fond<br><br>-Clairance sanguine rapide<br><br>-Moins immunogénique / anticorps intactes<br><br>-Temps d'imagerie : 2-5 heures après injection | -Pénétration tumorale efficace<br><br>-Faible bruit de fond<br><br>-Clairance sanguine rapide<br><br>-Temps d'imagerie : 4-5 heures après injection | -Adressage rapide<br><br>-Pénétration tumorale efficace<br><br>-Faible bruit de fond<br><br>-Clairance systémique rapide<br><br>-Très peu immunogène<br><br>-Délais pour l'imagerie : 1h postinjection | -Ciblage de la tumeur rapide<br><br>-Pénétration tumorale efficace<br><br>-Spécificité de liaison comparable a l'anticorps parent<br><br>-Bivalent : grande avidité<br><br>-Longue rétention dans la tumeur<br><br>-Faible bruit de fond<br><br>-Clairance systémique rapide<br><br>-Très peu immunogène<br><br>-Délais pour l'imagerie : 4-5h post-injection | -Bivalent : grande avidité<br><br>-Longue rétention dans la tumeur | -Ciblage de la tumeur rapide<br><br>-Pénétration tumorale efficace<br><br>-Faible bruit de fond<br><br>-Clairance systémique rapide<br><br>-Elimination rénale rapide<br><br>-Très peu immunogène<br><br>-Délais pour l'imagerie : 1-3h post-injection |
| **Inconvénients** | -Long temps de circulation<br><br>-Fort bruit de fond<br><br>-Délais pour l'imagerie : plusieurs jours post-injection<br><br>-Coût élevé | -Faible avidité tumorale<br><br>-Temps de circulation faible.<br><br>-Radiotoxicité rénale | -Radiotoxicité rénale | -Faible avidité tumorale<br><br>-Très faible temps de circulation<br><br>-Radiotoxicité rénale et hépatique | -Radiotoxicité rénale | -Long temps de circulation<br><br>-Fort bruit de fond<br><br>-Réponse immunitaire anti-souris<br><br>-Délais post-injection pour l'imagerie très variable : minibodies (18h) scFv-Fc (plusieurs jours) | -Faible avidité tumorale<br><br>-Très faible temps de circulation<br><br>-Radiotoxicité rénale |

Tableau 2: Représentation du design et des caractéristiques des différentes formes d'anticorps employés pour l'imagerie ciblée et en thérapeutique. Avantages et des inconvénients pour les différentes formes d'Ac. [29]

# 5-$^{89}$Zr-immuno-PET

Bien que le $^{18}$F (Fluor-18 ) soit l'isotope le plus commun en TEP, il en existe d'autres, comme l'iode-124 , Zirconium-89, Cuivre-64 , Technetium-94m , Brome-76 et Galium-68 [50] . La sensibilité 10 fois plus élevée de la TEP par rapport aux scanners SPECT classiques permet de détecter des isotopes à une concentration beaucoup plus faible [29]. Avec les avancées concernant la chimie de conjugaison et une meilleure disponibilité de radio-isotopes avec une plus longue demi-vie - tels que $^{124}$I ($t_{1/2}$ : 100,2 heures) et $^{89}$Zr ($t_{1/2}$ : 78,4 heures) - l'utilisation d'anticorps marqués utilisés en imagerie TEP, appelée immunoPET, a émergé comme une alternative prometteuse à la TEP métabolique classique. Contrairement au TEP classique, la réponse à l'immunoPET dépend de la présence d'une cible antigénique spécifique. Par conséquent, l'immunoPET présente une plus grande spécificité et peut également être utilisé pour obtenir des images de lésions tumorales qui présentent une faible activité métabolique [29].

## 5-1-Le Zirconium-89

### 5-1-1-Présentation

Le Zirconium-89 ($^{89}$Zr) est un radionucléide émetteur de positons à longue durée de vie, il lui a été trouvé des applications scientifiques et médicales pour la détection et la révélation de lésions cancéreuses *via* l'imagerie PET [51-52]. Le $^{89}$Zr a une plus longue durée de vie que la plupart des autres émetteurs de positons, ceci permet de pouvoir l'utiliser pour l'imagerie TEP en association, par exemple, avec un anticorps monoclonal. Le $^{89}$Zr est un isotope prometteur pour l'utilisation en TEP, il offre une excellente sensibilité et une bonne quantification des Ac, de souris ou humains. Le $^{89}$Zr-immuno-PET pourrait s'avérer être un outil essentiel pour la recherche, les hôpitaux et les industries pharmaceutiques.

## 5-1-2-Caractéristiques physiques

Le $^{89}$Zr possède des caractéristiques idéales pour le marquage d'Ac entiers et pour visualiser leur distribution par un examen de TEP. Sa demi-vie physique longue (78.4h) correspond au temps nécessaire à l'Ac pour atteindre un rapport tumeur/bruit optimal.
Bien que la désintégration du $^{89}$Zr engendre des rayonnements γ de 909 keV avec 99% d'abondance, il a été montré que ceux-ci n'interférent pas avec les émissions β+ (395kev ; 23% abondance) du point de vue de l'imagerie TEP [52-53].

De plus, le $^{89}$Zr est un isotope résident, ce qui signifie qu'il reste piégé à l'intérieur de la cellule cible si celui-ci est internalisé. Il est connu que $^{89}$Zr réside dans une certaine mesure dans les organes catabolisant les Ac, tels que le foie, la rate et les reins [54].

| Radiation type | Energy (keV) | Radiation intensity (%) |
|---|---|---|
| β+* | 395.5 | 22.74 |
| Auger-L | 1.91 | 79.00 |
| Auger-K | 12.7 | 19.47 |
| γ-annihillation | 511.0 | 45.48 |
| γ | 909.15 | 99.04 |
| γ | 1620.8 | 0.07 |
| γ | 1657.3 | 0.11 |
| γ | 1713.0 | 0.75 |
| γ | 1744.5 | 0.12 |

Tableau 3 : Données physiques de $^{89}$Zr [55]

## 5-1-3-La production du $^{89}$ Zr

Comme le précise Verel [53], le $^{89}$Zr est principalement produit par une réaction nucléaire en yttrium naturel ($^{89}$Y), et ce à l'aide d'un cyclotron biomédical (Belgique, Pays-Bas). En bref, le $^{89}$Y cible est bombardé avec des protons de 14 MeV pendant 2 à 3h (65-80μA) tandis que le support cible est refroidi avec de l'eau. Les cibles $^{89}$Y sont préparées par pulvérisation d'une couche de $^{89}$Y sur un support de cuivre.
Le rendement moyen permet d'obtenir des lots de forte activité (près de 10GBq). Avec de telles tailles de lot, un grand nombre d'études immuno-TEP peut être réalisé une fois le

produit réceptionné dans les services de médecine nucléaire, sachant que les patients recevront de 37 à 74 MBq de $^{89}$Zr-Ac.

La purification de $^{89}$Zr permet d'exclure l'$^{89}$Y, l'$^{88}$Y et d'autres impuretés radionucléidiques et est effectuée par chromatographie d'affinité en utilisant une colonne d'hydroxamate. Le $^{89}$Zr est élué par la colonne en utilisant 1 M d'acide oxalique, permettant d'acquérir un produit avec plus de 99,9 % de pureté radioactive (tableau n°4). Afin d'éviter d'utiliser l'acide oxalique potentiellement toxique de ce processus, d'autres acides ont été également testés. Les résultats ont montré que, en dépit de son potentiel toxique, l'acide oxalique est le trans-chélateur le plus approprié, car il peut être parfaitement éliminé lors d'une étape de purification ultérieure par une colonne PD-10, pendant le marquage de l'Ac [53].

γ-Spectroscopic Analysis of $^{89}$Zr and Its Purification by Hydroxamate Column

| Isotope | Half-life (d) | Main γ-energies MeV | Main γ-energies % Abundance[E] | Crude $^{89}$Zr solution[A] (% activity ± SD) | Waste fractions[B] (% activity ± SD) | Purified $^{89}$Zr solution[C] (% activity ± SD) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $^{89}$Zr | 3.27 | 0.511 | 45.3 | 99.98 ± 0.0045 | 1.0 ± 1.0 | 97.0 ± 3.3 |
| | | 0.909 | 99.9 | | | |
| | | 1.202 | 0.014[F] | | | |
| | | 1.622 | 0.070[F] | | | |
| | | 1.657 | 0.100 | | | |
| | | 1.713 | 0.769 | | | |
| | | 1.744 | 0.130 | | | |
| $^{89}$Zr | 83.4 | 0.393 | 100 | $1.5 \pm 1.8 \times 10^{-4}$ | $1.2 \pm 2.3 \times 10^{-5}$ | $2.2 \pm 2.2 \times 10^{-4}$ |
| $^{88}$Y | 106.64 | 0.898 | 93.4 | $6.0 \pm 5.1 \times 10^{-5}$ | $6.2 \pm 5.5 \times 10^{-5}$ | ND |
| | | 1.836 | 99.3 | | | |
| $^{48}$V | 16.24 | 0.511 | 100 | $2.9 \pm 0.3 \times 10^{-3}$ | $3.1 \pm 0.3 \times 10^{-3}$ | ND |
| | | 0.984 | 100 | | | |
| | | 1.312 | 97.5 | | | |
| $^{56}$Co | 78.76 | 0.511 | 39.7 | $8.9 \pm 4.4 \times 10^{-4}$ | $9.7 \pm 4.3 \times 10^{-4}$ | ND |
| | | 0.847 | 99.9 | | | |
| | | 1.238 | 67.0 | | | |
| $^{65}$Zn | 243.9 | 0.511 | 2.92 | $7.1 \pm 4.1 \times 10^{-5}$ | $6.9 \pm 5.3 \times 10^{-5}$ | ND |
| | | 1.116 | 50.7 | | | |
| $^{156}$Tb | 5.34 | 0.199 | 37.4 | $2.6 \pm 0.5 \times 10^{-3}$ | $3.3 \pm 0.5 \times 10^{-3}$ | ND |
| | | 0.534 | 61.2 | | | |
| | | 1.222 | 29.4 | | | |

[A]Total amount of activity found in crude solution is set at 100%; data are mean ± SD of 5 productions.
[B]Consisting of flow-through (after loading crude $^{89}$Zr solution onto hydroxamate column), HCl fraction, and water fraction.
[C]Consisting of five 1 mol/L oxalic acid fractions of 0.5 mL.
[E]Complete list of found γ-energies of $^{89}$Zr; resulting from 22.7% β$^+$ abundance, maximum β$^+$ energy = 0.897 MeV.
[F]These data are from this study; γ-energies with abundance of 0.1% or higher were found to be in full accordance with γ-energies reported by International Commission on Radiological Protection (5).
ND = not detectable, i.e., below 10 Bq.

Tableau 4 : Analyse spectrométrie gamma du $^{89}$Zr et sa purification par colonne d'hydroxamate. [53]

## 5-1-4-Comparaison à l'$^{124}$I

L'$^{124}$I pourrait également être utilisé comme une alternative possible à ce type d'imagerie à long terme, présentant une demi-vie de 4,18 jours. Il est déjà utilisé pour l'immuno-PET en clinique depuis plus de15 ans. C'est Frey qui, le premier, l'utilise en 1985 pour visualiser *in vivo* la thyroïde humaine [56].

Il présente des fortes énergies principales de positrons aboutissant à une perte relativement importante de la résolution spatiale de 2,3 mm par rapport au $^{89}$Zr qui, lui, avec des énergies de positrons moins importantes et une perte de résolution spatiale intrinsèque de 1,0 mm, donne de bien meilleurs résultats d'imagerie [57].

De plus, $^{124}$I génère en quantité significative des photons de haute énergie (603 keV (63,0%), 1691 keV (10,9%) et 723 keV (10,4%)). Les photons d'énergie 603 keV, proches de ceux de 511 keV, peuvent entraîner des fausses coïncidences et donc entrainer un bruit de fond, à la différence du $^{89}$Zr. Ainsi, l'application de $^{124}$I nécessite l'utilisation de techniques de reconstruction d'image appropriées afin de réaliser une qualité d'image raisonnable [57].

A noter que, contrairement au $^{89}$Zr, l'iode-124, lui, est libéré de la cellule cible s'il y a une internalisation de l'Ac. En effet, le catabolisme intracellulaire et la deshalogénation de l'anticorps se traduisent par la clairance de l'iode radioactif du tissu cible, entrainant une perte de signal [54].

| Rad. Type | Energy (keV) | Radiation Intensity (%) |
|---|---|---|
| B+ | 685.9* | 11 |
| B+ | 973.6* | 12 |
| G-AN | 511 | 45.96 |
| G | 602.72 | 62.9 |
| G | 722.78 | 10.35 |
| G | 1509.49 | 3.13 |
| G | 1691.02 | 10.88 |

*Mean ß-energy

Tableau 5 : Données physiques de $^{124}$I. [58]

Ainsi, pour l'imagerie par immunoTEP couplée à un anticorps entier, le Zirconium-89 est peut-être l'un des plus prometteurs métallo-radionucléides pour l'imagerie *in vivo* de cancer [59].

## 5-2-Anticorps et imagerie *via* $^{89}$Zr-immuno-PET

### 5-2-1-Format d'Ac adapté

C'est en 1983 qu'il a été suggéré pour la première fois d'utiliser du $^{89}$Zr pour marquer un anticorps [60].
Ce sont les différentes données de pharmacocinétiques, d'immunogenicité qui permettent d'effectuer le choix des meilleurs formats d'anticorps pour l'imagerie *in vivo*. Comme cela est décrit dans l'article de Knowles [61], de nombreuses études ont permis de donner des résultats prometteurs concernant l'utilisation d'anticorps entiers marqués au $^{89}$Zr, pour les imageries immuno-PET. Ce avec de nombreux produits, le $^{89}$Zr -N- succinyldesferrioxamine couplé à l'anticorps chimérique antiCD44v6 U36 pour des cancers ORL [52], le $^{89}$Zr - NSucDf – trastuzumab pour la détection de l'expression de HER2 [62-63].
A noter que, de par leur clairance lente, l'imagerie avec des anticorps entiers nécessite généralement la réalisation de l'image 4 à 7 jours après l'injection.

Pour les variants d'anticorps conçus par ingénierie, des études précliniques ont démontré qu'ils peuvent s'accumuler rapidement dans les tumeurs tout en s'éliminant rapidement du sang, ce qui permet d'effectuer l'imagerie le jour même, voire le lendemain. De plus, ces fragments ont présenté une meilleure pénétration de la tumeur, une cinétique d'élimination plus rapide et un excellent ratio tumeur/sang, qui sont des propriétés désirées pour un traceur d'imagerie.

Les courbes présentant les % doses incubées/g dans la tumeur et dans le sang sont observables dans la figure n°21. On observe que pour les anticorps intacts, l'imagerie à 96-168 heures offre un contraste optimal avec un %ID/g tumeur/sang important. Les fragments d'anticorps tels que scFv-Fc de phénotype sauvage (72 à 120 heures), scFv-Fc mutant (12 à 48 heures), minibodies (8 à 48 heures), et diabodies (4 à 8 heures) sont utilisables pour obtenir des images à contraste élevé à des temps inférieurs [61].

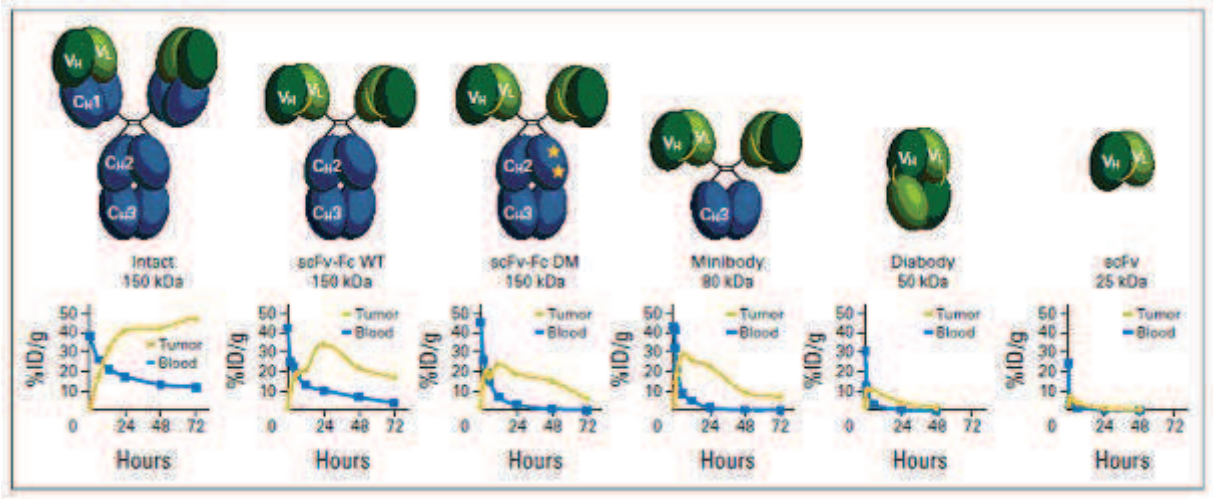



Figure 22: Courbes du % de la dose incubée/g en fonction du temps (Heures) dans la tumeur et dans le sang. Les demi-vies des agents utilisés pour observer une imagerie TEP peuvent être modifiées en supprimant certains domaines constants et créer des fragments de tailles variées. Le temps optimal pour obtenir des images est le temps où il y a une forte captation tumorale associée à une faible captation sanguine. [61]

Pour l'immuno-PET, l'émetteur de positons doit être approprié, c'est-à-dire qu'il doit avoir une demi-vie ($t_{1/2}$) compatible avec le temps nécessaire pour atteindre une biodisponibilité et un ratio captation tumorale/captation non tumorale optimal (typiquement 2 à 4 jours avec un anticorps entier) [53].

Le $^{89}$Zr présente donc bien une demi-vie adaptée pour l'utilisation d'anticorps entier pour le ciblage des lésions désirées.

## 5-2-2-Etudes

En 2012, Vosjan [55] recense de nombreuses études, la plupart effectuées durant les années 2000. On y retrouve plus de 20 études précliniques et plus de 25 études cliniques effectuant des essais avec des produits associant le $^{89}$Zr et un anticorps (tableau n°6 et n°7). D'autres études précliniques ont par ailleurs été publiées avec, par exemple en 2005, l'utilisation de Zr-Cetuximab ciblant HER-1 pour suivre la biodistribution des isotopes thérapeutiques $^{90}$Y et $^{177}$Lu [64]. A noter la première étude clinique humaine en 2006 [52] pour la détection de tumeurs primaires et de métastases des ganglions lymphatiques pour des cancers ORL.

| # | Drug | Target |
|---|---|---|
| 1 | $^{89}$Zr-ranibizumab | VEGF A |
| 2 | $^{89}$Zr-R1507 | IGF-1R |
| 3 | $^{89}$Zr-J591 | PSMA |
| 4 | $^{89}$Zr-cG250 | CA IX |
| 5 | $^{89}$Zr-cmAb U36 | CD44v6 |
| 6 | $^{89}$Zr-bevacizumab | VEGF |
| 7 | $^{89}$Zr-DN30 | c-Met |
| 8 | $^{89}$Zr-fresolimumab | TGF-β |
| 9 | $^{89}$Zr-FK-3PEG | $\alpha_v\beta_3$ integrin |
| 10 | $^{89}$Zr-FK | $\alpha_v\beta_3$ integrin |
| 11 | $^{89}$Zr-[FK](2)-3PEG | $\alpha_v\beta_3$ integrin |
| 12 | $^{89}$Zr-[FK] | $\alpha_v\beta_3$ integrin |
| 13 | $^{89}$Zr- trastuzumab | HER2 |
| 14 | $^{89}$Zr-cetuximab | EGFR |
| 15 | $^{89}$Zr-TRC105 | CD105 |
| 16 | $^{89}$Zr-hRS1 | EGP-1, TROP2 |
| 17 | $^{89}$Zr-7E11 | PSMA or NAALADase |
| 18 | $^{89}$Zr-7D12 | EGFR |
| 19 | $^{89}$Zr-cG250-F(ab')$_2$ | CA IX |
| 20 | $^{89}$Zr-panitumumab | EGFR |
| 21 | $^{89}$Zr-nanocolloidal albumin | sentinel node |
| 22 | $^{89}$Zr-anti-B220 | anti-B-cell |

Tableau 6 : Etudes précliniques recensées par Vosjan de 2003 à 2012 [55].

| | Drug | Target/ Effect of | Cancer/ Disease | No patient | Dose | Institute [ref] | Country |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | $^{89}$Zr-cmAb-U36 | CD44v6 | HNSCC | 20 | 74 MBq/ 10 mg | VUmc [6,7] | NL |
| 2 | $^{89}$Zr-huJ591 | PSMA | Prostate | 50 | unknown | MSKCC | USA |
| 3 | $^{89}$Zr-RO5323441 | PlGF | Glioblastoma | 7 | x MBq/ 5 mg | UMCG | NL |
| 4 | $^{89}$Zr-bevacizumab | VEGF/ HSP90 | Breast | 11 | unk | UMCG | NL |
| 5 | $^{89}$Zr-trastuzumab | HER2 | Breast | 11 | unknown | UMCG [9,12] | NL |
| 6 | $^{89}$Zr-trastuzumab | HER2/ HSP90 | Breast | 11 | unknown | UMCG | NL |
| 7 | $^{89}$Zr-bevacizumab | VEGF | Neuroendocrine | 14 | 37 MBq/ 5 mg | UMCG | NL |
| 8 | $^{89}$Zr-GC1008 | TGF-β | Glioblastoma | 12 | 37 MBq/ 5 mg | UMCG | NL |
| 8b | $^{89}$Zr-GC1008 | TGF-β | Glioblastoma | 12-20 | 37 MBq/ 5 mg | UMCG | NL |
| 9 | $^{89}$Zr-bevacizumab | VEGF | Renal Cell CA | 14 | 37 MBq/ 5 mg | UMCG | NL |
| 10 | $^{89}$Zr-bevacizumab | VEGF | Renal Cell CA | 26 | unknown | UMCG | NL |
| 11 | $^{89}$Zr-bevacizumab | VEGF | Breast | 23 | 37 MBq/ 5 mg | UMCG | NL |
| 12 | $^{89}$Zr-bevacizumab | VEGF | Von Hippel-Lindau | 30 | unknown | UMCG | NL |
| 13 | $^{89}$Zr-RO5429081 | CD44 | CD44-positive | 25-30 | 37 MBq/ 1 mg | Roche | NL |
| 14 | $^{89}$Zr-trastuzumab | HER2/ T-DM1 | Breast | 60 | unknown | Bordet | B/NL |
| 15 | $^{89}$Zr-trastuzumab | HER2 | Breast | 20 | unknown | Bordet | B |
| 16 | $^{89}$Zr-cetuximab | EGFR | Stage IV CA | 12 | unknown | Maastricht | NL |
| 17 | $^{89}$Zr-rituximab | CD20 | Non hodgkin | 34 | 74 MBq/ 5 mg | Bordet | B |
| 18 | $^{89}$Zr-rituximab | CD20 | Rheumatology | 15 | 18 MBq/ 10 mg | VUmc | NL |
| 19 | $^{89}$Zr-cetuximab | EGFR | NSCLC | | 74 MBq/ 5 mg | VUmc | NL |
| 20 | $^{89}$Zr-bevacizumab | VEGF | Glioblastoma (Ped) | 5 | 18-37 MBq/ 2-5 mg | VUmc | NL |
| 21 | $^{89}$Zr-cetuximab | EGFR | HNSCC | 268 | unknown | VUmc | NL/GB/ S/F/E |
| 22 | $^{89}$Zr-rituximab | CD20 | MS | 8 | 18 MBq/ 10 mg | VUmc | NL |
| 23 | $^{89}$Zr-ofatumumab | CD20 | Lymphoma | 15 | 74 MBq/ 10 mg | VUmc | NL |
| 24 | $^{89}$Zr-rituximab | CD20 | Lymphoma | 30 | 74 MBq/ 10 mg | VUmc | NL |
| 25 | $^{89}$Zr-cetuximab | EGFR | Colorectal | 38 | 37 MBq/ 10 mg | VUmc | NL |
| 26 | $^{89}$Zr-bevacizumab | VEGF/FAZA | NSCLC | 15-20 | 37 MBq/ 5 mg | VUmc | NL |
| 27 | $^{89}$Zr-nanocoll | sentinel node | HNSCC | 5-10 | 5 MBq | VUmc | NL |

Tableau 7 : Etudes cliniques recensées par Vosjan de 2006 à 2012 [55].

# 6-Applications au marquage d'un Ac pour le diagnostic différentiel de lymphome de sous-type ABC

Le projet présenté regroupe les différents items que nous avons décrits précédemment, associant la pathologie lymphoïde, l'immunologie et la radiopharmacie. Il s'agira d'effectuer la mise en place, le développement possible et l'intérêt d'un nouvel anticorps marqué au $^{89}Zr$ pour le diagnostic différentiel des LDGCB ABC / GCB.
Nous présenterons les options choisies pour obtenir la synthèse de ce nouvel anticorps marqué.

## 6-1-Choix de la cible

### 6-1-1-Inhibition voie NF-κB

Nous avons vu précédemment la différence de réponses aux traitements entre les différents sous-types de LDGCB. La capacité de NF-κB à inhiber les réponses à des agents chimiothérapeutiques peut contribuer au comportement clinique réfractaire des LDGCB ABC. En outre, l'inhibition de NF-κB pourrait s'associer à la chimiothérapie pour tuer les cellules tumorales.

D'ores et déjà, la capacité des récepteurs au TNF à induire la mort des cellules a été une piste séduisante à exploiter. En effet, il semble aisé d'agir au niveau des récepteurs par des molécules solubles ou des anticorps agonistes et ainsi de moduler l'apoptose de la cellule tumorale. De nombreux arguments suggèrent donc l'intérêt d'inhiber la voie NF-κB en cancérologie, et notamment en hématologie, mais les essais cliniques sont encore très rares.

### 6-1-2-TACI

Il a été démontré que le récepteur TACI du deuxième groupe (transmembrane activator and calcium-signal modulating cyclophilin ligand (CAML) interactor) et ses ligands BAFF (B-cell

activating factor) et APRIL (a proliferating-induced ligand) jouent un rôle dans certaines réponses immunitaires humorales [65].
BAFF et APRIL, membres de la superfamille du TNF, se lient à TACI (TNFR) qui est exprimé sur les lymphocytes B et les lymphocytes T activés. Ils modulent l'activation, la survie et le développement des cellules B [66]. Tous deux sont donc des éléments clefs pour la survie et la fonction des lymphocytes B.
Une équipe coréenne a étudié, parmi 66 patients présentant un Lymphome diffus à grandes cellules B tous traités par R-CHOP, les taux sériques de ces deux modulateurs de l'immunité B. Les taux sériques de BAFF sont globalement le double de ceux observés parmi les témoins. Sous réserve d'une validation sur une série plus importante et avec peut-être un recul médian plus important, BAFF semble donc être un facteur pronostique important dans les LNH diffus à grandes cellules B, contrairement à APRIL qui lui aurait une valeur pronostique majeure dans la LLC [67].

### 6-1-3-Autres pistes

A noter quelques pistes de traitement émergent pour le traitement des LDGCB ABC comme celles présentées par Willems [68].

- Par l'inhibition d'IKKβ.
- Par l'inhibition d'IKKα (potentialisant l'effet des inhibiteurs d'IKKβ).
- Par l'inhibition de NFκB par les inhibiteurs du proteasome (bortezomib).
- Par inhibition de l'ubiquitine ligase (diminuant possiblement la dégradation d'IκBα).
- Par l'inhibition de MALT1 (bloquant l'activité NF-κB).

## 6-2-Choix de l'anticorps

Nous avons vu que le $^{89}$Zr présente une demi-vie adaptée pour l'utilisation d'anticorps entier pour le ciblage des lésions tumorales recherchées. En effet, son temps de demi-vie correspond au temps nécessaire à un anticorps entier pour obtenir un ratio captation tumorale/captation non tumorale optimal [53].

### 6-2-1-Anticorps anti TACI

Afin de pouvoir atteindre le plus spécifiquement possible notre cible, le TNFR TACI, nous utiliserons un anticorps anti-TACI.

### 6-2-2-Rituximab

L'obtention en très faible quantité et à un prix important de l'Ac anti-TACI nous contraint à débuter notre projet en utilisant un Ac de même nature, bien plus facile à obtenir et à moindre coût. Le Rituximab nous permettra de valider nos méthodes de couplage avec un chélateur et notre radiomarquage par du $^{89}$Zr.
Le Rituximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre l'antigène CD20 présent à la surface des cellules B, du stade pré-B au stade de lymphocyte B mature.
Il s'agit d'un anticorps chimérique composé de domaines constants humains (chaîne lourde γ1 et chaîne légère kappa) et de domaines variables murins. Le Rituximab est un anticorps anti-CD20 utilisé presque exclusivement en pratique clinique.

## 6-3-Choix chélateur

### 6-3-1-DTPA ; Porphyrine

Dans les années 1980, le DTPA [69] et la porphyrine [70] sont utilisés comme agents chélatants pour associer le $^{89}$Zr à un anticorps.

### 6-3-2-Desferal (Df)

En 1992, 1996 et 1997. Meijs évalue *in vitro* [71], décrit une méthode de marquage [72] et observe la distribution chez des souris [73] d'un anticorps marqué au $^{89}$Zr *via* le chélateur desferal.
Cette méthode lui paraît rapide, efficace, et permettrait une haute accumulation au niveau d'une tumeur.

### 6-3-2-1-Méthode

- Insertion d'un groupe maleimide sur un Ac grâce au SMCC (succinimidyl-4-N-maleimidomethyl cyclohexane-1-carboxylate)

- Le Groupe amine du Df est modifié avec SATA (*N*-succinimidyl-S-acetylthioacetate) pour donner un Thioester

- Le Thioester réagit avec groupe maleimide

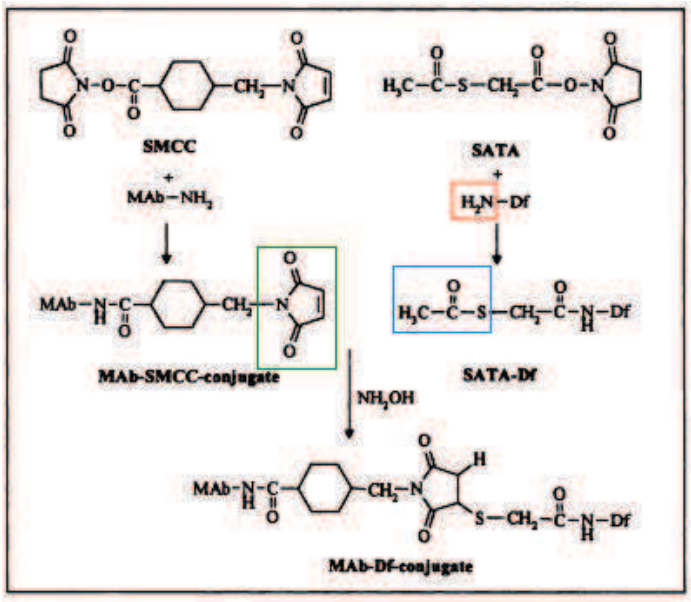



Figure 23 : Présentation schématique du couplage entre le chélateur (Df) et un anticorps. [72]

## 6-3-3-N-succinyldesferrioxamine B (N-SucDf)

En 2003, Verel [53] décrit les différents problèmes rencontré avec le Df et présente un nouveau protocole *via* un nouveau chélateur.
Il décrit une instabilité en *in vitro* et en *in vivo* pour l'AcU36-**SMCC-SATA-Df-**$^{89}$Zr. Cette instabilité est due à l'ouverture des cycles succinimide, responsables de la libération du chélateur, résultant donc d'une sous « livraison » de Zr à la tumeur.

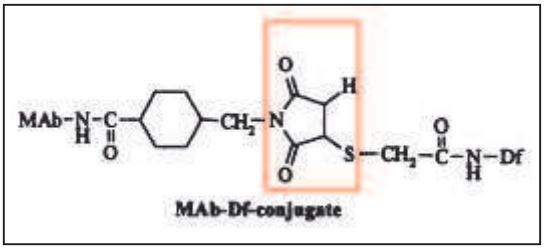



Figure 24 : Structure chimique de l'anticorps chélaté. En rouge le cycle succinimide.

Le nouveau protocole présenté par Verel, se déroule en 6 étapes, permettant la formation d'un pont amide stable entre le chélateur et l'Ac.

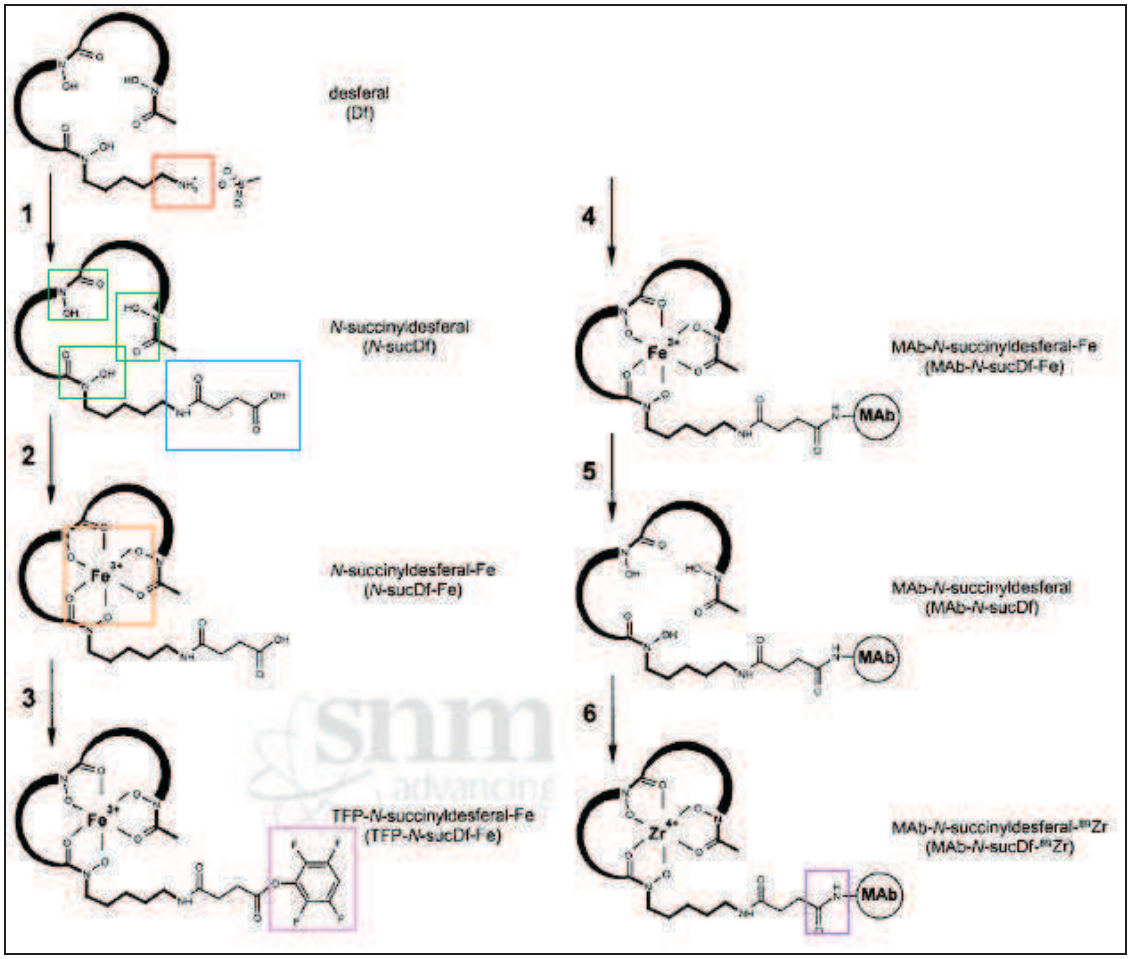



Figure 25 : Schéma des six étapes pour la synthèse du Zr-N-SucDf-Ac. 1-Les groupes amines présents sur Df sont convertis en acide carboxylique fonctionnel. 2-Les groupes hydroxamates de N-sucDf sont bloqués par formation d'un complexe avec Fe(III). 3-Estérification du complexe N-sucDf-Fe par le TFP-ester. 4-Couplage à l'Ac. 5-Fe(III) retiré par réduction en Fe(II) par EDTA. 6-Ac-NsucDf radiomarqué par $^{89}$Zr (pH 7.2-7.4 pendant 30 minutes étuve). [53]

Grâce à cette méthode, Verel obtient une conjugaison optimale avec un respect de la pureté radiochimique, de l'intégrité, de l'immunoréactivité et de la stabilité de la préparation. De plus, après injection de l'AcU36-***N*-sucDf-**$^{89}$Zr des petites tumeurs sont visualisées chez des souris [53].

## 6-3-4-Df-Bz-NCS

En 2009, Perk [74] présente un nouveau chélateur bifonctionnel, le *p*-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine, qu'il compare au N-SucDf en le couplant avec 3 anticorps différents. La préparation de ce marquage est simplifiée par une méthode en 2 étapes, et ceci grâce à un chélateur qui ne nécessite pas de modifications et est en quelque sorte « prêt à l'emploi ».

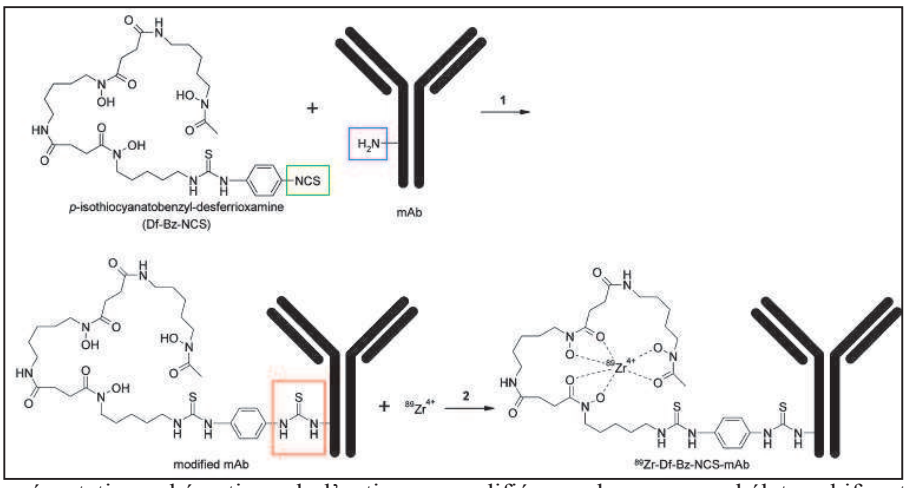



Figure 26 : Représentation schématique de l'anticorps modifié avec le nouveau chélateur bifonctionnel Df-Bz-NCS par le couplage du Groupe Isothiocyanate du chélateur avec l'amine primaire de l'Ac pour former un pont thiourée (1) puis intervient le radiomarquage par le $^{89}$Zr (2). [74]

Ce nouveau chélateur permet une préparation plus simple et plus rapide, respectant l'intégrité et l'immunoréactivité de l'Ac. Il ne présente pas de différence significative avec le N-SucDf, pour sa stabilité (*in vitro* et *in vivo*), sa biodisponibilité et pour sa captation par les lésions tumorales (images TEP).

## 6-3-5-Résumé et décision

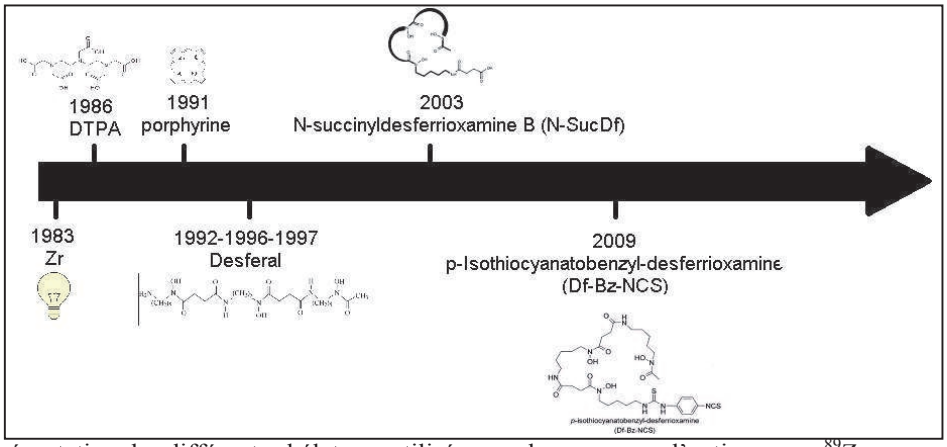



Figure 27: Présentation des différents chélateurs utilisés pour le marquage d'anticorps au $^{89}$Zr au cours du temps.

Afin d'effectuer le marquage d'Ac avec le $^{89}$Zr, notre choix s'oriente donc naturellement vers le chélateur *p*-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine.

# 6-4-Choix protocole préparation

Pour le choix du protocole de préparation, nous avons comparé deux protocoles [75-76]. Présenté dans deux articles, ils utilisent tous deux le chélateur Df-Bz-NCS.

| Couplage Ac-Chélateur | Vosjan [75] Nature Protocols | Natarajan [76] Bioconjugate Chemistry |
|---|---|---|
| Excès molaire de Df-Bz-NCS | x3 | x5 |
| PH | 9 | 8.5 |
| Incubation (min) | 37° - 30 | 25° - 45 |
| Chélate/ritux | 1.5 | 1.5 |
| Marquage $^{89}$Zr | | |
| PH | 6.8-7.2 | 7 |
| Incubation (min) | 60 | 60 |
| Rendement global | >80% ; Mean 87% ± 4.6% | >75% ; Mean 77±2.1% |
| PRC | > 95% ; Mean 97.5 ± 0.7% | >95% (Mean 98±0.7%) |

Tableau 8 : Comparatif des deux méthodes. [75-76]

Nous avons sélectionné le protocole de Vosjan car il est dans cet article [75] excellemment bien décrit et les différentes étapes sont succinctement présentées. De plus, un excès molaire de 3 de Df-Bz-NCS est nécessaire comparativement au 5 pour Natarajan. Le rendement global est notamment meilleur pour le protocole de Vosjan.

# Matériels et Méthodes

1-Matériels ..... 62
1-1-Lignées cellulaires ..... 62
1-2-Le Couplage ..... 63
1-3-Radiomarquage ..... 65
1-4-Expérience sur le petit animal ..... 66
2-Méthodes ..... 68
2-1-Lignées cellulaires ..... 68
2-2-Le Couplage ..... 72
2-3-Le Radiomarquage ..... 78
2-4-Expérience sur le petit animal ..... 84

Dans cette partie nous décrierons les différentes méthodes ayant permis d'étudier et d'utiliser les lignées cellulaires sélectionnées. Puis nous présenterons les étapes qui nous ont permis d'obtenir le couplage du $^{89}Zr$ avec nos deux anticorps : le Rituximab et l'Anti-TACI. Nous présenterons par la suite les contrôles effectués sur les produits obtenus ainsi que les résultats suites à ces expériences.

# 1-Matériels

## 1-1-Lignées cellulaires

Quatre lignées cellulaires ont été sélectionnées:

- La lignée Su-DHL16 (DHL) est issue d'un lymphome humain diffus à grandes cellules B acquises *via* l'ATCC (American Type Culture Collection).
- La lignée RL est issue d'un lymphome humain diffus à grandes cellules B acquises *via* l'ATCC (American Type Culture Collection).
- La lignée VAL est issue d'un lymphome diffus d'un patient du Centre Henri Becquerel (CHB).
- La lignée REC est issue d'un lymphome du manteau d'un patient du CHB.

Elles ont été congelées en attendant leur extraction et leur dosage

### 1-1-1-Culture cellulaire – viabilité et comptage

Le comptage cellulaire est effectué sur nos lignées sous une hotte à flux laminaire. Les lignées sont cultivées dans des flasques (BD Biosciences) contenant un milieu de culture : Milieu RPMI 1640 (Eurobio) ; Sérum de Veau Fœtal (SVF) 10% (Eurobio) ; Glutamine (Eurobio), Antibiotiques (pénicilline + streptomycine ; Sigma Aldrich). Pour visualiser les cellules au microscope, nous aurons besoin de Bleu Trypan (Eurobio) et de Tampon phosphate salin (PBS, Thermo Scientific). Un échantillon sera ensuite placé sur une lame de Kova pour faire le comptage.

## 1-1-2-Test lignées cellulaires:

### 1-1-2-1-FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Un cytomètre en flux  de chez Beckman est utilisé pour faire l'expérience du FACS sur nos lignées cellulaires. Les cellules sont mises au contact de PBS (pastilles, Sigma / P4417, dans 1 litre d'eau stérile) avec ou sans Anticorps anti-CD20 (Beckman).

### 1-1-2-2-RT-MLPA (Reverse Transcriptase-Multiplex ligation-dependent probe amplification)

Les ARN ont été extraits à partir de biopsies ganglionnaires de LDGCB. La réaction de reverse transcription est effectué grâce à un Kit de RT (Invitrogen) composé de tampon 5X, de DTT 100 mM, de dNTPs (deoxynucléotide) 10 mM, d'amorces hexamères aléatoires à 100 µM et d'une reverse transcriptase MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus). L'hybridation des sondes de MLPA est effectuée avec du RT-MLPA probemix (MRC Holland). La ligation des sondes hybridées est réalisée grâce à un mélange ligase composé de SALSA-Ligase 65 Buffer A, SALSA-Ligase Buffer B, RNAse et SALSA-Ligase 65 (MRC-Holland). L'amplification des sondes liguées est effectuée avec le mix de PCR Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific). Pour l'analyse, les produits de PCR sont mélangés avec le marqueur de taille GeneScan 400HD ROX (lifetechnologies) puis séparés par électrophorèse capillaire sur un ABI 3130 analyzer (Applied Biosystems).

# 1-2-Le Couplage

## 1-2-1-Couplage Df-Bz-NCS + Ac

L'essai de couplage est réalisé en utilisant du Rituximab comme modèle (Mabthera®, ROCHE). Celui-ci est obtenu à la pharmacie du CHB. Puis, le couplage est réalisé avec un anticorps Anti-TACI de rat obtenu *via* la société LSBio (LS-C89973). Ils seront couplés avec le chélateur *p*-isothiocyanatobenzyldesferrioxamine, Macrocyclics. Ce chélateur sera dans un premier temps dilué dans du dimethyl sulfoxide, DMSO 99,8% (ACROS ORGANICS). Une solution de carbonate de sodium dépourvue de trace métallique (Sigma Aldrich) est ajoutée à

l'anticorps pour atteindre le pH souhaité. Une colonne PD-10 (GE Healthcare) est conditionnée par une solution composée d'acétate de sodium (Normapur) et d'acide gentisique 99%, (Acros Organics) avant l'ajout de l'échantillon Ac-chélateur.

## 1-2-2-Contrôle Qualité sur couplage

### 1-2-2-1-Extraction et dosage des protéines

Les protéines sont extraites de nos lignées cellulaires par un tampon d'extraction RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) obtenu au laboratoire de biopathologie du CHB. Ce tampon est composé de NaCl, NP40, Tris-HCl, SDS (Sigma-Aldrich) ajouté à un cocktail d'inhibiteur de protéases et d'inhibiteur de phosphatases (Thermo Scientific). La préparation de la gamme d'étalonnage du spectrophotomètre est faite avec un Kit BCA (Pierce) de dosage de protéines contenant un Réactif A (carbonate de sodium, bicarbonate de sodium, acide bicinchoninique et tartrate de sodium dans 0,1M d'hydroxide de sodium), un Réactif B (4% sulfate cuprique) et du BSA (albumine de sérum bovin) à 2 mg/ml. Pour les dilutions de nos protéines nous utiliserons du PBS. Nos échantillons seront analysés avec un spectrophotomètre (Jenway).

### 1-2-2-2-Western Blot (WB)

Le matériel disponible pour effectuer le western blot provient essentiellement de chez Biorad. Les protéines à faire migrer seront traitées par du Bleu 5X et du DTT (dithiothreitol). Les protéines migreront sur un gel de polyacrylamide également de chez Biorad. Pour vérifier l'intégrité de l'anticorps chélaté, le gel sera mis dans une solution de fixation composée d'éthanol, d'acide acétique et d'eau, puis mis au contact de bleu de Coomasie. Pour vérifier la spécificité de l'anticorps chélaté, nous effectuerons le transfert des protéines de nos lignées cellulaires se trouvant sur le gel, sur une membrane de nitrocellulose (RTZ Transfer Kits, Biorad) grâce a un tampon de transfert 1X composé de tampon de transfert 5X (Tris, Glycine, Methanol)(Biorad), d'éthanol et d'eau. Sur cette membrane est ajoutée une solution de blocage constituée de protéines de lait et de PBST 0,1% (BSA+PBS Tween). Le PBST est composé de PBS + 10 gouttes de Tween 50% (ZYMED n° 3005). Nous utiliserons l'anticorps

anti-Rituximab HRP (AbD Serotec) comme anticorps secondaire pour vérifier la spécificité du Rituximab chélaté. Enfin, nous utiliserons l'anticorps anti-mouse IgG HRP (Pierce) comme Ac secondaire pour vérifier la spécificité de l'anti-TACI chélaté.

# 1-3-Radiomarquage

## 1-3-1-Radiomarquage avec le $^{89}$Zr

Le zirconium-89 provient de Perkin-Elmer (NL). On y ajoute de l'acide oxalique (LABOSI), du carbonate de sodium (Sigma Aldrich), notre échantillon Df-Bz-NCS-Ac et du tampon HEPES (Life Technologies). Une colonne PD-10 (GE Healthcare) est conditionnée par une solution composée d'acétate de sodium (Normapur) et d'acide gentisique 99%, (Acros Organics) avant l'ajout de l'échantillon $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Ac.

## 1-3-2-Contrôle Qualité sur Radiomarquage

### 1-3-2-1-ITLC (Instant thin-layer chromatography)

L'ITLC est effectuée par dépôt de l'échantillon sur une bandelette de silice (Biodex). Elle est mise dans une cuve en verre au contact de l'éluant ITLC, composé d'acide citrique monohydrate (Sigma Aldrich) et de carbonate de sodium (Sigma Aldrich). Les résultats seront interprétés suite à la lecture du signal par un radiochromatographe (Ray-test mini-Gita) équipé d'un détecteur à scintillation BGO (Bismuth Germanium Oxide).

### 1-3-2-2-HPLC (Chromatographie liquide haute performance)

Une colonne d'exclusion de taille superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) est utilisée pour l'HPLC. L'éluant passant dans la colonne est composé de sodium dihydrogene phosphate monohydraté (Sigma Aldrich), de disodium hydrogenophosphate hydrate (AnalaR) de sodium chloride (Sigma Aldrich) et d'azoture de sodium (Sigma Aldrich). Les résultats seront interprétés par le logiciel Chromeleon® suite à la détection du signal par un détecteur à scintillation NaI (Tl) (iodure de sodium).

#### 1-3-2-3-Stabilité

La stabilité de notre $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Ac sera évaluée dans du Nacl 0,9% et dans du sérum humain dans des tubes héparinés (laboratoire de bactériologie du CHB). Puis, ils seront incubés dans un incubateur à 37°C.

#### 1-3-2-4-Compétition

Pour notre étude de compétition nous avons besoin de notre échantillon $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Ac, d'Anticorps froid, de nos lignées CD20+ et de Nacl 0,9% pour effectuer nos différentes dilutions. Les mesures seront effectuées par un compteur gamma puits.

#### 1-3-2-5-Immunoréactivité

Pour déterminer la fraction immunoréactive nous utiliserons la lignée cellulaire CD20+ VAL plus ou moins diluée avec du Nacl 0,9% et le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Anticorps. Les mesures seront effectuées par un compteur gamma.

## 1-4-Expérience sur le petit animal

### 1-4-1-Immunohistochimie

Les lignées cellulaires utilisées sont les lignées REC et DHL. Elles seront injectées chez des souris SWISS NU/NU. L'automate utilisé est un PT Link (Dako, Danemark) pour démasquage antigénique.
Concernant les réactifs, pour le démasquage antigénique, nous utilisons une solution pH6 (K8005, Dako, Danemark) et pour l'étape d'élimination de peroxydases endogènes, du méthanol à 3% d'H2O2 (CarloErba, France). Les anticorps primaires utilisés sont, d'une part, un monoclonal de souris (TACI antibody, clone MM0562-9D22, NOVUS Biological;Littleton) et un monoclonal de rat (TACI antibody, LSBio; Seattle). Pour la détection immunohistochimique, nous utiliserons le kit Vectastain Elite (PK6001, Vector, Californie) utilisant le Système ABC : utilisation d'un anticorps secondaire biotynilé avec un

complexe avidine lui-même couplé à une enzyme peroxydase. Pour éviter une réaction croisée de l'anticorps secondaire anti-souris avec les immunoglobulines endogènes présentes dans le tissu de souris, nous aurons besoin du kit MOM (BMK2022, Vector, Californie) avant l'incubation de l'anticorps primaire. Un anticorps secondaire biotynilé anti-rat (BA9401, Vector, Californie) est utilisé car non compris dans le kit Vectastain. La lecture de lame est effectuée par un scanner de lame vision tek (logiciel vision tek).

### 1-4-2-Injection *in vivo*

Les injections des lignées tumorales REC et DHL ont été effectuées en sous-cutanée au niveau de la cuisse de deux souris femelles Swiss NU/NU (Charles River). Ces injections ont permis d'obtenir un volume tumoral de 3 $cm^3$ pour REC et 1 $cm^3$ pour DHL. Cinq semaines après la xénogreffe sous-cutanée, les deux souris ont reçu une injection de $^{18}$F-FDG (Clinique Saint-Luc) et une injection de $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Ac. Les images seront ensuite acquises grâce au Nanospect/CT (Bioscan) et au MicroPET (Mosaïc-BZN06 - Philips). Ces dernières seront reconstruites et fusionnées afin de pouvoir visualiser pour chaque souris les régions d'intérêts (ROI).

# 2-Méthodes

## 2-1-Lignées cellulaires

### 2-1-1-Culture cellulaire – viabilité et comptage

Les lignées cellulaires sont cultivées en suspension dans leur milieu nutritif dans des flasques. Les cellules sont mises en incubateur pour les cultiver, sous 37°C et en atmosphère à teneur en $CO_2$ 5%, $O_2$ 5%, $N_2$ 90% et 85% d'humidité.

Description de la méthode :

Le comptage cellulaire permettra d'obtenir la concentration cellulaire de chaque lignée, concentration qui sera nécessaire lors des contrôles qualités de notre anticorps radiomarqué. De plus, cette technique permettra d'estimer le taux de viabilité de nos cellules.

Protocole :

A l'aide d'une pipette, on remet les cellules en suspension dans leur milieu de culture. Puis il faut mélanger dans un tube les cellules avec du PBS et du bleu trypan afin obtenir une dilution au 1/5$^{e}$. Pour effectuer le comptage, il faut introduire 10µl du mélange dans une lame de Kova. La lame de Kova est ensuite observée au microscope (x10).
Il suffit de compter le nombre de cellules viables (blanches) et le nombre de cellules non viables (bleues) dans les carrés.
Ainsi, nous pourrons calculer le taux de viabilité (nombre de blanches / nombre total) : supérieur à 90% ; et calculer la concentration de cellule : nombre de cellules par petit carré x 90 x 5 (dilution).

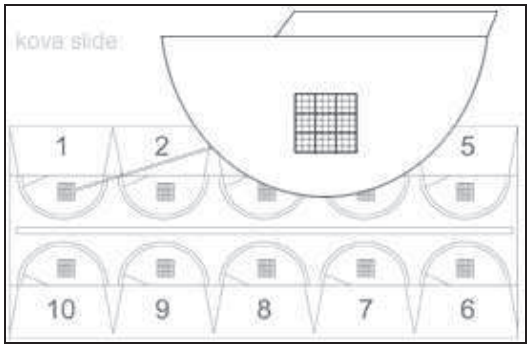



Figure 28 : Illustration d'une lame de Kova comportant dix cellules à grille de 9 carrés chacun comportant 9 cases.

## 2-1-3-Caractérisation des lignées cellulaires

### 2-1-3-1-FACS (Fluorescence-activated cell sorter ou analyseur-trieur de cellules)

Description de la méthode **:**

Cette technique permet une caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide.

L'identification des cellules repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux marqués par un fluorochrome et spécifiques d'une protéine membranaire propre à la cellule à analyser. La première étape de la réaction consiste donc à incuber une population cellulaire avec un anticorps marqué qui se fixe spécifiquement sur une sous-population cellulaire donnée.

Dans cet appareil, les cellules sont aspirées dans une gaine liquide. Cette gaine liquide se termine par un fin capillaire ne permettant le passage que d'une cellule à la fois, et donc d'analyser les cellules une par une. La cellule ainsi isolée passe devant le faisceau d'un rayon laser. Le passage de la cellule devant le faisceau laser a plusieurs conséquences. La première est d'induire une déviation du faisceau, et la seconde est d'exciter les fluorochromes fixés aux anticorps eux-mêmes fixés aux cellules à détecter, et ainsi d'induire l'émission d'une fluorescence.

Des photomultiplicateurs détectent les déviations du faisceau laser qui renseigne sur plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule, comme sa taille, sa granularité (complexité interne relative) et son intensité relative de fluorescence (indiquant la présence de l'anticorps sur la cellule).

Les signaux sont séparés (par des filtres optiques), collectés (par des photomultiplicateurs) puis amplifiés. Un ordinateur peut alors décrire des données statistiques associées aux

distributions des paramètres mesurés, et les représente sous la forme d'histogrammes ou de cytogrammes sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

Pour nos lignées cellulaires, l'objectif est de confirmer la présence d'antigène CD20+ et/ou TACI+ grâce à l'utilisation d'anticorps anti-CD20 et d'anticorps-anti anti-TACI couplé à un fluorochrome.

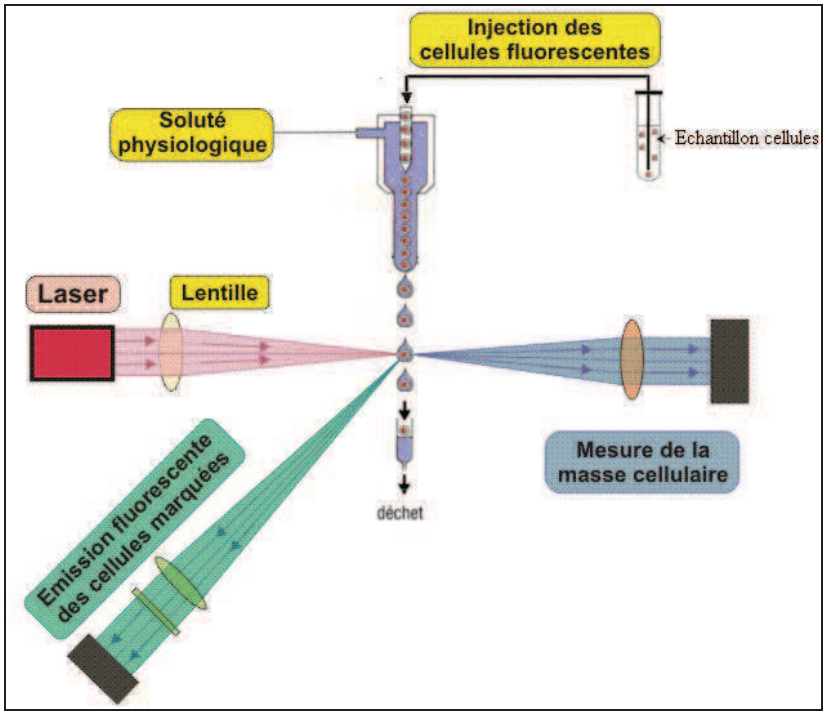



Figure 29 : Schéma de fonctionnement de la cytométrie en flux

Protocole :

Prélever le volume de cellules nécessaire (en fonction du comptage) pour avoir $10^6$ cellules. Centrifuger alors l'aliquot 5 minutes à 1000 tours par minute (rpm) puis laver les cellules dans 2 ml de PBS 1X. Centrifuger à nouveau 5 minutes à 1000 rpm et jeter le surnageant.
Ensuite, suspendre les cellules avec du PBS pour avoir $10^6$ cellules dans 100µl.
Mettre ces 100µl de cellules dans les tubes et y ajouter l'anticorps anti-antigène (10 à 20µl).
Puis, laisser poser le tube environ15 minutes à l'abri de la lumière et ajouter 1ml de PBS pour effectuer une lecture immédiate. Pour finir répartir les flacons dans le cytomètre en flux et lancer l'analyse.

### 2-1-3-2-RT-MLPA (Reverse Transcriptase-Multiplex ligation-dependent probe amplification)

Description de la méthode :

La RT-MLPA (Reverse Transcription - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) permet de quantifier l'expression de plusieurs gènes simultanément grâce à une méthode d'hybridation de sondes sur ADN complémentaire (ADNc), suivie d'une PCR (polymerase chain reaction). Après reverse transcription, les sondes MLPA s'hybrident à leur cible sur l'ADNc. Les sondes hybridées sont ensuite liguées (ligase) et amplifiées par PCR. Les amplicons produits sont séparés et quantifiés par électrophorèse capillaire le long d'un capillaire de silice rempli de tampons sous voltage élevé, puis sont détectés par fluorimétrie. A noter que chaque sonde MLPA a une longueur unique permettant une identification simple [77]. On observe alors une différence relative de la hauteur des pics qui indique une variation du niveau d'expression des gènes cibles. De plus, l'analyse de ces résultats permet d'obtenir un score en fonction de l'importance de l'expression des gènes définis comme pro-GCB ou pro-ABC. Cette technique permet de différencier les deux sous-types de LDGCB, cependant dans notre étude nous ne l'utiliserons que pour identifier les lignées TACI + ou TACI -.

Protocole :

Toutes les réactions sont réalisées dans un thermocycleur avec un couvercle chauffant. Dans un premier temps, il s'agit de dénaturer l'ARN, pour cela 1 µg d'ARN totaux sont dilués dans 4 µl d'eau sans RNAse et conservés dans la glace. Après addition de 7,5 µl du KIT RT, les échantillons sont chauffés pendant 1 minute à 80°C, puis incubés 5 minutes à 37°C afin de permettre l'hybridation aléatoire des amorces, et refroidis à 4°C.
Puis, 1 µl de RT-MMLV est ajouté, et les échantillons sont incubés pendant 15 minutes à 37°C pour synthétiser l'ADNc, puis ils sont chauffés pendant 2 minutes à 98°C pour inactiver l'enzyme, et refroidis à 4°C.
Pour l'hybridation des sondes MLPA, 5 µl d'ADNc sont transférés dans un nouveau tube avec 3 µl du RT-MLPA probemix. Les échantillons sont ensuite chauffés pendant 2 minutes à 95°C et incubés pendant 1 heure à 60°C pour permettre l'hybridation des sondes MLPA à leurs cibles ADNc.

La ligation des oligonucleotides hybridés est réalisée après refroidissement des échantillons à 56°C, en ajoutant 32 µl du mélange ligase et en incubant le mélange pendant 15 minutes à 56°C. L'enzyme ligase est ensuite inactivée par chauffage pendant 5 minutes à 98°C.

Pour l'amplification des sondes liguées par PCR, 5 µl de chaque produit de ligation sont ajoutés à 15 µl d'un mélange de polymérase.

L'amplification a été réalisée avec le programme suivant :

6 min 94 °C; 35 cycles (30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 30 sec 72 °C); 4 min 72 °C; refroidi à 16 °C.

Pour l'analyse des données, 1 µl de chaque produit de PCR est mélangé avec 1 µl de GeneScan 400HD ROX et 28 µl de formamide, dénaturé pendant 3 minutes à 95°C et chargé sur analyseur à électrophorèse capillaire ABI3130 en mode GeneScan (Applied Biosystems, Warrington, Royaume-Uni).

L'analyse des résultats est effectuée en comparant la taille relative des pics obtenus.

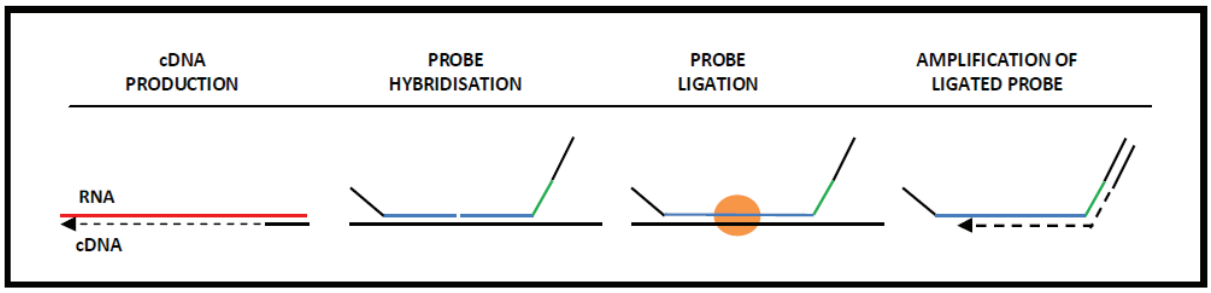



Figure 30 : Différentes étapes clés du fonctionnement de la RT-MLPA [77]

## 2-2-Le Couplage

### 2-2-1-Couplage Df-Bz-NCS + Anticorps

Description de la méthode :

Pour la synthèse du Rituximab ou de l'Anti-TACI marqué au $^{89}$Zr, nous nous sommes référés à un protocole de Vosjan paru en 2010 dans la revue Nature [75]. Il reprend les différentes

étapes nécessaires pour l'obtention d'un Ac marqué au $^{89}$Zr par l'intermédiaire du chélateur *p*-isothiocyanatobenzyldesferrioxamine.

Protocole :

L'anticorps (Rituximab à 34,7 mM; Anti-TACI à 3,3 mM ; pH = 9) est mis à réagir avec le Df-Bz-NCS (5 mM dans 20 µl de DMSO) pendant 30 minutes.

La colonne de dessalage PD10 est conditionnée par une solution d'acide gentisique additionnée d'un tampon acétate (0,25 M; pH = 5.5).

L'échantillon (Df-Bz-NCS-Rituximab ou Df-Bz-NCS-Anti TACI) est introduit dans la colonne, l'éluat sortant est non conservé. Puis, la colonne est lavée à deux reprises par la solution d'acide gentisique additionnée d'un tampon acétate. Le premier éluat n'est pas conservé, le deuxième est conservé, il s'agit de notre échantillon Df-Bz-NCS-Anticorps, à conserver à -20°C.

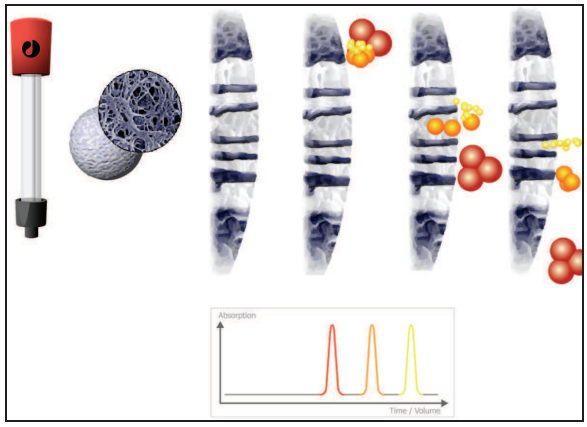



Figure 31 : GE Healthcare ; Principe de fonctionnement colonne de dessalage. La colonne, grâce aux billes microporeuses, va permettre de ralentir l'élution des petites molécules qui vont se retrouver piégées dans les pores, contrairement aux molécules plus grosses.

## 2-2-2-Contrôles qualités sur couplage

### 2-2-2-1-Extraction et dosage des protéines

L'extraction et le dosage protéique permettront d'obtenir la concentration en protéines de chaque lignée. Concentration qui sera nécessaire lors des contrôles qualités, par Western Blot, de notre anticorps couplé radiomarqué.

**Extraction des protéines :**

Description de la méthode :

Les protéines à extraire et préparer sont issues de cellules d'échantillons biologiques (biopsie de tissus, culture cellulaire...). On extrait les protéines par l'utilisation d'un tampon de lyse (RIPA) qui rompt les parois cellulaires et membranes biologiques. Il faut veiller à ne pas modifier les chaînes polypeptidiques libérées (inhibition des phosphatases, protéases, glycosidases) et à maintenir les protéines sous forme soluble (élimination des sels). Nous avons donc extrait les protéines de nos 4 lignées cellulaires.

Protocole :

Il faut resuspendre le culot cellulaire sec (-80°C) dans 2ml de tampon RIPA. Puis, laisser les cellules lyser 30 minutes dans la glace. Ensuite, centrifuger 15 minutes (4°C) et récupérer le surnageant contenant les protéines cellulaires. Enfin, aliquoter et stocker à -80°C.

**Dosage des protéines :**

Description de la méthode :

L'expression de la protéine d'intérêt est différente en fonction de la lignée sélectionnée. Le dosage des protéines permettra d'uniformiser les échantillons afin d'analyser la même quantité de protéines, quelle que soit l'origine de l'échantillon, et ceci afin de pouvoir mener l'électrophorèse sur gel avec une quantité connue de protéines.

L'absorbance lue par spectrophotométrie des échantillons est directement proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans la solution et peut être estimée par comparaison avec une protéine standard, telle que l'albumine bovine sérique (BSA).

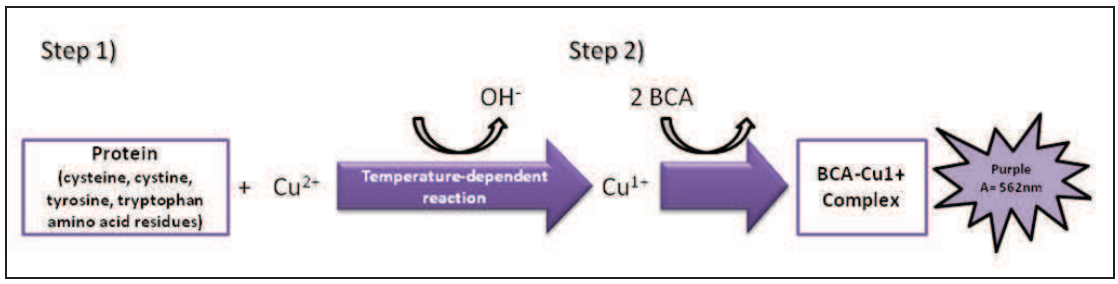



Figure 32: D'après Johnson. Représentation schématique de la méthode au BCA. La quantité de $Cu^{2+}$ réduit en $Cu^{+}$ est proportionnelle à la concentration en protéines de notre échantillon. Le $Cu^{+}$ alors obtenu réagit avec deux molécules de BCA. Le BCA étant un réactif chromogène de $Cu^{+}$, il change de couleur en fonction de la quantité de $Cu^{+}$ et donc de protéines. L'absorbance à 562 nm est directement proportionnelle à la quantité de protéines de l'échantillon. [78]

Protocole :

Pour commencer, préparer la gamme standard de BSA par différentes dilutions avec le PBS. Puis, préparer les échantillons de protéines extraites des différentes lignées cellulaires en double exemplaire à des dilutions au 1/50e et 1/100e avec du PBS.
Ensuite, préparer la solution BCA WR, composée des réactifs A : B (ratio 50 : 1) et ajouter 1ml de cette solution à tous les tubes (gamme et échantillons). Mettre les tubes au bain marie 30 minutes. Pour finir, effectuer la lecture de l'absorption des tubes au spectrophotomètre à 562 nm.

### 2-2-2-2-Western Blot

L'objectif de ces contrôles est de s'assurer que, lors des étapes de couplages, l'intégrité et la spécificité de l'anticorps ont été conservées. Pour cela, nous utiliserons la technique du Western Blot, technique permettant de séparer différentes protéines d'un mélange multiproteiques en fonction de leurs poids moléculaire.
Pour l'intégrité, nous comparerons la migration de l'anticorps vs anticorps-Df-Bz-NCS en condition dénaturante et non dénaturante.

Pour la spécificité, dans un premier temps, nous comparerons la capacité de reconnaissance - ou non - du CD20 des lignées cellulaires REC,VAL, DHL et HEK (CD20-) par le Rituximab non couplé vs Rituximab-Df-Bz-NCS en l'utilisant comme anticorps primaire dans notre WB. Puis, dans un second temps, nous comparerons la capacité de reconnaissance ou pas du TACI des lignées cellulaires REC, DHL (TACI-) par l'Ac anti-TACI non couplé vs l'Ac anti-TACI-Df-Bz-NCS en l'utilisant aussi comme anticorps primaire dans notre WB.

Description de la méthode :

Le Western Blot est une technique mise au point en 1979 [79], elle est utilisée en biologie cellulaire et moléculaire. Cette technique permet d'identifier des protéines spécifiques, à partir d'un mélange complexe de protéines (extraites de cellules). Elles sont séparées en fonction de leur masse moléculaire grâce à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, puis transférées sur une membrane pour les rendre accessibles à divers marquages immunologiques. Cette technique nous permettra de vérifier que l'anticorps couplé conserve bien son intégrité et sa spécificité vis a vis de sa cible.

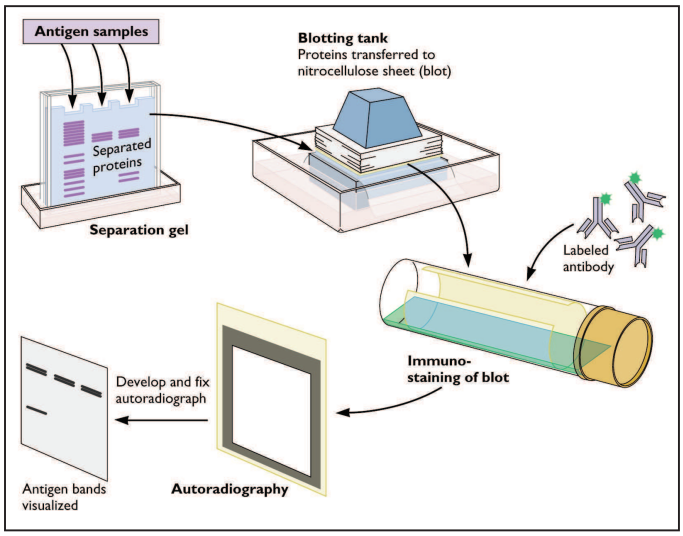



Figure 33: Différentes étapes du Western Blot [80]

Protocole intégrité anticorps :

Commencer par la préparation des échantillons d'anticorps (Rituximab ou Anti-TACI chélaté ou non) avec ou sans DTT. Puis, remplir la cuve de migration avec le tampon de migration. Introduire dans les puits, du gel, le marqueur de taille et les échantillons d'anticorps à séparer. Puis, lancer l'électrophorèse sur gel de polyacrylamides permettant de séparer les protéines des échantillons, uniformément chargées, en fonction de leur poids moléculaire, grâce à l'influence du champ électrique établi entre l'anode et la cathode. A la fin de la migration, tremper le gel 15 minutes dans une solution de fixation, puis effectuer deux rinçages avec de l'eau. Pour finir, mettre en contact avec du Bleu de Coomasie entre 10 et 20 heures et effectuer la lecture du gel.

Protocole spécificité anticorps :

Pour commencer, préparer les échantillons protéiques (30 µg) issus de nos lignées cellulaires (REC, VAL, DHL et HEK). Additionner le bleu et le DTT aux protéines et mettre à dénaturer 5 minutes à 95°C. Ensuite, remplir la cuve de migration avec le tampon de migration. Introduire dans les puits du gel, le marqueur de taille et les préparations de protéines. Puis, lancer l'électrophorèse sur gel de polyacrylamides permettant de séparer les protéines des échantillons, uniformément chargées, en fonction de leur poids moléculaire grâce à l'influence du champ électrique entre l'anode et la cathode. A la fin de la migration, transférer les protéines sur une membrane de nitrocellulose grâce au tampon de transfert. Ensuite, saturer la membrane, par la solution de blocage, afin de bloquer les sites d'interactions non spécifiques. Les protéines se lient alors aux sites non occupés par la protéine cible.
Retirer la solution de blocage et ajouter l'anticorps primaire à évaluer (1/500$^{e}$; Rituximab ou Rituximab-Df-Bz-NCS ; Anti-TACI ou Anti-TACI-Df-Bz-NCS). L'anticorps ne pourra se fixer que sur les sites de liaisons de la protéine cible (CD20 ; TACI). Laisser en contact jusqu'au lendemain à -4°C. Le lendemain, retirer l'anticorps primaire et laver la membrane avec du PBT.
Après les lavages, ajouter l'anticorps secondaire (1/20 000$^{e}$ pour Ac anti Rituximab ; 1/5 000$^{e}$ pour Ac anti Anti-TACI) couplé à une enzyme (HRP) qui fixera l'Ac primaire.
Laisser en contact pendant 1 heure, puis laver la membrane avec du PBT. Pour avoir une émission de lumière détectable, il faut ajouter le substrat (ECL) qui va pouvoir réagir avec

l'enzyme de l'Ac secondaire. Enfin faire une révélation par chimiluminescence, ou l'émission de lumière est donc proportionnelle au taux d'anticorps secondaires liés sur la membrane.

## 2-3-Le Radiomarquage

### 2-3-1-Radiomarquage avec le $^{89}$Zr

Description Méthode :

La méthode utilisée est celle décrite par Vosjan [75].

Protocole :

La solution de [$^{89}$Zr]Zr-oxalique acid (37–185 MBq) est mise à réagir avec successivement le tampon HEPES (0,5 M), l'échantillon Df-Bz-NCS-Ac, et à nouveau du tampon HEPES pendant 1 heure.
La colonne de dessalage PD10 est conditionnée par une solution d'acide gentisique additionnée d'un tampon acétate (0,25 M; pH = 5.5).
Le mélange réactionnel ($^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Ac) est introduit dans la colonne, l'éluat sortant est non conservé. Puis la colonne est rincée à deux reprises par la solution d'acide gentisique additionnée d'un tampon acétate. Le premier éluat n'est pas conservé, le deuxième est conservé, il s'agit de l'Anticorps radiomarqué.

Calcul du rendement global de radiomarquage :

$$\frac{\text{Activité de } ^{89}\text{Zr après radiomarquage}}{\text{Activité de } ^{89}\text{Zr initiale}} \quad X\ 100$$

## 2-3-2-Contrôle qualité sur radiomarquage

### 2-3-2-1-ITLC (Chromatographie sur couche mince)

Description de la méthode :

Cette technique de chromatographie sur couche mince liquide (phase mobile)-solide (phase stationnaire) permet de façon simple d'avoir une réponse très rapide dans l'analyse radiochimique des produits radiopharmaceutiques. Elle permet de séparer les différents éléments d'une même préparation, le radioélément correctement fixé sur sa trousse et le radioélément dit « libre ». C'est la technique de référence dans le contrôle qualité de la plupart des produits radiopharmaceutiques.

Protocole :

Ajouter une microgoutte (1 à 5 µl) de produit sur la ligne de dépôt de la bandelette de silice (phase solide). Puis mettre la bandelette dans une cuve préremplie de quelques millilitres du solvant (phase liquide : acide citrique ; pH = 5) et laisser migrer le solvant par capillarité.
Enfin, révéler la bandelette par détection de la radioactivité.

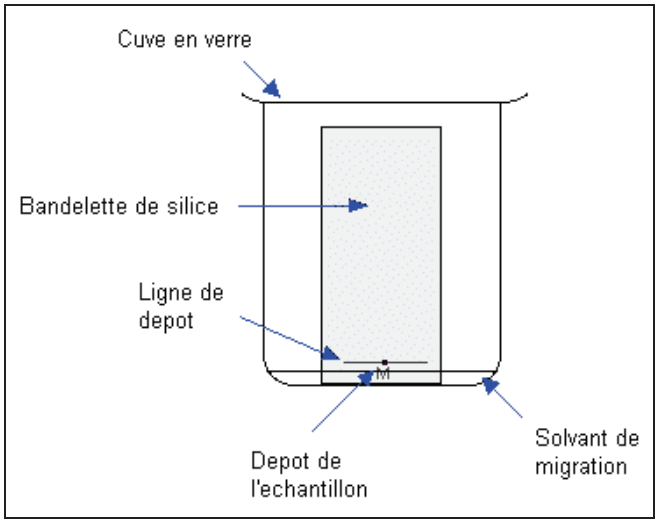



Figure 34: Schéma ITLC. Après dépôt de la solution sur la ligne de dépôt, le solvant de migration grimpe par capillarité le long de la bandelette séparant les différents produits de l'échantillon.

### 2-3-2-2-HPLC

Description de la méthode :

Il s'agit d'une chromatographie liquide sur colonne qui fait appel à des phénomènes d'adsorption, de partage, d'échange d'ions et/ou d'exclusion. Ici, la phase stationnaire est une colonne dans laquelle circule sous haute pression la phase mobile liquide.
La phase stationnaire de la colonne est composée de dextrans et d'agarose, qui lui confèrent des propriétés polaires permettant la séparation de composés organiques très polaires. Cette technique nous permettra de s'assurer que le radiomarquage a bien été effectué (comme ITLC), mais aussi d'assurer que le radiomarquage a bien été fait sur des anticorps entiers, et non pas sur des débris d'anticorps (potentiellement obtenus suite aux différentes étapes du marquage).

Protocole :

Commencer par rincer la colonne par l'éluant HPLC (0,5 ml/min) pendant 30 minutes. Puis, injecter l'échantillon à analyser. Attendre que l'intégrité du produit radioactif soit passée dans la colonne et devant le détecteur à scintillation, puis analyser le graphique. A noter qu'un essai à blanc peut être effectué avec l'éluant de la colonne PD10 (solution d'acide gentisique additionnée d'un tampon acétate (0,25 M; pH = 5.5)).

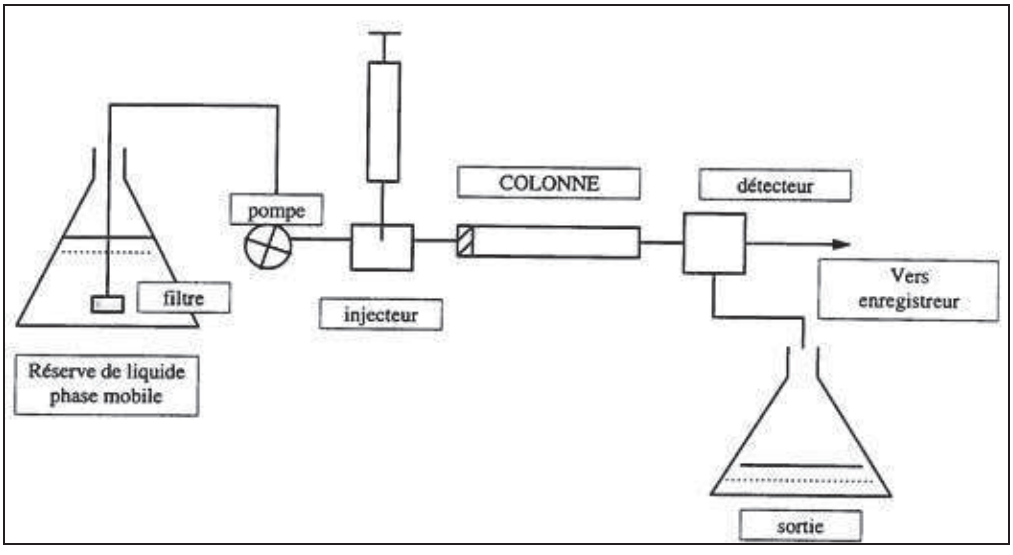



Figure 35: Principe de fonctionnement de l'HPLC

**2-3-2-3-Stabilité**

Description de la méthode :

Les anticorps radiomarqués sont des macromolécules biologiques qui peuvent être sujettes, suite à leur synthèse, à des processus de modification et de dégradation. Ainsi, l'assurance de la stabilité *in vitro* de la molécule obtenue est primordiale. Cette stabilité sera évaluée au contact d'un sérum humain et de NaCl 0,9% à différents temps dans une étuve à 37°C. Puis, la mesure par ITLC de la part de radioisotopes libres et liés permettra de confirmer la stabilité de notre préparation.

Protocole :

Pour s'assurer de la stabilité de notre préparation, prélever dans deux tubes 100 µCi de $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Ac. Puis, compléter avec du sérum humain ou du NaCl 0,9% qsp 1 ml et incuber à 37°C. Finalement, mesurer la part de $^{89}$Zr libre aux différents temps par ITLC.

**2-3-2-4-Compétition**

Description de la méthode :

Il s'agit d'un phénomène dans lequel il existe deux anticorps qui peuvent se lier au même antigène. L'anticorps avec une plus grande concentration se lie fortement avec l'antigène en remplaçant l'autre. Donc, dans notre expérience, l'anticorps radiomarqué de haute affinité se lie à l'antigène. Puis, quand l'anticorps non marqué est ajouté en excès, il commence à se lier à l'antigène en déplaçant l'anticorps marqué de cette cible.
Pour tester la capacité de liaison *in vitro* de l'anticorps marqué au $^{89}$Zr avec ses récepteurs spécifiques, une analyse de liaison compétitive a été réalisée sur nos lignées cellulaires CD20+. La viabilité cellulaire et la numération cellulaire ont été déterminées comme vu précédemment.

Etape de saturation :

Pour effectuer cette étape de compétition, il est essentiel de connaître la quantité d'anticorps suffisante pour saturer l'ensemble des récepteurs cibles.

Une gamme de concentration croissante de $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Ac (0,1 à 10 μCi) va être mise au contact de nos lignées cellulaires (4 $\times 10^5$ cellules).

L'activité calculée traduira le nombre de complexes ligand-récepteur.

Nous pourrons ainsi déterminer le Kd, qui est la concentration du ligand donnant une occupation de la moitié des récepteurs.

Etape de compétition :

Pour cette étape, 4 x $10^5$ cellules sont mises au contact d'une quantité de $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Ac permettant une saturation quasi complète des récepteurs cibles, quantité connue grâce à l'étape de saturation précédente. Ces échantillons sont mis au contact de concentrations croissantes (x1 à x100) d'anticorps non marqués afin de déplacer les Ac radiomarqués se trouvant sur les récepteurs spécifiques des cellules.

Nous pourrons par la même procédure vérifier que les complexes Ac-Récepteurs s'internalisent. Pour cela il s'agira de laisser un temps plus important avant l'ajout de l'Ac froid, ce temps permettant de laisser les Ac marqués couplés aux récepteurs, s'internaliser. Ainsi, leur déplacement après ajout de l'Ac froid ne pourra pas s'effectuer.

Protocole :

Etape de saturation :

Commencer par placer en double exemplaire dans des tubes 4 $\times$ $10^5$ cellules de nos lignées cellulaires, compléter avec 1 ml de Nacl 0,9% et incuber avec l'anticorps marqué aux différentes concentrations indiquées. Puis, agiter les tubes et laisser poser 1 heure à T°C ambiante. Centrifuger les tubes pendant 12 minutes à 3 500 rpm, retirer le surnageant et effectuer un lavage au NaCl 0,9%. Recentrifuger pendant 12 minutes à 3 500 rpm, retirer le surnageant et compter les tubes au compteur gamma. Enfin, établir la courbe de saturation de chaque lignée.

Etape de compétition :

Comme pour l'étape de saturation, placer en double exemplaire dans des tubes 4 x $10^5$ cellules, compléter avec 1 ml de Nacl 0,9% et ajouter du $^{89}$Zr-Ac, cette fois-ci en quantité suffisante pour une saturation quasi complète des récepteurs cibles (3 µCi).

Agiter, ajouter de l'anticorps non marqué à des concentrations croissantes et agiter à nouveau. Laisser poser 1 heure à T°C ambiante puis centrifuger pendant 12 minutes à 3 500 rpm, retirer le surnageant et effectuer un lavage au NaCl 0,9%. Centrifuger à nouveau pendant 12 minutes à 3 500 rpm et retirer le surnageant. Finalement, compter les tubes au compteur gamma et établir la courbe de compétition.

Pour vérifier l'internalisation des complexes Ac-Récepteurs nous aurions attendu 1 heure avant l'ajout de l'Ac de compétition.

**2-3-2-5-Immunoréactivité**

Description de la méthode :

Parce que la procédure de conjugaison peut altérer les anticorps, la détermination de la fraction immunoréactive (FI) d'anticorps monoclonaux radiomarqués (AcM) est essentielle. Il est donc important de connaitre la quantité de l'anticorps conjugué qui est capable de se lier à l'antigène ciblé.

Le procédé classique est basé sur une technique de dosage radio-immunologique dans laquelle la fraction d'anticorps immunoréactives est déterminée par extrapolation linéaire dans des conditions d'excès d'antigène. C'est Lindmo et al. en 1984 [81] qui introduit une méthode dans laquelle la FI est déterminée par extrapolation dans des conditions dites "d'excès d'antigène infini". Nous allons pour cela réaliser différentes dilutions de nos lignées cellulaires et les mettre au contact d'une quantité fixe d'anticorps radiomarqués. La viabilité cellulaire et la numération cellulaire ont été déterminées comme vu précédemment.

Protocole :

Pour déterminer la fraction immunoréactive, il faut commencer par placer en double exemplaire dans des tubes de 1ml des cellules à des concentrations de 2,5 ; 1,25 ; 0,625 ; 0,312 et 0,156 millions de cellules/ml pour VAL ou 5,5 ; 2,75 ; 1,375 ; 0,6875 ; 0,34375

millions cellules/ml pour REC. Puis, ajouter du $^{89}$Zr-Ac à la même quantité (3 µCi) dans tous les tubes. Placer dans deux autres tubes du $^{89}$Zr-Ac seul (témoin) à la même quantité (3 µCi), puis agiter tous les tubes et laisser poser 1 heure à T°C ambiante. Après, centrifuger pendant 12 minutes à 3 500 rpm, retirer le surnageant et effectuer un lavage au NaCl 0,9%. Centrifuger de nouveau pendant 12 minutes à 3 500 rpm et retirer le surnageant.
Enfin, compter les tubes au compteur gamma et établir la courbe décrivant l'inverse de la fraction liée en fonction de l'inverse des concentrations cellulaires. Cette courbe permettra d'obtenir la valeur de la fraction immunoréactive (%).

## 2-4-Expérience sur le petit animal

### 2-4-1-Immunohistochimie

Description méthode :

Nous avons xenogreffé des lignées cellulaires par voie sous-cutanée sur le haut de la cuisse droite chez des souris SWISS NU/NU. Ces souris présentent une dysgénése du thymus provocant un déficit immunitaire par un nombre réduits de cellules T. Un premier groupe a reçu une lignée cellulaire DHL et un second groupe a reçu une lignée cellulaire REC à raison de 5 millions de cellules par souris.
15 jours après implantation, une exérèse du tissu tumoral et des coupes histologiques de 4 µm ont été effectuées sur les tumeurs incluses en paraffine.
Une coloration standard (Hemalun-Eosine) est effectuée pour s'assurer de la nature de notre tissu, de l'architecture et de la structure des cellules.

L'IHC est réalisée sur des coupes de 4 µm de tumeurs incluses en paraffine, afin de localiser la présence ou l'absence de protéines membranaires TACI. Cette technique est effectuée par l'intermédiaire d'anticorps couplés à une enzyme permettant de catalyser une production de couleur et donc de confirmer la présence de la protéine d'intérêt.

Cette technique nous permettra de confirmer la nature TACI +/- de nos lignées cellulaires, mais aussi de savoir de quelle nature devra être l'anticorps anti-TACI à utiliser. Il s'agira d'un

anticorps de souris ou de rat en fonction des résultats de coloration obtenu. De plus, cette technique a été aussi effectuée sur des ganglions provenant directement de patients atteints de LDGCB GCB et non GCB, et ce afin de confirmer que LDGCB GCB et bien TACI- et inversement pour le sous-type ABC.

Protocole :

Le déparaffinage et le prétraitement à la chaleur des lames sont réalisés dans un tampon pH6 sur l'automate PTLink.
Après une étape d'élimination des peroxydases endogènes dans une solution de méthanol à 3% d'H2O2, les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire anti-TACI (1h au 1/100$^{e}$ pour le monoclonal de souris / en overnight à 4°C au 1/50$^{e}$ pour le monoclonal de rat).
La méthode de détection est réalisée avec le kit Vectastain Elite. Ajout du substrat DAB (3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride ). Puis, les lames sont contre colorées à l'hématoxyline.
A noter que le marquage avec l'anticorps monoclonal de souris nécessite une étape supplémentaire avec le kit MOM avant l'incubation de l'anticorps primaire.
Et le marquage avec l'anticorps monoclonal de rat nécessite l'utilisation d'un anticorps secondaire anti rat biotynilé.
Et enfin lecture des lames par un scanner de lames.

## 2-4-2-Injection *in vivo*

Description méthode :

Avant toute application clinique, l'injection d'un produit radiopharmaceutique chez le petit animal permet de valider l'utilisation d'un traceur nouvellement développé pour l'imagerie moléculaire. Ce type d'étude peut permettre d'évaluer la pharmacocinétique et la biodistribution de la molécule d'intérêt. L'étude est conduite sur deux souris, l'une ayant développé une tumeur TACI+, CD20+ (lignée DHL) et l'autre une tumeur TACI-, CD20+ (lignée REC). Les deux souris recevront du $^{18}$F-FDG afin d'obtenir une imagerie fonctionnelle, ainsi que du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab afin de vérifier si notre produit

synthétisé fixe la tumeur. A différents temps, la souris sera anesthésiée et passera sous le Nanospect/CT et la Micro-PET.

Protocole :

Cinq semaines avant le début de l'étude, les 2 souris femelles nude NU/NU ont reçu, en sous-cutanée au niveau haut de la cuisse droite, 5 millions de cellules (DHL ou REC) dans 0,1ml. Avant l'injection des produits radiopharmaceutiques, nous effectuons une anesthésie par de l'isoflurane à 5% / air. Dans un premier temps, nous injectons du $^{18}$F-FDG [100µl ; 8,35MBq] par la veine caudale. Les images du Nanospect/CT et du Micro-PET sont acquises à 1 heure post-injection. Puis dans un second temps, nous injectons du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab [100µl ; 1,2 MBq] par la veine caudale. Les images du Nanospect/CT et du Micro-PET sont acquises à 24, 48 et 72 heures post-injection afin d'observer la fixation de notre produit.

# Résultats

1-Rituximab ..... 88
1-1-Lignées cellulaires ..... 88
1-2-Le Couplage ..... 91
1-3-Radiomarquage ..... 95
1-4-Expérience sur le petit animal ..... 104
2-Anti-TACI ..... 107
2-1-Lignées cellulaires ..... 107
2-2-Le couplage ..... 109
2-3-Radiomarquage ..... 111
2-4-Expérience sur le petit animal ..... 113

# 1-Rituximab

## 1-1-Lignées cellulaires

### 1-1-1-Culture cellulaire – viabilité et comptage

Nos 4 lignées, par observation microscopique, ont été comptées et nous avons estimé leur viabilité. Pour chacune des lignées deux comptages ont été effectués.

| Lignées cellulaires | Viabilité | Nombre cellules Carré 1 | Nombre cellules Carré 2 | Nombre cellules Carré 3 | Taux viabilité (%) | Concentration cellulaire (Millions/ml) | Concentration moyenne (Millions/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| RL 1er comptage | Viable | 47 | 46 | 33 | 95 | 2.1 | 2.8 |
| | Non viable | 4 | 2 | 0 | | | |
| RL 2ème comptage | Viable | 73 | 83 | 50 | 94 | 3.4 | |
| | Non viable | 9 | 2 | 2 | | | |
| REC 1er comptage | Viable | 51 | 53 | 50 | 96 | 2.6 | 2.2 |
| | Non viable | 2 | 0 | 4 | | | |
| REC 2ème comptage | Viable | 38 | 39 | 38 | 95 | 1.9 | |
| | Non viable | 1 | 4 | 1 | | | |
| DHL 1er comptage | Viable | 110 | 108 | 91 | 92 | 5.2 | 4.3 |
| | Non viable | 10 | 9 | 9 | | | |
| DHL 2ème comptage | Viable | 67 | 82 | 60 | 95 | 3.5 | |
| | Non viable | 5 | 3 | 2 | | | |
| VAL 1er comptage | Viable | 80 | 61 | 60 | 99 | 3.4 | 2.6 |
| | Non viable | 0 | 2 | 1 | | | |
| VAL 2ème comptage | Viable | 38 | 33 | 44 | 97 | 1.9 | |
| | Non viable | 2 | 1 | 1 | | | |

Tableau 9: Taux de viabilité et concentration moyenne des différentes lignées cellulaires.

Le taux de viabilité et la concentration cellulaire sont optimaux pour l'utilisation de nos lignées cellulaires dans nos contrôles qualités.

## 1-1-2-Caractérisation des lignées cellulaires

### 1-1-2-1-FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

L'analyse cytométrique de nos cellules a été faite en absence (témoin négatif) et présence d'anticorps anti-CD20.

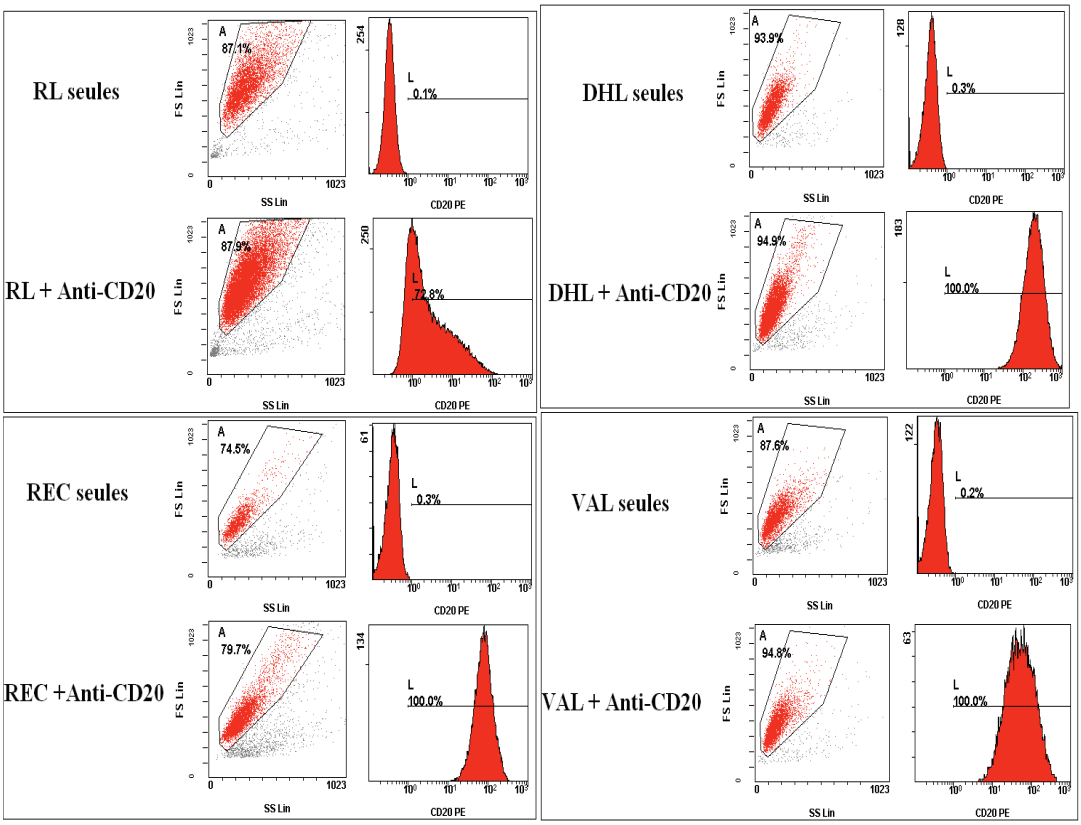



Figure 36 : Cytogramme et Histogramme des différentes lignées cellulaires en présence ou non d'anticorps anti-CD20. Pour les cytogrammes, l'axe des abscisses représente la mesure de lumière diffusée latéralement par les cellules (SS) pour distinguer la granulométrie. L'axe des ordonnées représente la mesure de la lumière diffusée vers l'avant (FS) pour distinguer la taille. Pour les histogrammes, l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules.

Nous pouvons observer que nos quatre lignées présentent bien une émission fluorescente correspondante à la détection du CD20 après ajout de l'anti-CD20.

### 1-1-2-2-RT-MLPA (Reverse Transcriptase-Multiplex ligation-dependent probe amplification)

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse capillaire sous l'influence d'un champ électrique. Cette séparation permet d'apprécier la hauteur des pics de l'électrophorégramme qui est représentative du niveau d'expression du gène cible.

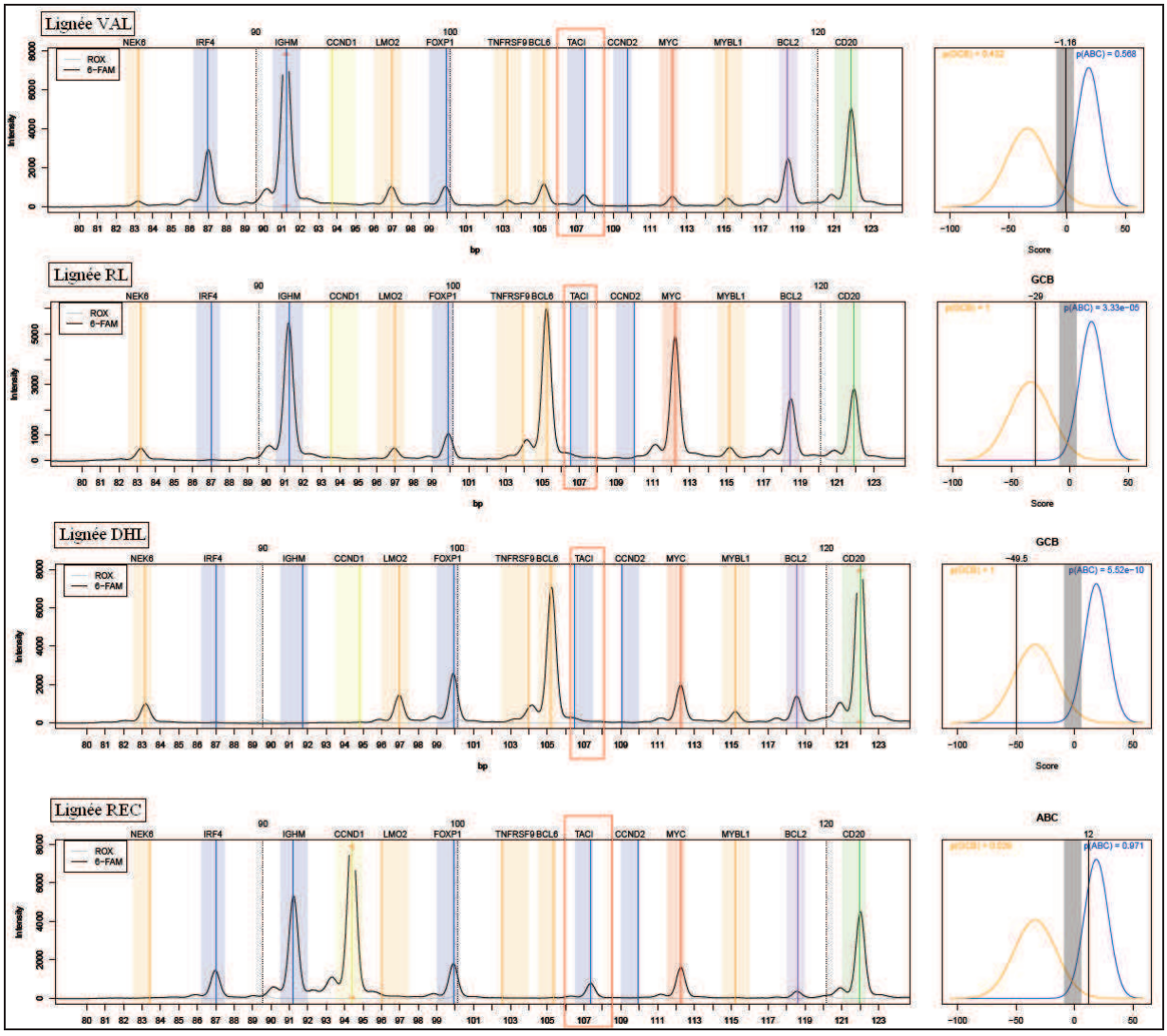



Figure 37 : Analyse des RT-MLPA des lignées cellulaires. En rouge le point de migration de TACI. L'axe des abscisses représente la taille en paires de base (bp). L'axe des ordonnées représente l'intensité de fluorescence en fonction de l'intensité d'expression du gène cible.

Cette technique nous permet d'assurer qu'il existe une expression ARN des protéines recherchées, ce qui ne veut pas forcément dire qu'il y a une expression protéique de celle-ci, mais cela permet tout de même d'orienter nos résultats. On observe donc que VAL et REC

sont positifs pour TACI, contrairement à RL et DHL qui, elles, sont TACI négatifs. Cette expérience nous permet d'également confirmer que nos quatre lignées sont bien CD20+.

Pour résumer :

- DHL → CD20+ ; TACI -
- RL → CD20+ ; TACI -
- REC → CD20+ ; TACI +
- VAL → CD20+ ; TACI +

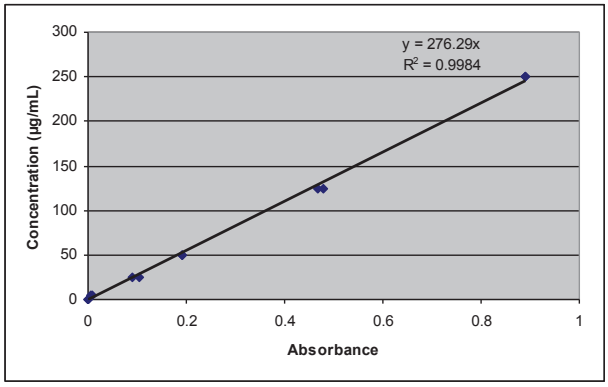
# 1-2-Le Couplage

## 1-2-1-Contrôle Qualité sur couplage Df-Bz-NCS + Ac

### 1-2-1-1-Extraction et dosage des protéines

Le dosage protéique des lignées DHL, REC, RL, et VAL est réalisé par la technique de la spectrophotométrie, nous avons vu que l'absorbance lue, par le spectrophotomètre, des échantillons est directement proportionnelle à la quantité de protéines.

Etablissement de la gamme standard :




| | Concentration (µg/mL) | Absorption à 562nm |
|---|---|---|
| F1 | 0 | 0 |
| F2 | 0 | 0 |
| E1 | 5 | 0.007 |
| E2 | 5 | 0.008 |
| D1 | 25 | 0.09 |
| D2 | 25 | 0.105 |
| C1 | 50 | 0.191 |
| C2 | 50 | 0.191 |
| B1 | 125 | 0.467 |
| B2 | 125 | 0.479 |
| A1 | 250 | 0.891 |
| A2 | 250 | 0.891 |

Figure 38 : Graphique : Etablissement de la gamme standard. La droite représente la concentration (µg/ml) en fonction de l'absorbance à 562 nm.

Concentration protéinique dans chacune des lignées cellulaires :

| Lignées cellulaire | Dilution | Absorption à 562nm | Concentration dilution | Concentration non diluée | Concentration moyenne non diluée (µg/µL) | Concentration moyenne (µg/µL) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RL | 1/50 (1) | 0.408 | 112.7 | 5636 | 5726 | 5.94 |
| | 1/50 (2) | 0.421 | 116.3 | 5816 | | |
| | 1/100 (1) | 0.216 | 59.7 | 5968 | 6161 | |
| | 1/100 (2) | 0.23 | 63.5 | 6355 | | |
| | | | | | | |
| REC | 1/50 (1) | 0.261 | 72.1 | 3606 | 3682 | 3.95 |
| | 1/50 (2) | 0.272 | 75.2 | 3758 | | |
| | 1/100 (1) | 0.159 | 43.9 | 4393 | 4227 | |
| | 1/100 (2) | 0.147 | 40.6 | 4061 | | |
| | | | | | | |
| DHL | 1/50 (1) | 0.335 | 92.6 | 4628 | 4690 | 4.91 |
| | 1/50 (2) | 0.344 | 95 | 4752 | | |
| | 1/100 (1) | 0.178 | 49.2 | 4918 | 5125 | |
| | 1/100 (2) | 0.193 | 53.3 | 5332 | | |
| | | | | | | |
| VAL | 1/50 (1) | 0.322 | 89 | 4448 | 4455 | 4.53 |
| | 1/50 (2) | 0.323 | 89.2 | 4462 | | |
| | 1/100 (1) | 0.16 | 44.2 | 4421 | 4600 | |
| | 1/100 (2) | 0.173 | 47.8 | 4780 | | |

Tableau 10 : Concentration moyenne des lignées cellulaires.

### 1-2-1-2-Western Blot

Intégrité anticorps :

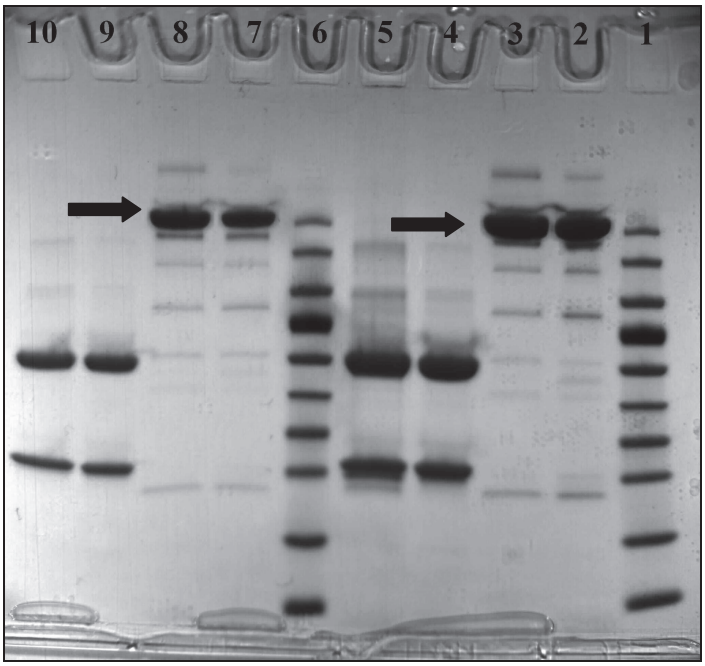



Figure 39: gel de polyacrylamide. 1-marqueur de taille ; 2 - Rituximab 5 µl sans DTT ; 3 - Rituximab-Df-Bz-NCS 5 µl sans DTT ; 4 - Rituximab 5 µl + DTT ; 5 - Rituximab-Df-Bz-NCS 5 µl + DTT ; 6 - marqueur de taille ; 7 - Rituximab 2 µl sans DTT ; 8 - Rituximab-Df-Bz-NCS 2µl sans DTT ; 9 - Rituximab 2 µl + DTT ; 10-Rituximab-Df-Bz-NCS 2 µl + DTT.

Nous pouvons constater que la migration du Rituximab est identique à celle du Rituximab-Df-Bz-NCS. Les conditions dénaturantes (DTT) permettent d'observer jusqu'où auraient pu migrer nos échantillons si leurs structures avaient été dégradées. Le Rituximab n'a donc pas été dégradé lors du couplage avec le chélateur.

Spécificité anticorps :

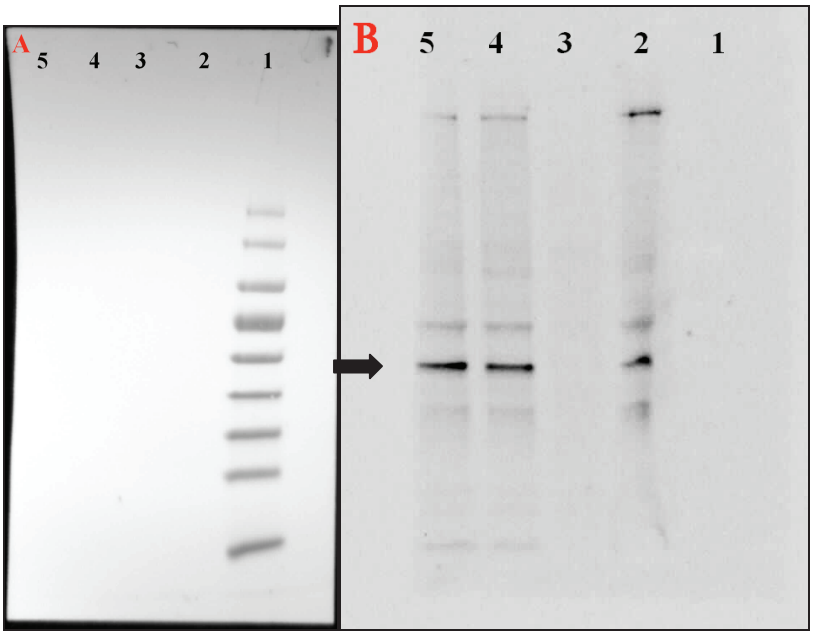



Figure 40: WB 1-marqueur de taille ; 2-REC ; 3-HEK ; 4-VAL ; 5-DHL. A- Rituximab, prévisualisation de la membrane avant chémiluminescence. B- Rituximab, membrane révélée.

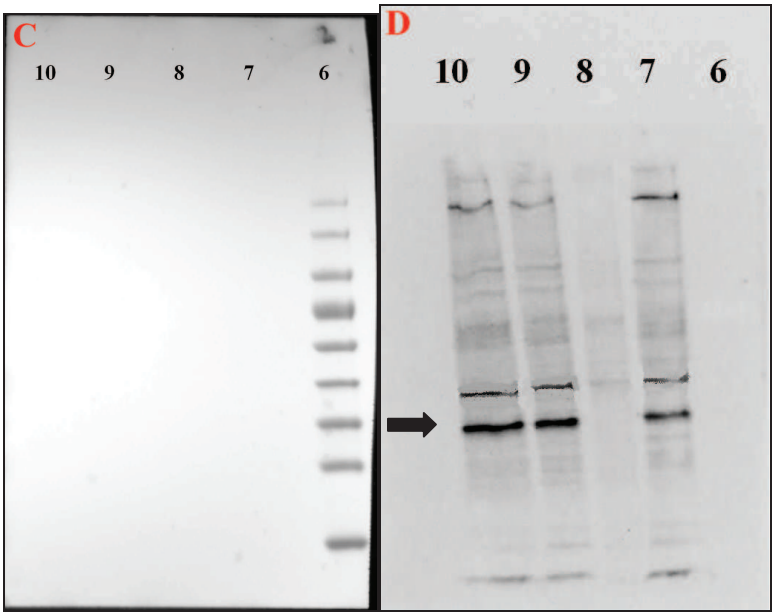



Figure 41: WB 6-marqueur de taille ; 7-REC ; 8-HEK ; 9-VAL ; 10-DHL C- Rituximab-Df-Bz-NCS, prévisualisation de la membrane avant chémiluminescence. D- Rituximab-Df-Bz-NCS, membrane révélée.

Nous pouvons constater que la migration du Rituximab est identique à celle du Rituximab-Df-Bz-NCS. Une bande significative est observée pour les 3 lignées (REC, VAL, DHL), correspondant sans doute à la reconnaissance du CD20. Bande non présente pour la lignée

HEK qui est CD20-. Le couplage du Rituximab avec le chélateur n'a donc pas affecté la spécificité de l'anticorps vis-à-vis de son antigène CD20.

## 1-3-Radiomarquage

### 1-3-1-Radiomarquage avec le $^{89}Zr$

D'après le protocole de Vosjan [75], nous pouvons calculer le rendement global de radiomarquage.

$$\frac{\text{Activité de } ^{89}\text{Zr après radiomarquage}}{\text{Activité de } ^{89}\text{Zr initiale}} \text{ X } 100 = \frac{990}{1200} \text{ x}100 = 82{,}5\%$$

A noter que nous avons une activité spécifique initiale de 0,56 mCi/mg car notre Ac est à une concentration de 0,9 mg/ml avec une activité volumique de 0,5 mCi/ml.

## 1-3-2-Contrôle Qualité sur Radiomarquage

### 1-3-2-1-ITLC (Instant thin-layer chromatography)

Contrôle qualité par l'ITLC après radiomarquage du Rituximab-Df-Bz-NCS avec le $^{89}Zr$

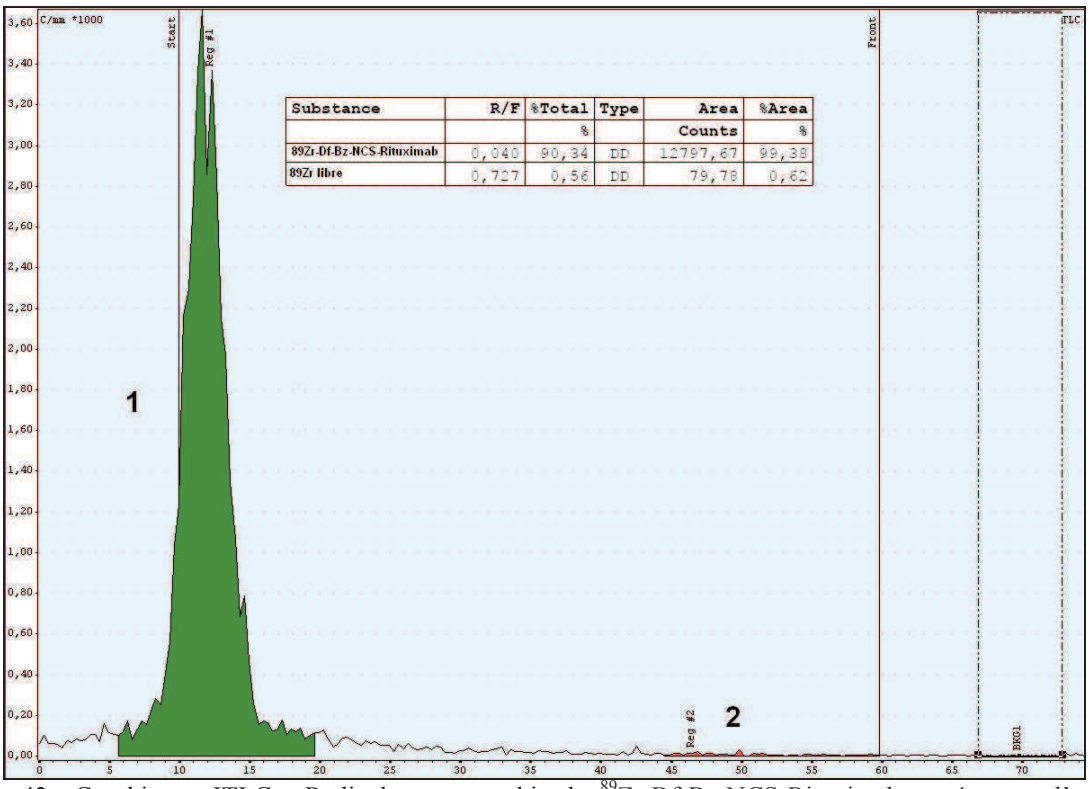



Figure 42 : Graphique ; ITLC - Radiochromatographie du $^{89}Zr$-Df-Bz-NCS-Rituximab représentant l'activité (CPM) en fonction de la distance parcourue. 1-Pic d'activité du $^{89}Zr$-Df-Bz-NCS-Rituximab au niveau du point de dépôt. 2-Activité du $^{89}Zr$ libre au niveau du front de solvant.

La radiochromatographie nous permet d'évaluer la pureté radiochimique de notre préparation.

Pureté radiochimique = 99,38%

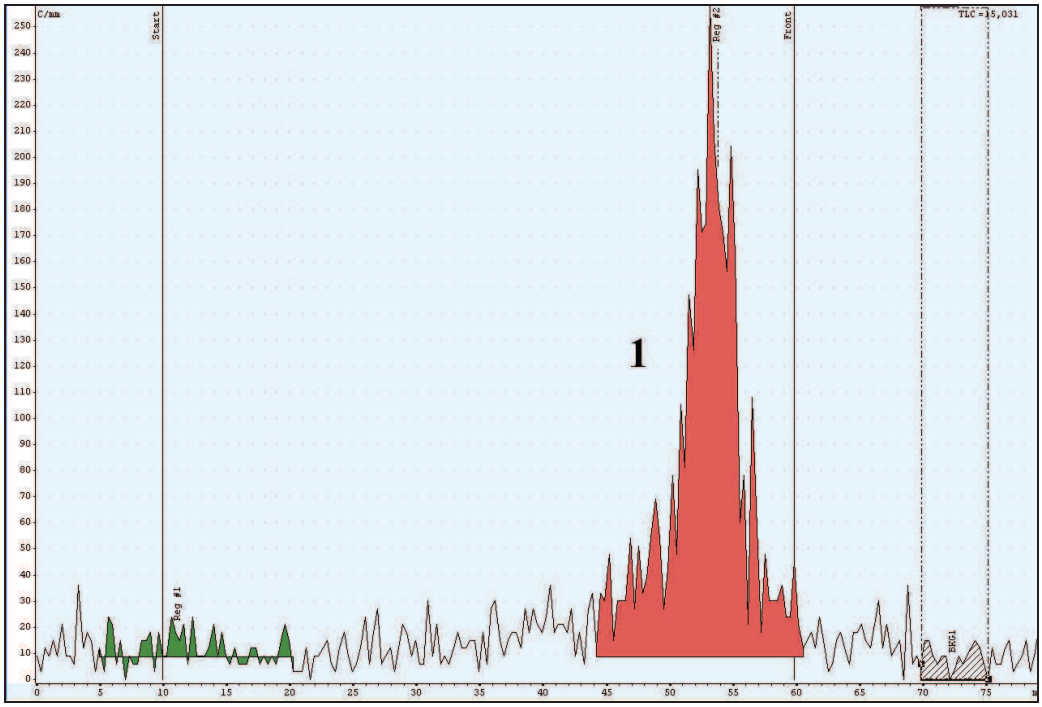



Figure 43 : Graphique ; ITLC-Chromatographie du $^{89}$Zr seul représentant l'activité (CPM) en fonction de la distance parcourue 1-Pic d'activité du $^{89}$Zr seul au niveau du front de solvant.

Cette radiochromatographie nous permet de nous assurer que le $^{89}$Zr seul migre bien jusqu'au front de solvant, et ainsi de valider nos résultats avec le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab.

### 1-3-2-3-HPLC (Chromatographie liquide haute performance)

Contrôle qualité par HPLC après radiomarquage du Rituximab-Df-Bz-NCS avec le $^{89}Zr$

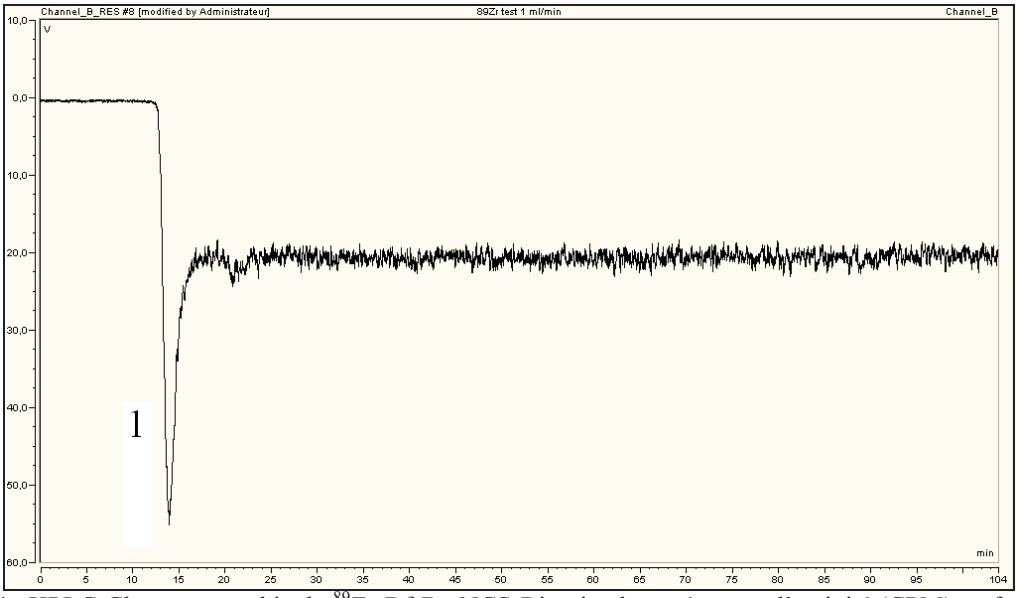



Figure 44 : HPLC-Chromatographie du $^{89}Zr$-Df-Bz-NCS-Rituximab représentant l'activité (CPM) en fonction du temps. 1-Pic d'activité du $^{89}Zr$-Df-Bz-NCS-Rituximab sortant de la colonne après 15 minutes. Débit colonne 0,5ml/min, Après 30 minutes de rinçage par l'éluant HPLC, injection de 20 à 30 µl d'échantillon.

L'HPLC nous permet de nous assurer que le $^{89}Zr$-Df-Bz-NCS-Rituximab est bien élué en une fois. Ainsi, nous pouvons affirmer que notre radiomarquage a bien été effectué, mais aussi qu'il a été fait sur un anticorps entier et non pas des fragments d'anticorps, ce qui aurait induit l'apparition d'autre pic sur le graphique. Une activité résiduelle persiste après l'élution de notre échantillon, cela étant dû à une contamination de la colonne ne permettant pas de retour à une activité nulle.

### 1-3-2-3-Stabilité

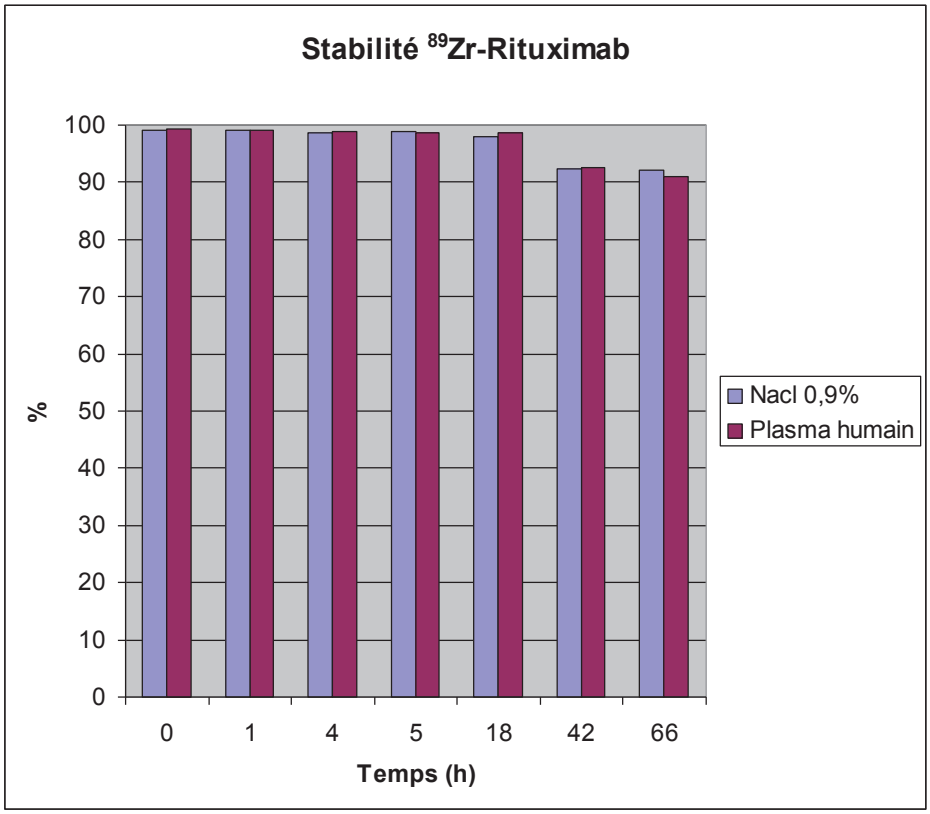
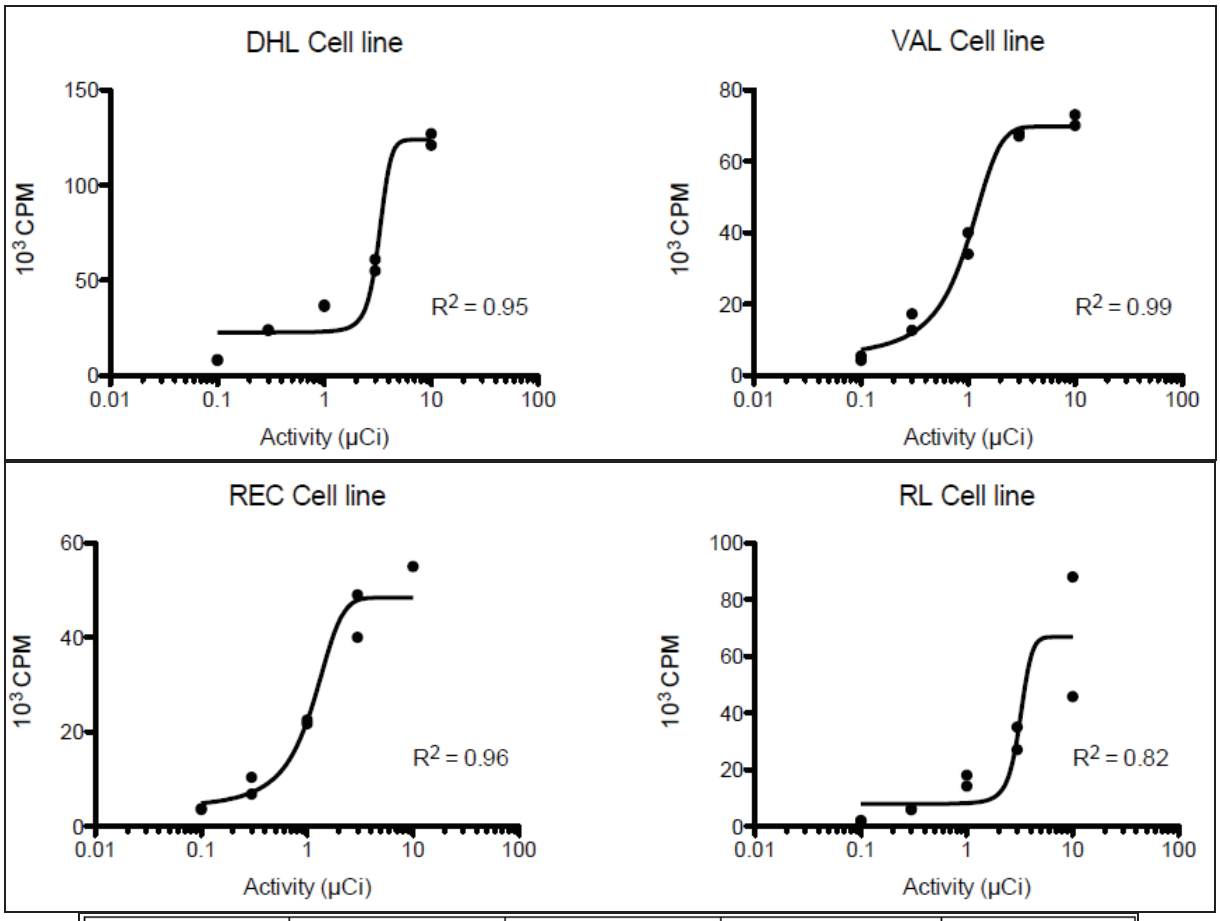



Figure 45 : Histogramme. Stabilité (%) de la préparation à différents temps dans du plasma humain et du NaCl 0,9%.

Nous pouvons observer que quel que soit le milieu dans lequel est introduit le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab, la stabilité observée est excellente avec une valeur > 90% après 3 jours de contact entre l'échantillon et les milieux.

### 1-3-2-4-Compétition

Etape de saturation :




| | DHL Cell line | VAL Cell line | REC Cell line | RL Cell line |
|---|---|---|---|---|
| LogIC50 | 3.265 | 0.8977 | 1.078 | 3.184 |

Figure 46 : Saturation des récepteurs des différentes lignées cellulaires. Courbe de l'activité calculée en fonction de l'activité d'anticorps radiomarqué (µCi) ajoutée aux cellules. Tableau des valeurs du Kd pour chaque lignée cellulaire.

On constate que les lignées DHL et RL présentent un coefficient de corrélation ($R^2$) plus faible, dû à l'éloignement plus important entre la courbe et les points. On peut en déduire que, pour ces deux lignées, le remplissage des récepteurs cibles par l'anticorps est incomplet. Les lignées VAL et REC présentent un coefficient de corrélation ($R^2$) meilleur se traduisant par l'apparition d'un plateau significatif aux fortes concentrations d'anticorps. Les récepteurs cibles pour ces deux lignées sont donc saturés par l'anticorps.

L'activité mesurée indique la quantité de sites cibles présents sur nos différentes lignées cellulaires. La lignée DHL qui, avec près de 130 x $10^3$ coups par minute (CPM) sans arriver à

un plateau de saturation, présente plus de sites de liaison que REC avec un plateau à 60 x $10^3$ CPM et que VAL avec un plateau à 70 x $10^3$ CPM.
Le calcul du Kd permet d'apprécier la capacité de reconnaissance de l'anticorps vis-à-vis des récepteurs cibles. Pour rappel, le Kd est la concentration du ligand donnant une occupation de la moitié des récepteurs. On observe donc que le Kd de REC et VAL est faible et que le Kd de DHL et RL sera bien plus important. Ainsi, les récepteurs de la lignée DHL sont moins bien reconnus que ceux de la lignée VAL.

Etape de compétition :

Pour cette étape nous avons sélectionné la lignée VAL car ces récepteurs sont bien saturés par les fortes concentrations d'anticorps utilisés.

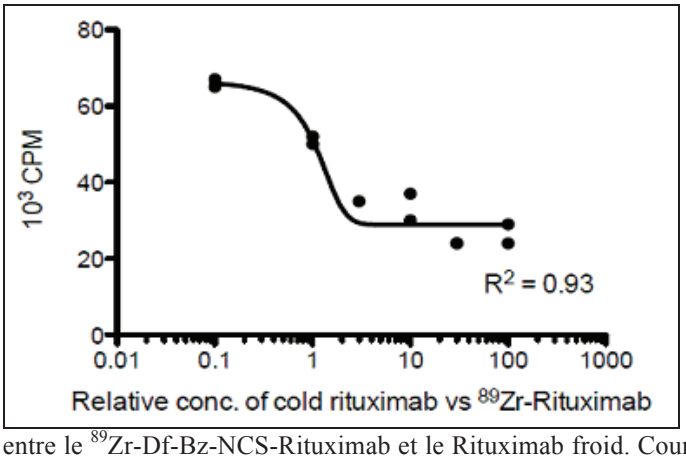



Figure 47 : Compétition entre le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab et le Rituximab froid. Courbe de l'activité calculée en fonction de la quantité d'anticorps froid (µCi) ajoutée aux cellules.

Nous pouvons observer une courbe décroissante traduisant le remplacement du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab par le Rituximab froid ajouté en quantité de plus en plus importante (x0,1 ; x1 ; x10 ; x30 ; x100).
La courbe a l'allure typique des études de compétition et permet d'affirmer que le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab se fixe bien spécifiquement sur ces récepteurs cibles (CD20).
L'activité résiduelle, après ajout de Rituximab froid x100, est sans doute due à l'internalisation des récepteurs après fixation de l'anticorps $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab permettant de continuer à produire de l'activité sans pouvoir être délogée après l'ajout du Rituximab froid. Nous aurions pu le prouver en ajoutant aux cellules au départ de fortes quantités de $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab permettant de saturer tous les récepteurs, et ainsi de

tous les internaliser. Puis, lors de l'ajout du Rituximab froid en excès (après un certain moment), l'anticorps froid n'ayant plus de récepteurs cibles à lier n'aurait pas pu déplacer le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab. L'activité alors mesurée sera constante car non affectée par l'ajout de l'anticorps froid. De plus, cette activité ne peut pas être une activité non spécifique car l'anticorps froid reconnaît les mêmes antigènes que l'anticorps radiomarqué, à moins que certains Ac marqués n'aient pu se fixer directement sur le tube.

### 1-3-2-5-Immunoréactivité

Cette expérience nous permettra de déterminer la fraction immunoréactive du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab. Pour rappel, des concentrations cellulaires décroissantes sont mises au contact d'une même quantité d'anticorps radiomarqué.

Lignée VAL (2,5-1,25-0,625-0,312-0,156 x$10^6$ cellules/ml) :

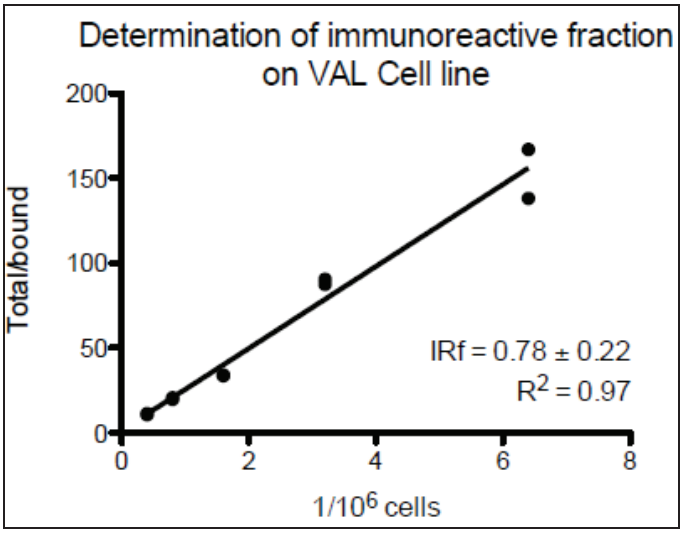



Figure 48 : Détermination de la fraction immunoreactive du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab. Courbe représentant l'inverse de la fraction liée en fonction de l'inverse des concentrations cellulaires.

Cette courbe nous permet donc de calculer la fraction immunoréactive qui correspond à l'intersection entre la droite et l'axe des ordonnées.

Fraction immunoréactive = 78 % ± 22%

Lignée REC (5,5-2,75-1,375-0,6875-0,34375 x$10^6$ cellules/ml) :

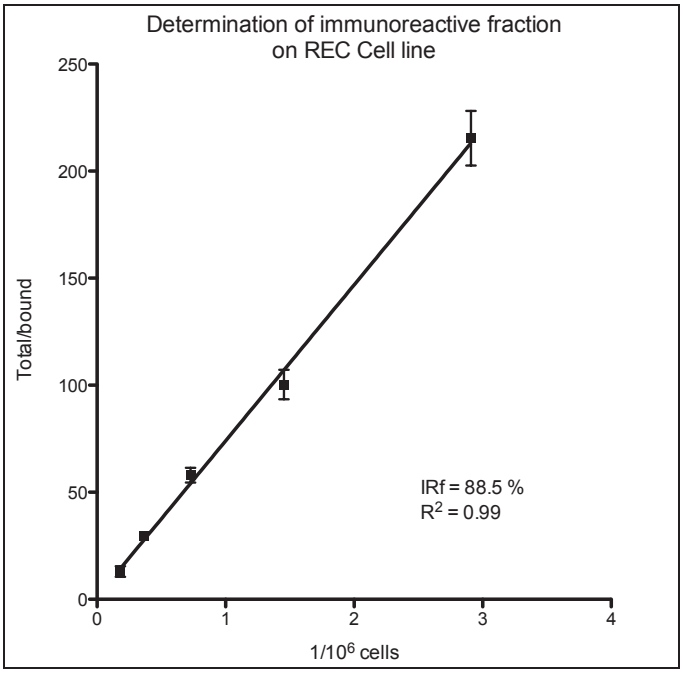



Figure 49 : Détermination de la fraction immunoreactive du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab. Courbe représentant l'inverse de la fraction liée en fonction de l'inverse des concentrations cellulaires.

Cette courbe nous permet donc de calculer la fraction immunoréactive qui correspond à l'intersection entre la droite et l'axe des ordonnées.

Fraction immunoréactive = 88,5%

Nous obtenons d'excellents résultats avec une fraction immunoréactive, soit la quantité de l'anticorps conjugué qui est capable de se lier à l'antigène ciblé, de 78 % pour la lignée VAL et de 84% pour la lignée REC.

## 1-4-Expérience sur le petit animal

### 1-4-1-Injection *in vivo*

Injection du $^{18}$F-FDG :

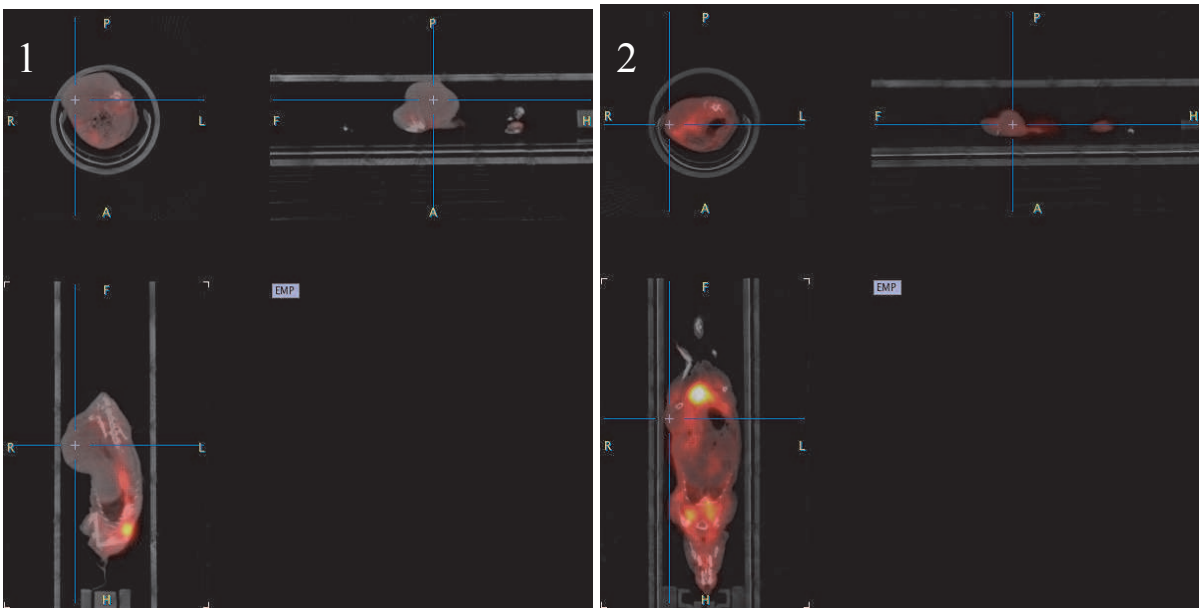



Figure 50 : Fusion MicroPET-Nanospect/CT après l'injection de $^{18}$F-FDG. 1- Souris REC ; Image +1h. 2- Souris DHL ; Image +1h.

Après injection de $^{18}$F-FDG, le niveau global de fixation sur les différentes coupes est faible. Il n'existe aucun foyer d'hyperfixation au niveau de la tumeur (indiquée par la croix).
Chez la souris DHL, on observe un hypermétabolisme vésical, correspondant à l'élimination physiologique du traceur.

Injection du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab :

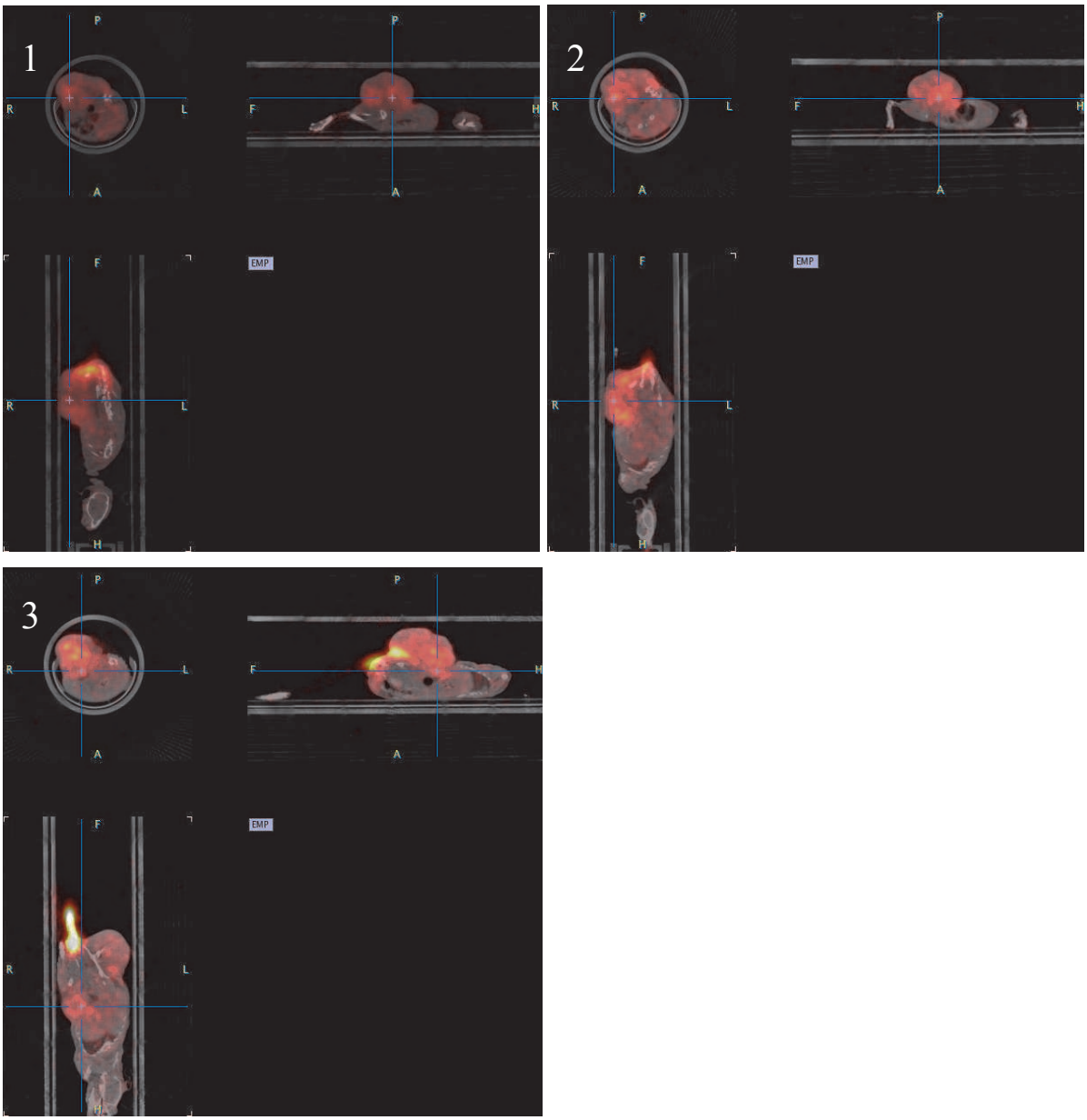



Figure 51 : Fusion MicroPET-Nanospect/CT après l'injection de $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab ; Souris REC. 1-24h ; B-48h ; C-72h.

Après injection du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab chez la souris REC, on constate sur les différentes coupes un foyer d'hyperfixation spécifique du traceur au niveau du site tumoral (indiqué par la croix). Cette captation est présente dès 24 heures et s'intensifie après 48 et 72 heures et présente un rapport signal tumoral sur bruit de fond élevé.

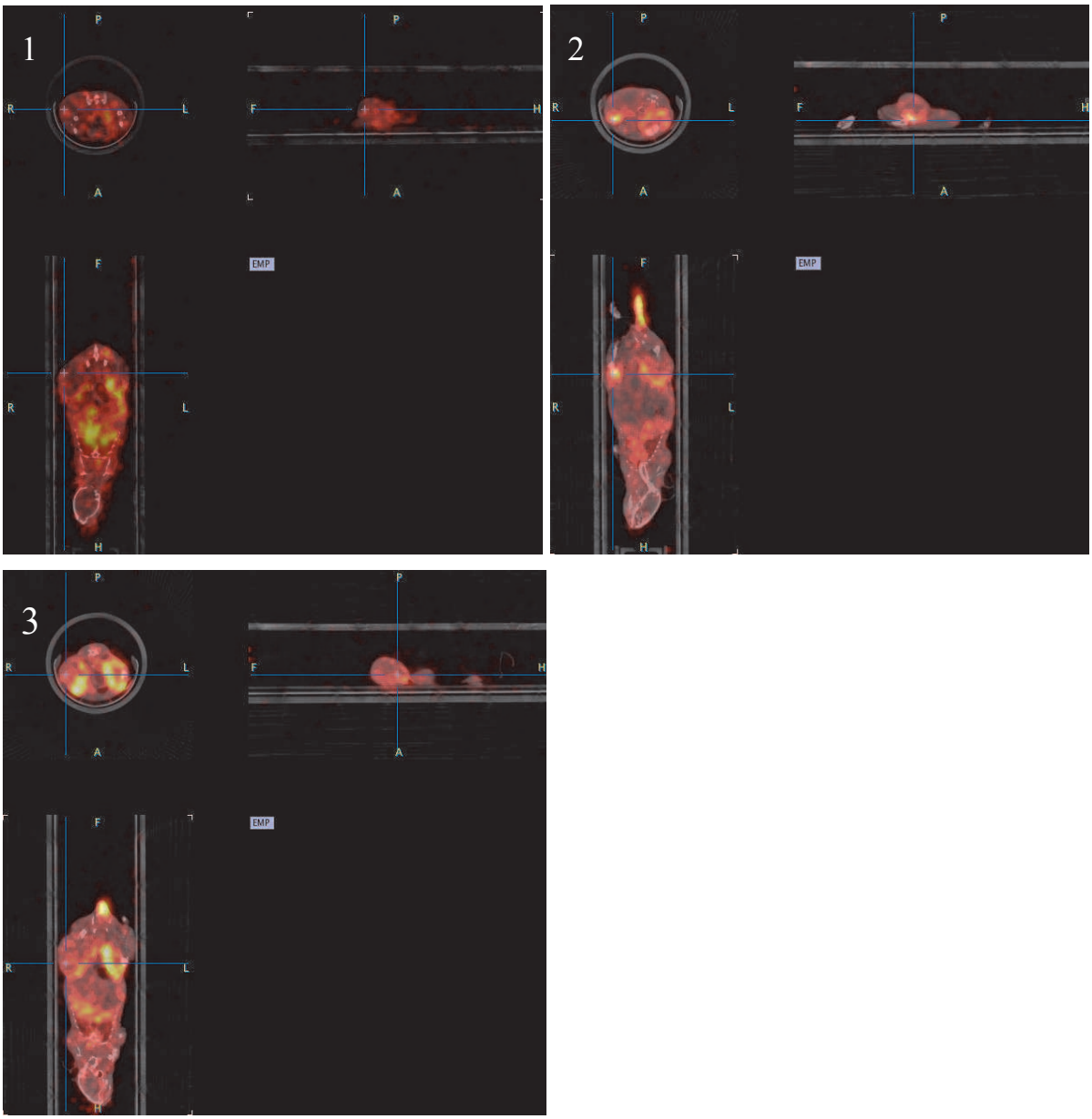



Figure 52 : Fusion MicroPET-Nanospect/CT après l'injection de $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab ; Souris DHL. 1-24h ; 2-48h ; 3-72h.

Après injection du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab chez la souris DHL, on observe sur les différentes coupes plusieurs intensités de fixation du traceur au niveau du site tumoral (indiqué par la croix). En effet, chez la souris DHL, nous pouvons constater après 24 heures un bruit de fond plus marqué qui s'atténue après 48 heures et qui permet d'observer une hyperfixation spécifique du traceur au niveau tumoral. Cependant, après 72 heures on constate que le rapport signal tumoral sur bruit de fond diminue légèrement.

# 2-Anti-TACI

Suite aux résultats convaincants avec le Rituximab, nous avons effectué les mêmes étapes de préparations et de contrôles qualités que pour le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-anti-TACI.

## 2-1-Lignées cellulaires

Pour cette partie consacrée à l'étude de notre anti-TACI, nous utiliserons deux lignées cellulaires, VAL et DHL.

### 2-1-1-Culture cellulaire – viabilité et comptage

Nos deux lignées, par observation microscopique, ont été comptées et nous avons estimé leur viabilité. Pour chacune des lignées, deux comptages ont été effectués.

| Lignées cellulaires | Viabilité | Nombre cellules Carré 1 | Nombre cellules Carré 2 | Nombre cellules Carré 3 | Taux viabilité (%) | Concentration cellulaire (Millions/ml) | Concentration moyenne (Millions/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| REC 1er comptage | Viable | 99 | 96 | 56 | 93 | 4,2 | 5,3 |
| | Non viable | 9 | 5 | 3 | | | |
| REC 2ème comptage | Viable | 179 | 119 | 88 | 95 | 6,4 | |
| | Non viable | 12 | 6 | 3 | | | |
| DHL 1er comptage | Viable | 62 | 71 | 51 | 85 | 3 | 2,3 |
| | Non viable | 6 | 5 | 13 | | | |
| DHL 2ème comptage | Viable | 41 | 30 | 24 | 85 | 1,6 | |
| | Non viable | 7 | 6 | 4 | | | |

Tableau 11: Taux de viabilité et concentration moyenne des différentes lignées cellulaires.

### 2-1-2-Caractérisation des lignées cellulaires

#### 2-1-2-1-FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

L'analyse cytométrique de nos cellules a été faite en absence (témoin négatif) et présence d'anticorps anti anti-TACI. Les résultats obtenus n'ont pas été concluants car l'expérience n'a

pas fonctionné. Nous n'avons pas vu de différence de signal entre les lignées REC (TACI+) et DHL (TACI-) après l'ajout de l'Ac secondaire, cela étant sans doute dû à un problème technique.

**2-1-2-2-RT-MLPA (Reverse Transcriptase-Multiplex ligation-dependent probe amplification)**

Comme nous l'avons vu précédemment (voir 1-1-2-2) la lignée VAL est TACI+ et la lignée DHL est TACI-.

## 2-2-Le couplage

### 2-2-1-Contrôle Qualité sur couplage Df-BzNCS + Anti TACI

#### 2-2-1-1-Extraction et dosage des protéines

Les résultats obtenus sont les mêmes que dans la partie 1-2-1-1

#### 2-1-1-2-Western Blot

Intégrité anticorps :

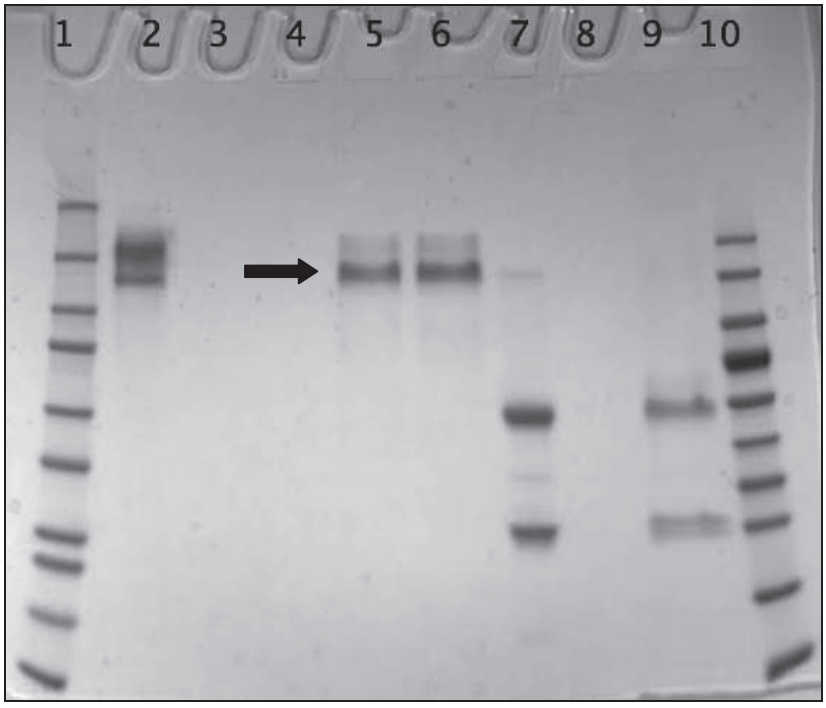



Figure 53: gel de polyacrylamide. 1-marqueur de taille ; 2 – Anti-TACI 8 µl sans DTT ; 3 – Eluat n°1 d'Anti-TACI-Df-Bz-NCS 20 µl sans DTT ; 4 - Eluat n°2 d'Anti-TACI-Df-Bz-NCS 20 µl sans DTT ; 5 - Eluat n°3 d'Anti-TACI-Df-Bz-NCS 20 µl sans DTT ; 6 - Eluat n°4 d'Anti-TACI-Df-Bz-NCS 20 µl sans DTT ; 7 - Anti-TACI 8 µl + DTT ; 8 - Eluat n°2 d'Anti-TACI-Df-Bz-NCS 20 µl + DTT; 9 - Eluat n°3 d'Anti-TACI-Df-Bz-NCS 20 µl + DTT ; 10- marqueur de taille .

Nous pouvons constater que la migration de l'anti-TACI est identique à celle de l'anti-TACI-Df-Bz-NCS. Les conditions dénaturantes (DTT) permettent d'observer jusqu'où auraient pu

migrer nos échantillons si leurs structures avaient été dégradées. L'anti-TACI n'a donc pas été dégradé lors du couplage avec le chélateur. De plus, nous avons divisé notre élution issue de la colonne PD-10 en quatre afin d'obtenir un Ac dans un petit volume et donc à une concentration plus importante. Nous avons donc pu constater que notre anticorps se trouvait dans nos éluats n° 3 et 4.

Spécificité Ac :

Nous ne disposions pas d'anticorps secondaire anti-rat HRP compatible avec le WB. Nous avons donc effectué un premier Western Blot avec un anticorps secondaire anti-mouse HRP. Cet Ac secondaire a été mis au contact de l'Ac primaire anti-TACI non chélaté. Nous ne voulions pas essayer cet Ac secondaire sur notre Ac anti-TACI chélaté au vu de la très petite quantité dont nous disposions. En effet, la fixation des secondaires anti-mouse sur des primaires de rat n'était pas certaine de s'effectuer.

Figure 54: WB 1-marqueur de taille ; 2-REC ; 3-DHL ; 4 DHL ; Révélation de la membrane après ajout de l'Ac secondaire sur l'Ac anti-TACI non chélaté.

Comme pressenti, les résultats obtenus ne sont pas concluants. En effet, nous observons après révélation de la membrane une image typique de bruit de fond non significatif. La même émission est observable autant sur les lignées TACI- que sur les lignées TACI+. Nous n'avons donc pas fait l'essai avec notre anti-TACI chélaté. La seconde hypothèse serait que l'Ac primaire anti-TACI ne se soit pas fixé sur la protéine TACI, mais cela est plus improbable.

## 2-3-Radiomarquage

### 2-2-1-Radiomarquage avec le $^{89}$Zr

D'après le protocole de Vosjan [75], nous pouvons calculer le rendement global de radiomarquage.

$$\frac{\text{Activité de } ^{89}\text{Zr après radiomarquage}}{\text{Activité de } ^{89}\text{Zr initiale}} \times 100 = \frac{0{,}297}{2} \times 100 = 15\%$$

A noter que nous avons une activité spécifique initiale de 1,48 mCi/mg car notre Ac est à une concentration de 0,1 mg/ml avec une activité volumique de 0,148 mCi/ml.

## 2-2-2-Contrôle Qualité sur Radiomarquage

### 2-2-2-1-ITLC

Contrôle qualité par l'ITLC après radiomarquage de l'Anti-TACI-Df-Bz-NCS avec le $^{89}Zr$

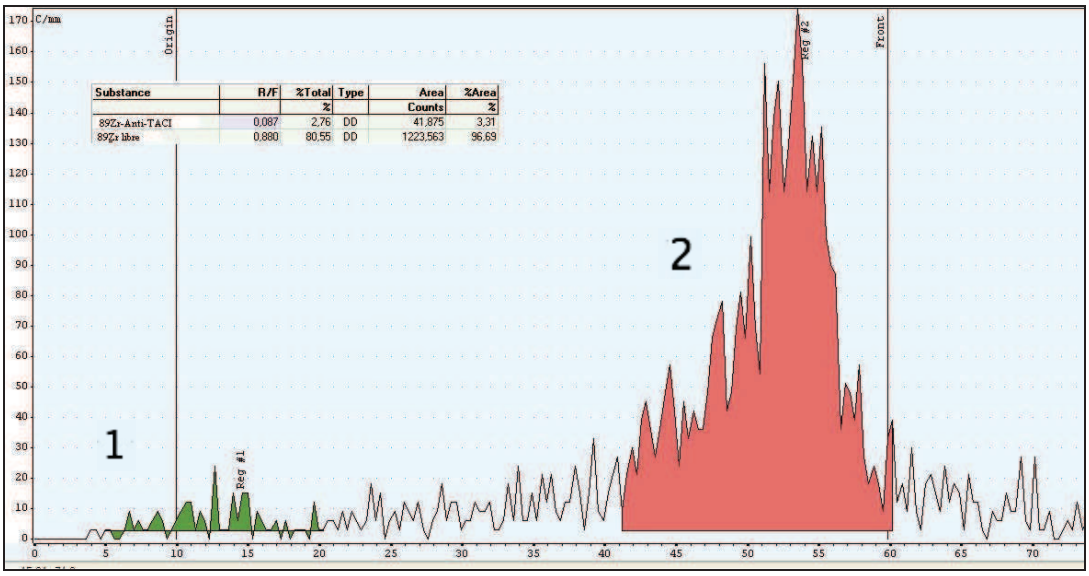



Figure 55 : Graphique ; ITLC-Chromatographie du $^{89}Zr$-Df-Bz-NCS-Anti-TACI représentant l'activité (CPM) en fonction de la distance parcouru. 1-Pic d'activité du $^{89}Zr$-Df-Bz-NCS- Anti-TACI au niveau du point de dépôt. 2-Activité du $^{89}Zr$ libre au niveau du front de solvant.

La radiochromatographie nous permet d'évaluer la pureté radiochimique de notre préparation.

Pureté radiochimique = 3,11%

Ces faibles résultats de PRC peuvent être expliqués par la quantité extrêmement faible d'anticorps dont nous disposions. En effet, nous avions près de 50 fois moins d'anti-TACI (0,1mg) par rapport au Rituximab (5mg) de la première partie. Cela aboutissant donc à une quantité très importante de $^{89}Zr$ libre.

#### 2-2-2-2-HPLC

Contrôle qualité par HPLC après radiomarquage de l'Anti-TACI-Df-Bz-NCS avec le $^{89}$Zr. L'HPLC n'a pu être effectué car, au vu des résultats de PRC, les contrôles qualités additionnels n'ont pas d'intérêt spécifique.

#### 2-2-2-3-Stabilité

L'évaluation de la stabilité n'a pu être effectuée car, au vu des résultats de PRC, les contrôles qualités additionnels n'ont pas d'intérêt spécifique.

#### 2-2-2-4-Compétition

Les étapes de compétitions n'ont pu être effectuées car, au vu des résultats de PRC, les contrôles qualités additionnels n'ont pas d'intérêt spécifique.

#### 2-2-2-5-Immunoreactivité

La détermination de la FI n'a pu être effectuée car, au vu des résultats de PRC, les contrôles qualités additionnels n'ont pas d'intérêt spécifique.

## 2-4-Expérience sur le petit animal

### 2-4-1-Immunohistochimie

La lecture des lames d'immunohistochimie issue des tissus tumoraux, de souris nude NU/NU ayant reçu nos lignées DHL et REC, nous permet d'apprécier la coloration membranaire des cellules attestant de la présence - ou non - du récepteur membranaire TACI. Pour rappel, les essais ont été effectués avec un Ac primaire anti-TACI de souris et un Ac primaire anti-TACI de rat.

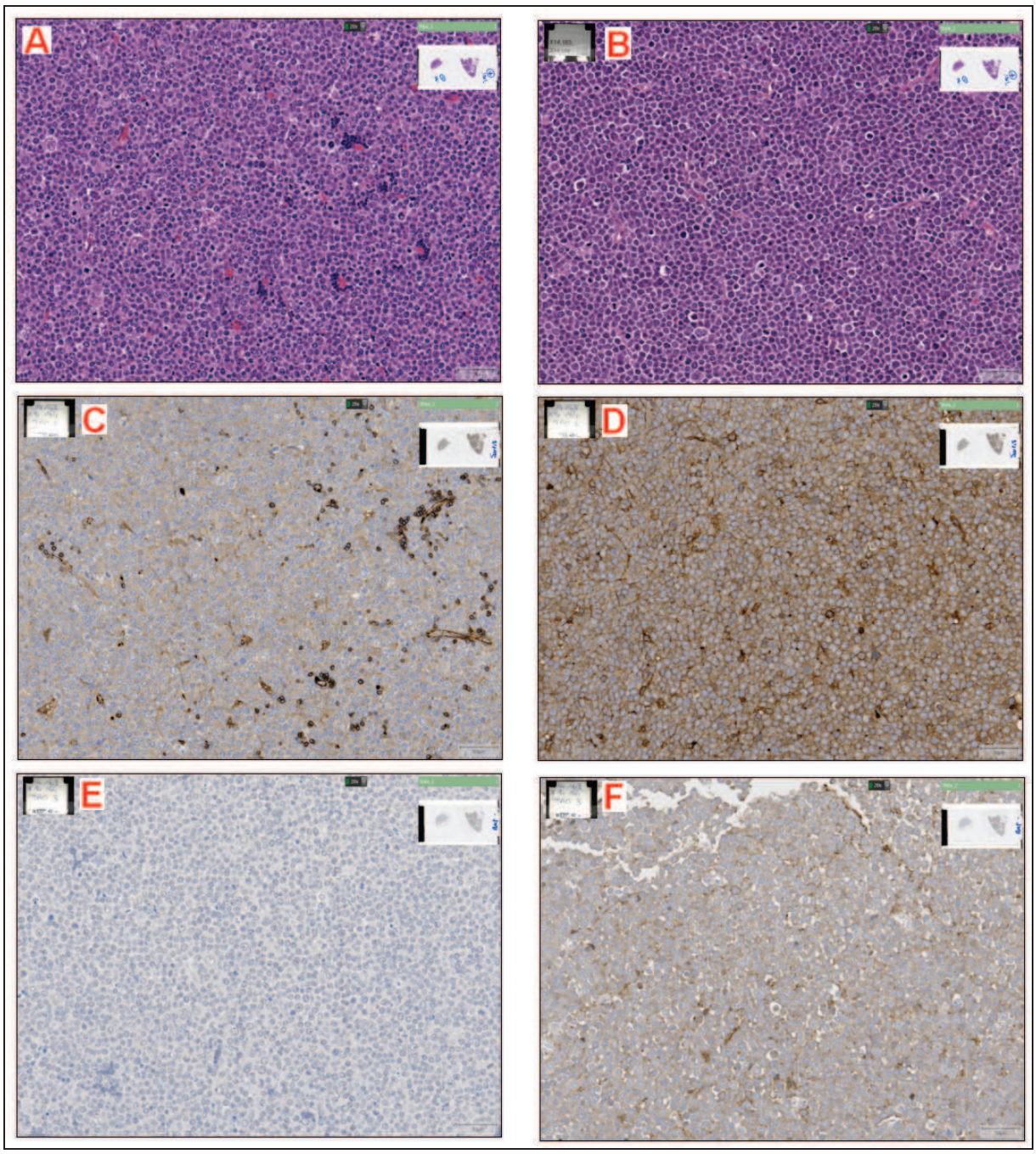



Figure 56 : Lecture de lame par scanner de lames de coupe de tissu tumoral issu de souris nude NU/NU inoculées par lignées celulaire DHL et REC. A : Coloration standard lignée DHL ; B : Coloration standard lignée REC ; C : immunohistochimie avec Ac primaire souris sur lignée DHL ; D : immunohistochimie avec Ac primaire souris sur lignée REC ; E : immunohistochimie avec Ac primaire rat sur la lignée DHL ; F : immunohistochimie avec Ac primaire rat sur lignée REC.

Grace à ces lectures de lames, nous observons que la lignée REC présente une coloration indiquant la présence de TACI membranaire, contrairement à la lignée DHL. De plus, nous obtenons une information complémentaire qui est que la lignée, une fois injectée, conserve toujours l'expression du TACI.

Nous avons également effectué une lecture des lames d'immunohistochimie obtenue à partir de ganglion de patient atteint de LDGCB, qui permet de confirmer notre hypothèse de départ stipulant que les LDGCB de sous-type GCB sont bien TACI- et inversement pour le sous-type ABC.

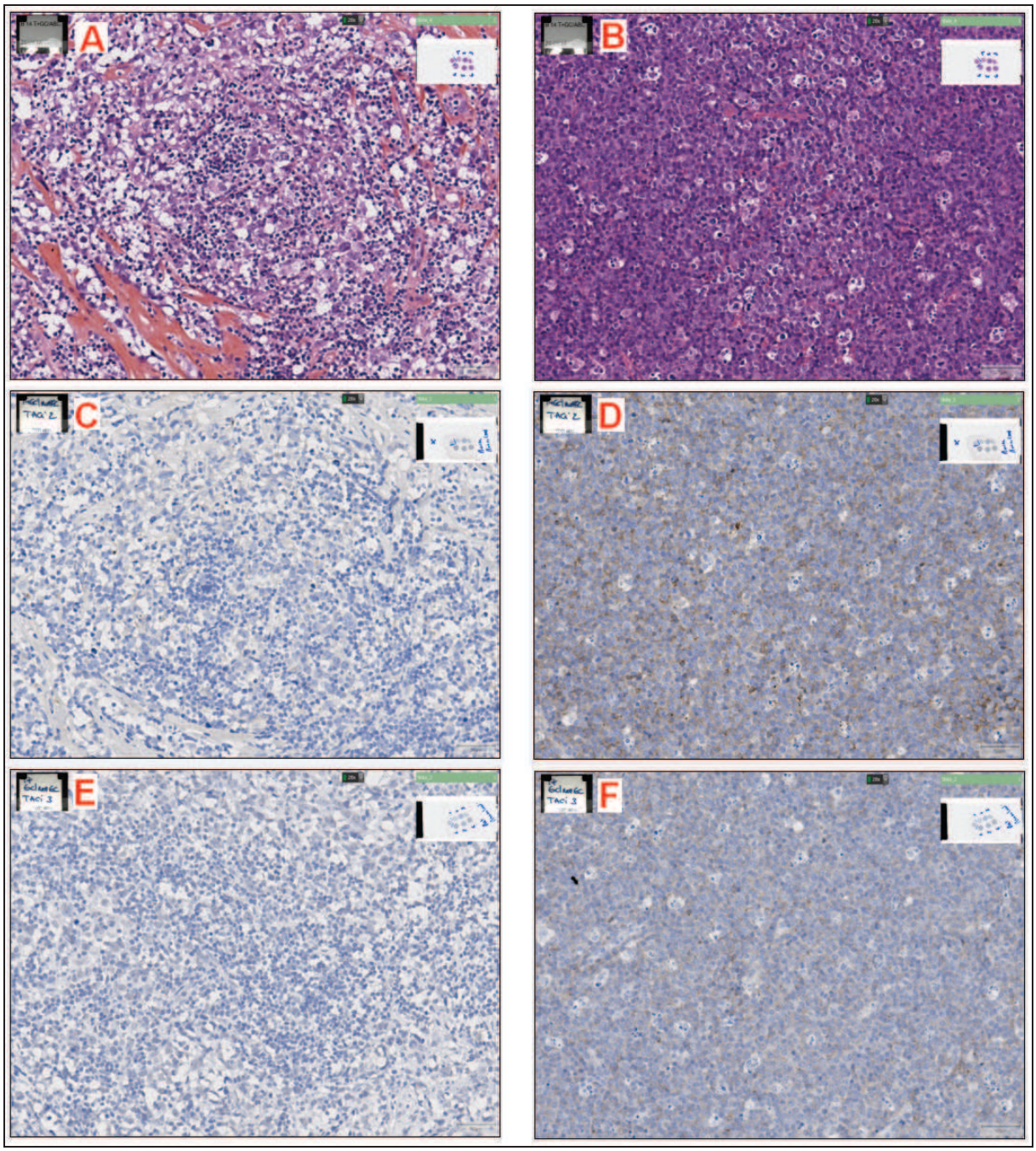



Figure 57: Lecture de lame par scanner de lames de coupe de ganglion issu de patient atteint de LDGCB. A : Coloration standard LDGCB GCB; B : Coloration standard LDGCB non GCB; C : immunohistochimie avec Ac primaire souris sur LDGCB GCB; D : immunohistochimie avec Ac primaire souris sur LDGCB non GCB; E : : immunohistochimie avec Ac primaire rat sur LDGCB GCB ; F : : immunohistochimie avec Ac primaire rat sur LDGCB non GCB.

Nous pouvons donc constater une coloration significative pour la tumeur REC, attestant donc de la présence de TACI à la membrane cellulaire et, inversement, une coloration membranaire nulle pour la tumeur DHL. Les lames issues de tumeur de patients nous permettent de confirmer notre hypothèse de départ qui est que le TACI s'exprime sur des lignées non GCB.

Pour ces deux tests, nous obtenons une information complémentaire qui est que la lignée, une fois injectée, conserve l'expression du TACI.

### 2-4-2-Injection *in vivo*

Suite à la très faible PRC après radiomarquage, nous n'avons pas pu procéder à l'injection du produit.

# Discussion

Afin de pouvoir distinguer, par l'imagerie TEP, le sous-type ABC parmi les différents lymphomes non hodgkinien, nous avons développé un nouveau traceur immunologique utilisant le Zirconium-89 chélaté à la desferioxamine couplé à un anticorps. Ce travail a été conduit dans l'espoir de pouvoir synthétiser un produit utilisable à terme chez des patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules B. Nous avons vu que le sous-type ABC présente une survie globale à cinq ans avec ou sans traitement (CHOP ; R-CHOP) moins bonne que le sous-type GCB [18 ; 19 ; 21]. Dans ce travail nous avons prouvé, dans un premier temps, notre capacité à synthétiser le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab et nous lui avons fait subir des contrôles afin de s'assurer de la qualité de notre préparation. Puis, dans un second temps, nous avons effectué les mêmes opérations sur un anticorps anti-TACI afin d'obtenir le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-anti-TACI. Cet anticorps permettra de cibler le TACI, récepteur inducteur de la voie de signalisation incluant le NF-κB, qui comme nous l'avons vu est spécifique des LDGCB de sous-types ABC [23]. Pour correspondre à la demi-vie de l'anticorps, il existe actuellement très peu de radionucleides à longue demi-vie pour TEP pour une utilisation dans des études cliniques. On peut citer le $^{89}$Zr et l'$^{124}$I. Bien que l'iodation d'un anticorps pour l'imagerie TEP soit simple [35], l'$^{124}$I présente certaines limites, comme une résolution inférieure, un bruit de fond plus important que le $^{89}$Zr [57] et une déiodination enzymatique entrainant une perte de signal [54]. Plus récemment, l'utilisation du $^{89}$Zr a été de plus en plus importante dans de nombreuses études [55]. Ceci est dû à son faible coût de production, sa pureté, sa stabilité et évidemment sa longue demi-vie qui en font un choix idéal pour le lier à un anticorps afin d'en faire un traceur pour TEP. D'autre part, le chélateur p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine (Df-Bz-NCS) est disponible dans le commerce pour le marquage du $^{89}$Zr et il a déjà montré de bonnes performances lorsqu'il est conjugué avec d'autres radionucleides comme le Gallium-68 [75]. Peu d'études ont montré que le DTPA peut être utilisé pour la chélation du $^{89}$Zr [69], le Desferal (Df) apparaît dans les années 1990 comme étant le meilleur chélateur pour le $^{89}$Zr [71 ; 72 ; 73]. Ce Desferal sera modifié dans les années 2000 en N-Sucdf [53], permettant une meilleure stabilité entre l'anticorps et le $^{89}$Zr. Pour notre étude, c'est bien le Df-Bz-NCS qui sera utilisé pour préparer le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-anticorps, par une méthode en deux étapes, en accord avec les procédures publiées [75].
Dans notre étude, nous avons utilisé différentes lignées cellulaires sur lesquelles nous avons pu tester nos différentes préparations. Après les avoir comptées et s'être assuré de leur viabilité, ces lignées cellulaires ont donc été caractérisées par FACS et RT-MLPA. Les

lignées REC et VAL sont CD20+ et TACI+ alors que les lignées DHL et RL sont CD20+ et TACI-.

Dans notre première partie consacrée à l'utilisation du Rituximab, nous avons pu constater grâce au Western Blot que le Rituximab-Df-Bz-NCS n'a pas subi de dégradation durant l'opération de couplage et qu'il a conservé sa spécificité vis-à-vis de sa cible, le CD20. Après le radiomarquage avec le $^{89}$Zr, le rendement global calculé est de 82,5% avec une activité spécifique de 0,56mCi/mg d'anticorps. Suite à ces résultats encourageants, nous avons effectué des contrôles qualités sur notre préparation, par ITLC et HPLC. La chromatographie sur couche mince a révélé une pureté radiochimique de plus de 99% (figure 42) et l'HPLC nous permet de confirmer que le marquage a été bien effectué sur un anticorps entier et non pas sur des fragments d'anticorps (figure 44). Le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab montre une bonne stabilité *in vitro* à plus de 3 jours à 37°C dans du NaCl 0,9% et dans du Plasma humain (Figure 45). Nos résultats confirment que le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab est bien stable sur une longue période dans le plasma humain à 37°C. Près de 3 jours après le marquage, la pureté radiochimique de notre produit est supérieure à 90%.

La figure 46 montre les étapes de compétition *in vitro* que nous avons fait subir à notre produit sur nos lignées cellulaires. L'étape de saturation nous a permis de connaître la lignée sur laquelle l'étape de compétition serait la meilleure. Il s'agit de la lignée VAL, qui, dans l'étape de saturation, présente un plateau de saturation attestant du remplissage total des sites cibles avec 10 µCi d'anticorps marqués. L'étape de compétition sur la lignée VAL entre le $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab et un excès (jusqu'à 100 x) de Rituximab non marqué permet d'affirmer que notre produit se fixe spécifiquement sur ces récepteurs cibles (figure 47). La fraction immunoréactive du $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab a été mesurée par un essai *in vitro* spécifique utilisant les lignées VAL et REC. La fraction immunoréactive de $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab s'est révélée être de 0,78 (± 0,22) avec la lignée VAL (figure 48) et de 0,88 avec la lignée REC (figure 49). Ces données montrent clairement que la préparation de traceur $^{89}$Zr-Df-Bz-NCS-Rituximab est très immunoréactive avec des liaisons spécifiques sur la lignée VAL et REC. Afin de clôturer les contrôles qualités de cet Ac radiomarqué, nous l'avons injecté à des souris nude NU/NU présentant des tumeurs de lignée DHL et REC. Après des acquisitions au Nanospect/CT-MicroPET à 24, 48 et 72 heures, nous observons une nette captation spécifique au niveau des tumeurs, confirmant ainsi l'efficacité *in vivo* de notre préparation (figure 51 et 52). De plus, cette captation est meilleure que la captation du $^{18}$F-FDG comme il peut l'être décrit dans la littérature [82].

Dans la seconde partie, nous avons utilisé l'anti-TACI. Nous avons pu constater grâce au Western Blot que l'Anti-TACI-Df-Bz-NCS ne subit également pas de dégradation durant l'opération de couplage (figure 53). Cependant, nous n'avons pas pu établir s'il a conservé sa spécificité vis-à-vis de sa cible car nous n'avions pas d'anticorps secondaire anti-rat HRP compatible avec le WB. Après l'étape de radiomarquage avec le $^{89}$Zr, le rendement global calculé est de 15% avec une activité spécifique de 1,48 mCi/mg d'anticorps. Malgré ces résultats très faibles, nous avons effectué des contrôles qualités sur notre préparation, en commençant par l'ITLC. La chromatographie sur couche mince a révélé une pureté radiochimique de 3,11% (figure 55). Suite à ces résultats, le contrôle qualité par HPLC, les études de stabilité, de compétition et d'immunoréactivité n'ont pas pu être effectués. Cette faible PRC est sans doute due au fait que nous ayons effectué notre radiomarquage avec des quantités très faibles d'Ac Anti-TACI (0,1mg) en comparaison avec nos essais sur le Rituximab (5mg).

Malgré l'impossibilité d'injecter à l'animal (préalablement xenogreffé par nos lignées) notre Anti-TACI radiomarqué, des expériences ont quand même pu être effectuées sur le petit animal avec cet Ac. Dans un premier temps, nous avons effectué une technique d'immunohistochimie sur des lames de coupe de tumeur de patient atteint de LDGCB. Cette expérience a permis de confirmer la présence du récepteur membranaire TACI à la surface de LDGCB non-GCB et l'absence du récepteur sur les LDGCB GCB (figure 57). Dans un second temps, nous avons testé des Ac anti-TACI (souris et rat) sur des coupes de tissu tumoral provenant de souris nude NU/NU ayant reçu des injections de lignée REC ou DHL. Ainsi, grâce à l'immunohistochimie, nous avons pu constater une coloration significative pour la tumeur REC, contrairement à la DHL (figure 56). Cela permet d'affirmer la présence de TACI à la membrane cellulaire, la qualité des Ac anti-TACI utilisés et que la lignée - une fois injectée - conserve l'expression du TACI.

La maitrise globale du radiomarquage, allant de la préparation jusqu'à l'injection chez l'animal étant acquise et reproductible, il est essentiel, pour la suite de ce projet, que d'autres essais soit effectués, cette fois-ci en utilisant une plus grande quantité d'Ac anti-TACI. Ceci afin d'espérer, après le succès des contrôles qualités, l'injecter et atteindre l'objectif de réussir à distinguer différents sous-types de LDGCB.

# Conclusion

Le radiomarquage d'un anticorps comporte différentes étapes critiques. Ainsi, grâce à l'application de différentes méthodes de synthèse et de contrôles, nous sommes parvenus à mettre au point un couplage entre un chélateur et un anticorps, puis un radiomarquage entre un anticorps chélaté et un isotope radioactif.

Dans la première partie, nous avons pu évaluer la faisabilité de ces deux étapes en utilisant le Rituximab, un anticorps à faible coût et facile à obtenir. Après synthèse du Rituximab radiomarqué, nous avons obtenu d'excellents résultats sur les contrôles qualités ainsi que sur l'imagerie nucléaire après injection chez la souris nude NU/NU. Forts de ces excellentes conclusions, nous avons reproduits cette synthèse avec un anticorps anti-TACI. Cet anti-TACI cible les récepteurs TACI, activant les voies de signalisations incluant le NF-κB, et qui donc peut nous permettre de détecter les LDGCB de sous-types ABC.

Les résultats des contrôles qualités sur l'anti-TACI ont permis d'affirmer qu'après couplage cet anticorps conserve son intégrité. Cependant, la quantité trop infime obtenue n'a pas permis d'effectuer un radiomarquage optimal. La pureté radiochimique très faible ne nous a donc pas permis de procéder aux autres contrôles qualités du radiomarquage. Les prochaines tentatives de radiomarquage devront être effectuées avec une plus grande quantité d'anticorps pour espérer injecter chez l'animal cet Ac anti-TACI radiomarqué.

Cependant, ce travail nous a permis de maitriser et de nous familiariser avec les techniques de couplage et de radiomarquage pour pouvoir, dans l'avenir, effectuer d'autres tentatives avec une quantité plus conséquente d'Ac anti-TACI.

L'administration de cet Ac pourrait permettre de distinguer les sous-types de LDGCB et d'orienter dans l'avenir la prise en charge, ainsi que les traitements fournis aux patients. En effet, les traitements usuels n'ont que peu d'influence sur la survie globale moyenne chez des patients atteints d'un LDGCB ABC.

Ce premier travail de collaboration étroite entre différents services du CRLCC Henri Becquerel et de l'Université Catholique de Louvain est le point de départ d'un plus grand projet. Projet qui pourrait permettre d'aboutir, pour les patients potentiels à la création d'un marqueur pronostique, à un test pour typage tumoral pour adapter la thérapeutique, voire même à un futur produit pour de la radioimmunothérapie.

# Bibliographie

[1] Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Medico-Chirurgical Transactions*, **1832**, 17:68-114.

[2]Virchow R. Weisses Blut. *Neue Notiz Gebiete Natur-und Heilkunde,* **1845**, 36:151-156.

[3] Sternberg C. Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Zeitschrift Fur Heilkunde*, **1898**, 19:21-90.

[4] Reed D. On the pathological changes in Hodgkin's disease, with especial reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hospital Reports*, **1902**, 10:133-196.

[5] Brill NE, Baehr G, Rosenthal N. Generalized giant lymph follicle hyperplasia of lymph nodes and spleen. A hitherto undescribed type. *The Journal of the American Medical Association*, **1925**, 84:668-671.

[6] Bruch JF, Duprez-Paumier R, Sizaret D, et al. Historical study of lymphomas and their classification*s*. *Revue Francophone des Laboratoires*, **2014**, Volume 2014 (458) :59-65.

[7] Lennert K, Mohri N, Stein H et al. The histopathology of malignant lymphoma. *British Journal of Haematology*, **1975**, 31:193-203.

[8] Stansfeld A, Diebold J, Kapanci Y, et al. Updated Kiel classification. *Lancet,* **1988**, 1:292-293.

[9] Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer,* **1974**, 34:1488-1503.

[10] National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer,* **1982**, 49:2112-2135.

[11] Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group. *Blood,* **1994**, 84:1361-1392.

[12] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Fourth edition, **2008**.

[13] Salles G. Les lymphomes malins, hodgkiniens et non hodgkiniens. **2011**.

[14] Monnereau A, Remontet L, Maynadié M, et al. Estimations nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. Septembre **2013**, Partie 2 – hémopathies malignes, 28-31.

[15] Ochmann M. Thèse : Lymphomes B inclassables avec des caractéristiques intermédiaires entre lelymphome B diffus à grandes cellules et le lymphome de Burkitt : Evaluation rétrospective des caractéristiques cliniques et impact de l'intensification thérapeutique. **2013**.

[16] Smith A, Roman E, Howell D et al. The Haematological Malignancy Research Network (HMRN): a new information strategy for population based epidemiology and health service research. *British Journal of Haematology*, March **2010**, 148:739-753.

[17] Barrans S, Crouch S, Smith A et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *Journal of Clinical Oncology,* **2010**, 28**:**3360-3365.

[18] Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature,* **2000**, 403:503-511.

[19] Rosenwald A, Wright G, Chan WC et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, **2002**, Vol. 346, No. 25.

[20] Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S et al. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, **2005**, 107:3052.

[21] Lenz G, Wright G, Dave SS et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *The New England Journal of Medicine,* **2008** Nov 27, 359:2313-2323.

[22] Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, **2004**, 103:275-282.

[23] Davis RE, Brown KD, Siebenlist U et al. Constitutive nuclear factor kappa B activity is required for survival of activated B Cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **2001**, 194:1861-1874.

[24] Siebenlist U, Franzoso G et Brown K. Structure, regulation and function of NF-kB. *Annual Review of Cell and Developmental Biology,* **1994**, 10:405-455.

[25] Karin M et Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-κB activity. *Annual Review of Immunology,* **2000**, 18:621-663.

[26] Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kB. *The Journal of Clinical Investigation*, **2001**, 107:241-246.

[27] Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences,* **2002**, 27:19-26.

[28] PASERO C, OLIVE D. Targeting TNF receptors in cancer therapy: toward a new role for LIGHT and HVEM. *Bulletin du Cancer*, **2008**, 95:691-700.

[29] Kaur, S, Venktaraman G, Jain M et al. Recent trends in antibody-based oncologic imaging. *Cancer Letters,* **2012**, 315:97-111.

[30] Driol C. Thèse de physique : Imagerie par rayonnement gamma diffusé à haute sensibilité. **2008**.

[31] Rahmim A et Zaidi H. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. *Nuclear Medicine Communications*, **2008**, 29:193-207.

[32] Guerreau D et Saccavini JC. Macromolécules d'intérêt biologique marquées à l'iode. Dans : Comet M, Vidal M. Radiopharmaceutiques-Chimie des radiotraceurs et applications biologiques. Presse Universitaire de Grenoble, **1998**, 350-64.

[33] Coenen HH, Mertens J et Maziere B. Electrophilic substitution dans : Radioiodination reactions for pharmaeuticals. *Springer*, **2006**, 45-62.

[34] Ardisson V, Mathieu JP, Ghezzi C et al. TEMP : les possibilités de marquage à l'iode 123 ou au technétium. *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, **2005**, vol.29 - n°4.

[35] Wilbur DS. Radiohalogenation of proteins: an overview of radionuclides, labeling methods, and reagents for conjugate labeling. *Bioconjugate Chemistry*, **1992**, 3:433-470.

[36] Eder M, Knackmuss S, Le Gall F et al. 68Ga-labelled recombinant antibody variants for immuno-PET imaging of solid tumours. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2010**, 37:1397-1407.

[37] Tamura K, Kurihara H, Yonemori K et al. 64Cu-DOTA-trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, **2013**, 54:1869-1875.

[38]Von Behring E et Kitasato S. Ueber das zustandekommen der Diphterie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Deutsch Medizinische Wochenschrift*, **1890**, 16:1113-1114.

[39]Porter RR. The formation of a specific inhibitor by hydrolysis of rabbit antiovalbumin. *Biochemical Journal*, **1950**, 46:479-484.

[40] Fagraeus A. Antibody production in relation to the development of plasma cells. *Acta Medica Scandinavica*, **1948**, volume 204.

[41] Eisen HN et Keston AS. The immunologic reactivity of bovine serum albumin labeled with trace-amounts of radioactive iodine (I- 131). *The Journal of Immunology,* **1950**, 63:71-80.

[42] Pressman D et Korngold L. The in vivo localization of anti-Wagner-osteogenic sarcoma antibodies. *Cancer*, **1953**, 6:619-623.

[43] Sussman R et Berson S. Immunological specificity of human insulin : Application to immunoassay of insulin. *The Journal of Clinical Investigation*, **1961**, 40:2190-2198.

[44] Kohler G et Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature,* **1975**, 256:495-497.

[45] Mach JP, Chatal JF, Lumbroso JD et al. Tumor localization in patients by radiolabeled monoclonal antibodies against colon carcinoma. *Cancer Research,* **1983**, 43:5593-5600.

[46] Goldenberg DM, DeLand F, Kim E et al. Use of Radio-Labeled Antibodies to Carcinoembryonic Antigen for the Detection and Localization of Diverse Cancers by External Photoscanning. *The New England Jounal of Medicine,* **1978**, 298:1384-1388.

[47] Kelloff GJ, Krohn KA, Larson SM et al. The progress and promise of molecular imaging probes in oncologic drug development. *Clinical Cancer Research*, **2005**, 11:7967-7985.

[48] Herrington-Symes AP, Farys M, Khalili H et al. Antibody fragments: Prolonging circulation half-life special issue-antibody research. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **2013**, Vol.4 No.5.

[49] Fedor Y. Nouveau biomarqueur en temps réel de cassures double-brin de l'ADN et génotoxicité de la Cytolethal Distending Toxin. *Thèse Biologie Cellulaire*, **2012**.

[50] Verel I, Visser GW et Van Dongen GA. The promise of immuno-PET in radioimmunotherapy. *Journal of Nuclear Medicine*, **2005**, 46:164S-171S.

[51] Börjesson PK, Jauw YW, De Bree R et al. Radiation dosimetry of $^{89}$Zr- labeled chimeric monoclonal antibody U36 as used for immuno-PET in head and neck cancer patients. *Journal of Nuclear Medicine,* **2009**, 50:1828-1836.

[52] Börjesson PKE, Jauw YWS, Boellaard R et al. Performance of immuno-positron emission tomography with zirconium-89-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in the detection of lymph node metastases in head and neck cancer patients. *Clinical Cancer Research,* **2006**, 12: 2133-2140.

[53] Verel I, Visser GW, Boellaard R et al. $^{89}$Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of $^{89}$Zr-labeled monoclonal antibodies. *Journal of Nuclear Medicine*, **2003**, 44(8):1271-1281.

[54] Knowles SM, Zettlitz KA, Tavaré R et al. Quantitative ImmunoPET of Prostate Cancer Xenografts with $^{89}$Zr- and $^{124}$I-Labeled Anti-PSCA A11 Minibody. *Journal of Nuclear Medicine*, **2014**, vol. 55 no. 3:452-459.

[55] Vosjan MJ, Perk LR, Rispens SI. $^{89}$Zr-Immuno-PET : Physical Properties, Production, Labeling and Applications of $^{89}$Zr. *Knowledgeatwork*, **2012**.

[56] Frey P, Townsend O, Jeavons A et al. In vivo imaging of the human thyroid with a positron camera using 1-124. *European Journal of Nuclear Medicine*, **1985**, 10: 472-476.

[57] Fischer G, Seibold U, Schirrmacher R et al. $^{89}$Zr, a Radiometal Nuclide with High Potential for Molecular Imaging with PET: Chemistry, Applications and Remaining Challenges. *Molecules,* **2013**, 18:6469-6490.

[58] Cyclotron.nl. Factsheet, iodine 124. http://www.cyclotron.nl/iodine-124__2_3_2.html. Consulté juin 2014.

[59] Holland JP, Sheh Y, Lewis JS. Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89. *Nuclear Medicine and Biology*, **2009**, 36: 729-739.

[60] O'Brien HA. Overview of radionuclides useful for radioimmunoimaging and radioimmunotherapy and current status of preparing radiolabelled antibodies. *Radioimmunoimaging and radioimmunotherapy*, **1983**, p.161.

[61] Knowles SM et Wu AM. Advances in Immuno–Positron Emission Tomography: Antibodies for Molecular Imaging in Oncology. *Journal of Clinical Oncology*, **2012**, 30:3884-3892.

[62] Dijkers EC, Oude Munnink TH, Kosterink JG et al. Biodistribution of $^{89}$Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **2010**, 87:586-592.

[63] Dijkers EC, Kosterink JG, Rademaker AP et al. Development and characterization of clinical grade $^{89}$Zr-trastuzumab for HER2/neu immunoPET imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, **2009**, 50:974-981.

[64] Perk LR, Visser GW, Vosjan MJ et al. $^{89}$Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals $^{90}$Y and $^{177}$Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *Journal of Nuclear Medicine*, **2005**, 46:1898-1906.

[65] Hehlgans T et Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, **2005**, 115:1–20.

[66] Gross JA, Johnston J, Mudri S et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature*, **2000**, 404:995–999.

[67] Kim SJ, Lee SJ, Choi IY et al. Serum BAFF predicts prognosis better than APRIL in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with Rituximab plus CHOP chemotherapy. *European Journal of Haematology,* **2008**, 81:177-184.

[68] Willems L et Bouscary D. Signal transduction: oncogenic signaling pathways for targeted therapies in cancer. Correspondances en Onco-Hematologie - Vol. VI - n° 4 - **2011**.

[69] Link JM, Krohn KA et Eary JF. $^{89}$Zr for antibody labeling and positron emission tomography. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **1986**, 23:1297-1298.

[70] Ali SA et Shankland EG. Radiochemical synthesis of $^{89}$Zr-porphyrin for positron label of monoclonal antibodies. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **1991**, 30:326.

[71] Meijs WE, Herscheid JDM, Haisma HJ et al. Evaluation of desferal as a bifunctional chelating agent for labeling antibodies with Zr-89. *Applied Radiation and Isotopes*, **1992**, 43:1443-1447.

[72] Meijs WE, Haisma HJ, Van Der Schors R et al. A facile method for the labeling of proteins with zirconium isotopes. *Nuclear Medicine and Biology*, **1996**, 23:439-448.

[73] Meijs WE, Haisma HJ, Klok RP et al. Zirconium-labeled monoclonal antibodies and their distribution in tumor-bearing nude mice. *Journal of Nuclear Medicine*, **1997**, 38:112-118.

[74] Perk LR, Vosjan MJ, Visser GW et al. 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*, **2010**, 37:250-259.

[75] Vosjan MJ, Perk LR,Visser GW et al. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate *p*-isothiocyanatobenzyldesferrioxamine. *Nature Protocols*, **2010**, Volume 5 n°4.

[76] Natarajan A, Habte F et Gambhir SS. Development of a Novel Long-Lived ImmunoPET Tracer for Monitoring Lymphoma Therap in a Humanized Transgenic Mouse Model. *Bioconjugate Chemistry*, **2012**, 23:1221-1229.

[77] MRC-Holland. RT-MLPA. protocol version MRP-v001. **2013**.

[78] Mary J. Quantification de protéines. www.labome.fr/method/Protein-Quantitation.html. Consulté le 04/08/2014.

[79] Renart J, Reiser J et Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1979**, 76:3116–3120.

[80] Racaniello V. Virology toolbox: the western blot. www.virology.ws/2010/07/07/virology-toolbox-the-western-blot/. Consulté le 04/08/2014

[81] Lindmo T, Boven E, Cuttitta F et al. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *Journal of Immunological Methods*, **1984**, 72:77-89.

[82] Muylle K. Immuno-PET imaging with 89Zr-rituximab in CD20+ B-cell lymphoma. Jules Bordet Cancer Institute. http://eitti.free.fr/2011/Sept26.18.00.Muylle.ImmunoPET.pdf. Consulté le 13/10/2014.

# SERMENT DE GALIEN

Je jure 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 et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

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

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

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.

Nom-Prénom de l'étudiant : ……....

Nom du Président de Jury : ……..

Date de soutenance de la thèse : ……...

Mention : ……....

VU, le Président de Jury,

VU, le Directeur de la Section Pharmacie
de l'U.F.R. Médecine-Pharmacie de Rouen,