



HAL
open science

Les nanobodies, nouvelle génération de médicament radiopharmaceutique en oncologie ?

Abdenmour Benloucif

► **To cite this version:**

Abdenmour Benloucif. Les nanobodies, nouvelle génération de médicament radiopharmaceutique en oncologie ?. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-03808681

HAL Id: dumas-03808681

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03808681v1>

Submitted on 10 Oct 2022

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu le 3 octobre 2022

Par M. Benloucif Abdennour
Né(e) le 31 mars 1992 à Skikda

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 04 octobre 1988
tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE : Les nanobodies, nouvelle génération de médicament radiopharmaceutique en
oncologie ?

----oOo----

JURY :

Président : Pr. Benjamin GUILLET

Membres : Dr. Bertrand POURROY

Dr. Sophie LANCELOT

Dr, Joanie DEL BANO

Dr. Philippe GARRIGUE (Directeur de thèse)

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 boulevard Jean Moulin – CS 30064 - 13385
Marseille cedex 05 – France - Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, Mme Alexandrine BERTAUD, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, M. Philippe GARRIGUE, M. Guillaume HACHE, M. Thierry TERME
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Philippe CHARPIOT, M. Riad ELIAS
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Chloé SIMON
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC M. François DEVRED
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pierre REBOUILLON M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE	M. Jérémy MAGALON Mme Carole SIANI Mme Muriel MASI

ENSEIGNANT CDI

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN
---------	-----------------------

A.H.U.

PHARMACOTECHNIE	Mme Mélanie VELIER
-----------------	--------------------

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN Mme Sandra GHAYAD
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Amandine BONIFAY
----------------------------	----------------------

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

PRATIQUE OFFICINALE	Mme Emmanuelle TONNEAU-PFUG
---------------------	-----------------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL M. Quentin ALBERT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER M. Mathieu CERINO
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC M. Pascal PRINDERRE
CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN M. Elnur GARAYEV

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ETHIQUE	Mme Laurie PAHUS
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA
DISPOSITIFS MEDICAUX	Mme Valerie MINETTI-GUIDONI

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE M. Joseph CICCOLINI
TOXICOLOGIE GENERALE	Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD Mme Marie-Anne ESTEVE
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA Mme Anne RODALLEC M. Nicolas FABRESSE
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Pierre-Henri VILLARD

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	Mme Anaïs MOYON M. Vincent NAIL
-----------------------------	------------------------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 13 décembre 2021



LE DOYEN
F. DIGNAT-GEORGE

Remerciements

Je souhaite remercier Mr Garrigue Philippe pour son retour et d'avoir accepté d'encadrer ce travail en tant que directeur de thèse. Je remercie également Mr Guillet Benjamin d'avoir accepté la présidence du jury. Je remercie Mme Del Bano Joanie, Mr Pourroy Bertrand et Mme Lancelot Sophie, pour votre disponibilité et pour avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie toute l'équipe anticorps thérapeutique et immunociblage de m'avoir si bien accueilli durant ces années de recherche et pour ces bons moments passés au laboratoire.

Je remercie tous mes amis que j'ai pu connaître durant mon cursus à la faculté de pharmacie de Marseille avec qui nous avons pu partager des très bons moments qui resteront gravés en ma mémoire.

Pour finir je souhaite remercier ma famille sans qui je n'aurais certainement pas pu réussir ce parcours et arriver là où je suis aujourd'hui.

Merci à tous.

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Résumé

Les nanobodies sont des anticorps à domaine unique d'environ 15Kda capables de reconnaître des antigènes de façon spécifique avec une affinité comparable au anticorps monoclonaux. Ils sont très modulables et sont utilisable dans de nombreuses applications thérapeutiques. En médecine nucléaire, notamment en oncologie, leurs excellentes diffusion intratumorale les rends particulièrement intéressant pour des applications en tant qu'agent d'imagerie en scintigraphie mais aussi en tant qu'agent de radiothérapie interne vectorisée. D'autant plus que de nombreux moyen existe et permettent un radiomarquage aisée des nanobodies. En cancérologie, en médecine nucléaire, on observe de plus en plus de nanobodies en essais cliniques et préclinique que ce soit pour le diagnostic ou la thérapeutique. Leur nombre toujours de plus en plus important les présentes comme une nouvelle génération de médicament radiopharmaceutique en oncologie.

Mots clés : Nanobody, nanobodies, médecine nucléaire, cancérologie, oncologie, scintigraphie, radiothérapie interne vectorisée.

Table des matières

Table des matières	12
Table des illustrations	13
Liste des tableaux	15
I. Introduction	16
I.1 Généralités et histoire de la médecine nucléaire	16
I.1.1 Définition	16
I.1.2 Découverte de la radioactivité.....	16
I.1.2.1 La radioactivité.....	16
I.1.3 Les premières utilisations des radiotraceurs.....	18
I.1.4 Les premières utilisations de la radiothérapie en cancérologie.....	18
I.2 Le diagnostic du cancer en médecine nucléaire	19
I.3 Les radionucléides utilisés en médecine nucléaire	22
I.4 Les stratégies thérapeutiques en médecine nucléaire en oncologie	22
I.4.2 La radiothérapie interne	23
I.4.3 La radiothérapie interne vectorisée (RIV).....	24
I.4.3.1 Exemples des nouveaux radiopharmaceutiques.....	27
II. Les nanobodies, nouvelle génération de médicaments radiopharmaceutiques ?	34
II.1 Histoire et découverte	34
II.2 Génération des nanobodies	36
II.3 Caractéristiques des nanobodies	38
II.3.1 Structure des nanobodies	38
II.3.2 Paramètre physico-chimique des nanobodies	38
II.3.3 Interaction antigène/anticorps des nanobodies	39
II.3.4 La pharmacocinétique des nanobodies	40
II.4 Fonctionnalisation des nanobodies	41
II.4.1 Le radiomarquage des nanobodies.....	41
II.4.3 Rappel sur les réactions de complexation.....	49
II.5 Les méthodes de couplage des groupements fonctionnels aux nanobodies	52
II.5.1 Conjugaison par voie enzymatique.....	52
II.5.2 Les couplages chimio-enzymatiques	54
II.5.3 Conjugaison par voie chimique	55
II.6 Les nanobodies radiopharmaceutique idéal pour la médecine nucléaire	57
II.6.1 Les nanobodies agent de diagnostic via TEP/TEMP en cancérologie.....	57

II.6.1.2 Exemple de nanobodies en développement	59
II.7 Les nanobodies en radio immunothérapie	65
III. Discussion et conclusions.....	67
Références Bibliographiques.....	74
Serment de Galien	80

Table des illustrations

Figure 1 : Le pouvoir de pénétration des rayonnements	18
Figure 2 : Principe de fonctionnement d'une gamma caméra	20
Figure 3 : Principe de fonctionnement de la TEMP	21
Figure 4 : Principe de fonctionnement de la TEP	21
Figure 5 : Croissance des revenus dans le champ de la radiothéranostique.....	26
Figure 6 : Procédure de radiomarquage de l'édotréotide au ⁶⁸ Ga (SOMAKIT TOC).....	28
Figure 7 : Etude comparée du SOMAKIT TOC® et du ⁶⁴ Cu-DOTATATE pour la localisation de tumeurs neuroendocriniennes via TEP.....	29
Figure 8 : Résultats de l'essai de phase 3 du LUTATHERA chez des patients atteints de TNE...30	
Figure 9 : Traitement d'un patient atteint de cancer de la cellule de Merkel métastasé par une approche théranostique utilisant le ⁶⁸ Ga-DOTATE pour le diagnostic et la localisation des lésions cancéreuses suivi de l'utilisation du LUTATHERA pour la RIV.....	31
Figure 10 : Approche radiothéranostique utilisant ciblant le PSMA dans le cancer de la prostate par le couple ⁶⁸ Ga-PSMA11/ ¹⁷⁷ Lu-PSMA617.....	33
Figure 11 : Scintigraphie TEP/CT au ⁶⁸ Ga-PSMA-11 du patient 2.....	34
Figure 12 : Représentation des différents types d'anticorps, du nanobody et leurs potentielles mode d'utilisation.....	36
Figure 13 : Processus de génération des nanobodies	38
Figure 14 : Comparaisons des avantages et des inconvénients des nanobodies comme agents de radiothérapie.....	40
Figure 15 : Les différentes méthodes de radiomarquage des nanobodies.....	41
Figure 16 : Exemple de molécules permettant le radiomarquage indirect de radioélément de la famille des halogènes	42

Figure 17 : Structure chimique des chélateurs permettant la chélation du gallium 68.	44
Figure 18 : Structures chimiques des chélateurs utilisés pour la chélation de l'indium	45
Figure 19 : Structures des chélateurs utilisés avec l'yttrium	46
Figure 20 : Structures chimiques des chélateurs utilisés avec le lutétium	47
Figure 21 : Structures chimiques des chélateurs dérivés NETA utilisables avec cuivre	47
Figure 22 : Structures des dérivés ATSM utilisables avec le cuivre.....	48
Figure 23 : Structures des dérivés TETA utilisables avec le cuivre.....	48
Figure 24 : Structures dérivés DiAmSar utilisables avec le cuivre	49
Figure 25 : Schéma représentatif d'un complexe métal ligand.....	50
Figure 26 : Graphique $pK_c=f(pH)$	52
Figure 27 : Conjugaison site spécifique d'une sonde sur un nanobody via une transglutaminase.	53
Figure 28 : Conjugaison site spécifique d'un nanobody via la sortase A.	53
Figure 29 : Conjugaison site spécifique d'un nanobody par la LpIA	54
Figure 30 : Conjugaison site spécifique via la tubuline tyrosine ligase.	55
Figure 31 : Marquage de nanobody par voie chimique via conjugaison au niveau des lysines.....	56
Figure 32 : Attachement d'une sonde sur un nanobody de façon cystéine sélective.	56
Figure 33 : Essais in-vivo du ^{99m}Tc -7C12 pour le diagnostic de tumeur EGFR positive via TEMP	60
Figure 34 : Fixation tumorale du ^{68}Ga -Her2-Nanobody chez des patientes atteintes de cancer du sein	61
Figure 35 : Captage du ^{68}Ga -Her2-Nanobody dans les lésions métastasiées.....	62
Figure 36 : Biodistribution du ^{99m}Tc -NM-02 chez des patients atteints de cancer du sein via TEMP.	63
Figure 37 : Étude de l'expression de PDL-1 via le nanobody ^{99m}Tc -NM-01 chez un patient atteint d'un cancer du poumon	64
Figure 38 : Diagnostic et cartographie des métastases osseuses exprimant PDL1 via le ^{99m}Tc -NM-01	64
Figure 39 : RIT via le ^{177}Lu -2Rs15d	65
Figure 40 : Efficacité thérapeutique de ^{177}Lu -DTPA-sdAb 9079 chez des souris porteuses de tumeurs CD20pos	67

Figure 41 : L'utilisation des nanobodies dans le développement de stratégies thérapeutiques en oncologie71

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes particules de radiation émises17

Tableau 2 : Liste non exhaustive des radionucléides habituellement utilisés en imagerie diagnostique nucléaire.....22

Tableau 3 : Liste non exhaustive des radioéléments utilisés pour la radiothérapie.22

Tableau 4: Couple radiothéranostique validée en oncologie en 2022.....27

Tableau 5 : Nanobodies en développement clinique et préclinique en imagerie TEP/TEMP en cancérologie59

I. Introduction

I.1 Généralités et histoire de la médecine nucléaire

I.1.1 Définition

La médecine nucléaire nécessite de recourir à des médicaments ou des dispositifs médicaux radiopharmaceutiques, à des fins de diagnostic ou de thérapie, dans le cadre de soins courants ou de recherches impliquant la personne humaine (1,2).

I.1.2 Découverte de la radioactivité

En 1895, Röntgen découvre les rayons X. Il observe alors que les cristaux de cyanure de baryum platines peuvent rester fluorescents, même après avoir été placés à distance d'un tube à décharge électrique entièrement recouvert. C'est également lui qui prendra la première et célèbre image utilisant les rayons X, la photo de la main et de l'anneau. Dans cette photo, on voit des tissus mous, des os et l'anneau de son épouse (3). C'est un an plus tard, en 1896, que la radioactivité fut découverte par Henri Becquerel. Inspiré par les recherches de Roentgen, il pensa que les résultats de ce-dernier étaient dus à un phénomène de phosphorescence. Pour cela, il déposa des sels d'uranium sur une plaque photographique qu'il exposa au soleil en espérant que de la phosphorescence puisse y laisser une marque. Les résultats semblaient en accord avec sa théorie, jusqu'au jour où en l'absence de soleil, il mit directement les sels d'uranium et la plaque dans un tiroir obscur. À sa grande surprise, les résultats furent positifs, la marque laissée sur la plaque photographique n'était pas liée à la phosphorescence, mais elle était due à la radioactivité des sels d'uranium. Ces résultats furent communiqués lors de la réunion hebdomadaire de l'Académie Française des sciences à Paris le 2 mars 1896. Son article a été publié dans les « *Comptes Rendus* » les 10 jours suivants (4).

I.1.2.1 La radioactivité

La radioactivité est un phénomène physique naturel qui correspond à la désintégration spontanée de noyaux atomiques instables. Durant ce phénomène, la transformation de l'atome père en un nouvelle atome fils peut se faire selon différents types de désintégration, en fonction des caractéristiques de l'atome père. Sont notamment possible, les désintégrations α correspondant à

l'émission d'un noyau d'hélium, les désintégration β^- correspondant à l'éjection d'une particule négative un négatron, ainsi que les désintégration β^+ correspondant à l'éjection d'un positon. On retrouve durant ce phénomène, l'émission de rayonnements électromagnétiques comme les photons gamma, issus du passage du noyau fils généralement obtenu dans un état excité vers un niveau d'énergie stable. Au cours de cette désintégration, il peut aussi arriver un réarrangement électronique pouvant entraîner l'émission d'un rayon X. L'énergie émise durant la désintégration et le pouvoir pénétrant de ces rayonnements sont différents selon la nature de la désintégration et diffèrent selon l'atome.

Radiation	Masse	Charge	Energie	Longueur de pénétration	
				Air	Solid
Alpha (α)	4.00 u	2	4–10 MeV	5–10 cm	25–80 μm
Negatron (β^-)	5.48×10^{-4} u; 0.51 MeV	-1	0–4 MeV	0–10 m	0–1 cm
Positron (β^+)	5.48×10^{-4} u; 0.51 MeV	1	0–4 MeV	0–10 m	0–1 cm
Neutron	1.00866 u; 939.565 MeV	0	0–15 MeV	b	b
X ray	–	0	5 keV–100 keV	b	b
Gamma (γ)	–	0	10 keV–3 MeV	b	b

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes particules de radiation émises (5)

La masse au repos (en unité de masse atomique, u) a un équivalent énergétique en MeV (ev : électron volt) qui est obtenu à l'aide de l'équation $E=mc^2$, où $1 u = 932 \text{ MeV}$.

b Les longueurs de parcours ne s'appliquent pas aux rayons X et gamma puisque leurs intensités diminuent de façon exponentielle ; les longueurs de parcours dans les tissus solides sont variables, selon l'énergie des particules, la densité électronique du matériau et d'autres facteurs.
u = unité de masse atomique ; MeV = mégaélectronvolts.

Le pouvoir de pénétration des différents rayonnements

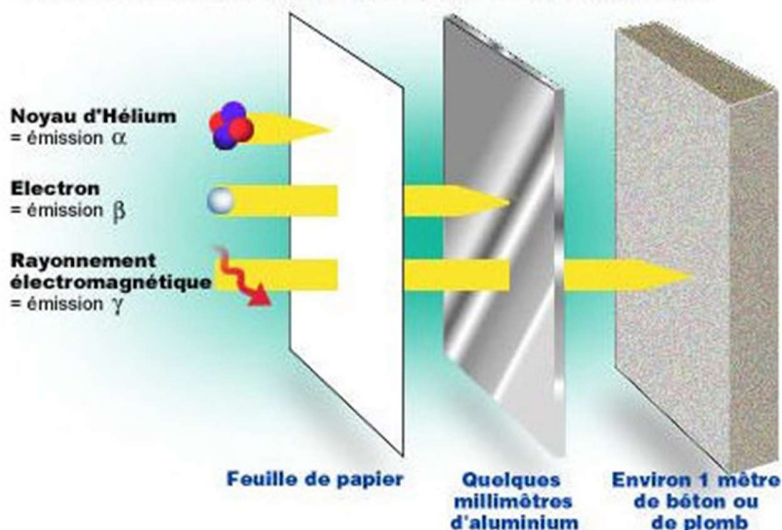


Figure 1 : Le pouvoir de pénétration des rayonnements (6)

I.1.3 Les premières utilisations des radiotraceurs

Les premières expérimentations utilisant des radiotraceurs ont été réalisées dans le domaine de la gastronomie par George de Hevesy. Il soupçonnait sa logeuse de recycler les tourtes à la viande du dimanche au repas de la semaine. Pour confirmer sa théorie, il a déposé du ^{212}Pb dans une tourte fraîchement préparée pour en mesurer la radioactivité le mercredi suivant. Ses résultats justifiaient sa méfiance. George de Hevesy fut aussi à l'initiative de la première administration de radiotraceurs chez l'homme. Après avoir démontré l'innocuité du phosphore 32 chez le rat pour en étudier sa biodistribution, il a administré chez l'homme quelques mCi par le biais de la nourriture. Les selles et les urines ont été prélevées et la radioactivité fut mesurée pendant 6 jours (7). Hermann Blumgart a utilisé en 1926 du Radium C pour évaluer la vitesse du flux sanguin (8). Hamilton et ses associés, eux, mettent en évidence l'accumulation d'iode radioactif dans des cancers de la thyroïde dès 1940 (9). Puis en 1942 Keston, Ball, Frantz et Palmer mettent en exergue la présence d'iode radioactif localisée spécifiquement dans les métastases de cancer thyroïdien (10). Grey et Stirling ont utilisé du chrome 51 pour marquer des globules rouges in-vitro (11) en 1950.

I.1.4 Les premières utilisations de la radiothérapie en cancérologie

Dès la découverte de la radioactivité, Henri Becquerel observe à ses dépens que celle-ci peut provoquer des lésions tissulaires assez sérieuses. Pendant les années 1930-1940, de nombreux radionucléides sont expérimentés en oncologie avec plus ou moins de réussite. En 1938, John Lawrence utilise du ^{32}P pour tenter de traiter un jeune patient de 29 ans atteint d'une leucémie myéloïde chronique (12). Il observe alors une diminution des leucocytes à un niveau normal.

Quelques années plus tard en 1949, au sein du *Royal Marsden Hospital* de Londres, le premier patient britannique atteint d'un cancer de la thyroïde sera traité avec l'iode radioactif (13). Il s'agissait, en fait, d'une femme de 20 ans dont le traitement fut un véritable succès. En effet, elle ne décèdera qu'en 1999 après avoir pu devenir grand-mère. Un autre radioélément sera également utilisé durant cette période, le strontium-89. Charles Pecher en a administré pour la première fois

à un patient atteint d'un cancer osseux. Les résultats, prometteurs, ont permis l'amélioration de l'état de santé général du patient ainsi qu'un soulagement des douleurs associées à sa maladie (14).

I.2 Le diagnostic du cancer en médecine nucléaire

Le diagnostic du cancer en médecine nucléaire se fait essentiellement par l'imagerie scintigraphique avec notamment la TEMP (tomographie par émission monophotonique) et la TEP (tomographie par émission de positons). Ces technologies reposent sur la détection des rayonnements gammas émis par les radionucléides administrés au patient. L'un des principaux avantages de la scintigraphie est que cette méthode permet d'évaluer et d'étudier les fonctions métaboliques, biochimiques et biologiques des différents organes. Par exemple, une scintigraphie osseuse permet d'évaluer l'état du renouvellement osseux alors qu'une radiographie nous apportera uniquement des informations sur l'état anatomique du squelette (15). Cette technologie a pu voir le jour grâce à une invention majeure qui est celle de la gamma caméra.

I.2.1 La gamma caméra

C'est à l'université de Berkeley en Californie que la première gamma caméra a été mise au point vers la fin des années 50 (16). La gamma caméra est composée d'un collimateur, d'un cristal scintillateur généralement composé de sels d'iodure, d'un réseau de photomultiplicateurs et d'un système électronique de détection et d'orientation. Lorsqu'elle est en fonctionnement, les rayons capables de traverser le collimateur doivent frapper un cristal scintillateur. Le cristal scintillateur va alors scintiller et émettre des photons qui vont à leurs tours rencontrer des photomultiplicateurs. Les photons ainsi amplifiés vont générer un signal qui sera interprété avec l'aide d'outils informatiques (figure 2).

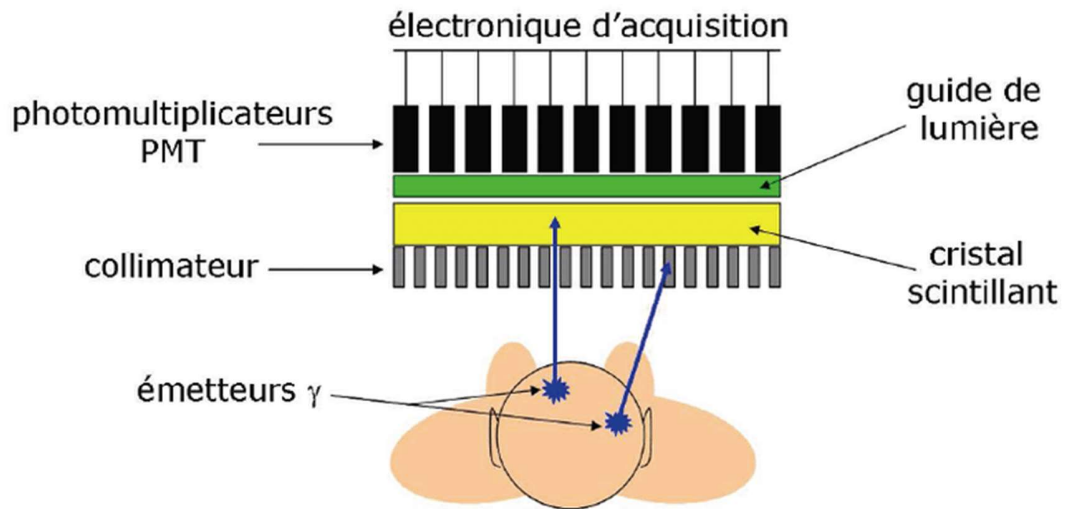


Figure 2 : Principe de fonctionnement d'une gamma caméra(17)

I.2.3 La TEMP

Tomographie par emission monophotonique (SPECT)

Le traceur radioactif émet naturellement des photons gamma qui sont «captés» par la caméra.

Injection d'un traceur radioactif

Technétium (^{99m}Tc)

Gamma caméra

Mouvement lent de rotation de la caméra

Détecteurs

Collimateur

Le détecteur est constitué d'un cristal de iodure de sodium (NaI) avec des impuretés de thallium (Tl). Il va transformer les photons gamma en photons lumineux. Ils sont ensuite convertis en courant électrique grâce à des photomultiplicateurs.

Figure 3 : Principe de fonctionnement de la TEMP (18)

La TEMP est une technique ancienne développée au cours des années 1960 sous la direction de Kuhl et Edwards (19). La TEMP se base sur la détection de rayonnements γ directement émis par un atome radioactif injecté dans le corps du patient. Le rayonnement est détecté par une gamma caméra qui tourne autour du patient permettant la localisation précise du lieu où se trouve la source radioactive (figure 3).

I.2.4 La TEP

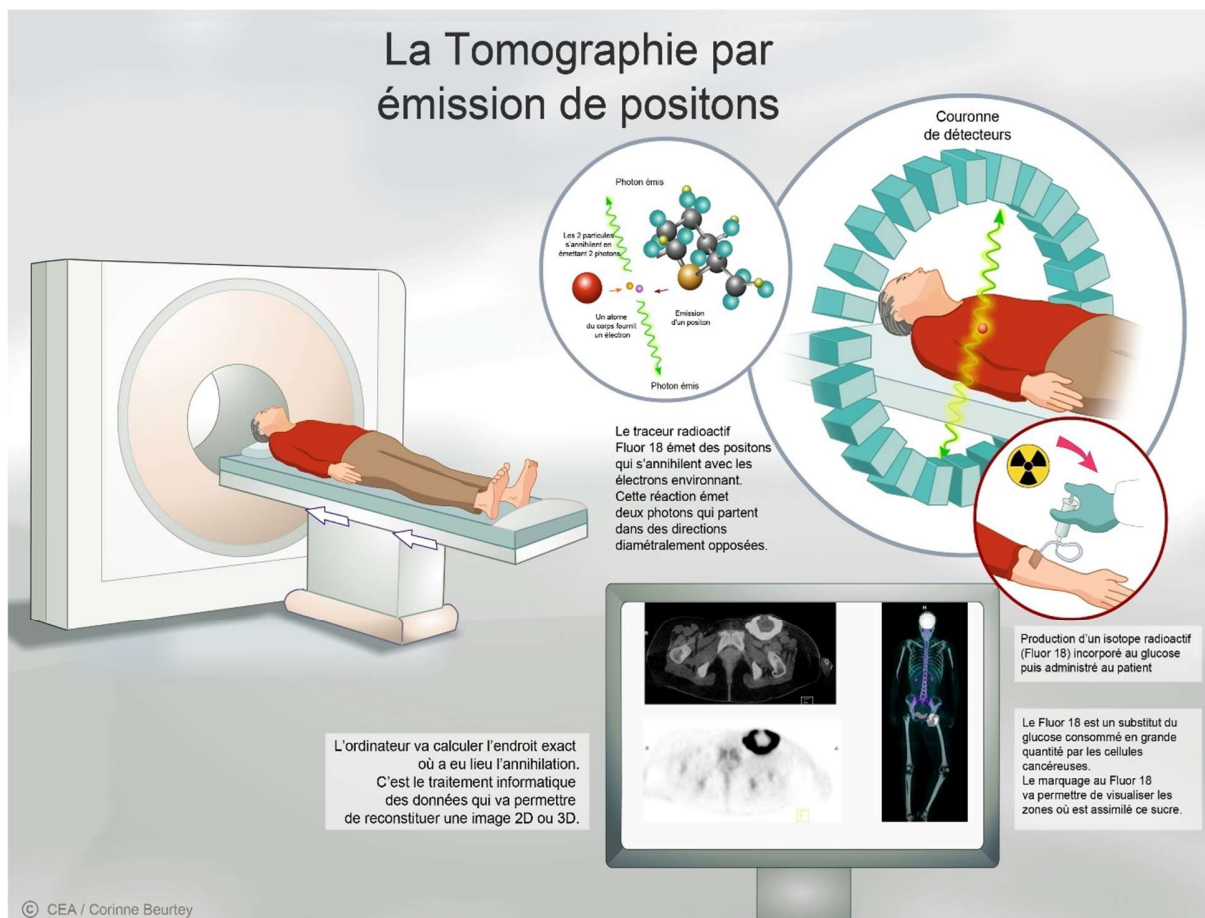


Figure 4 : Principe de fonctionnement de la TEP(18)

C'est vers la fin des années 60 que la première vraie caméra TEP fut construite au *Massachusetts General Hospital* (20). À l'inverse de la TEMP, en TEP, des émetteurs β^+ sont utilisés et les 2 photons gamma obtenus après l'annihilation d'une particule β^+ avec un électron de charge opposée sont détectés. Les photons gamma émis sont de même énergie 511 keV et sont émis à 180° l'un de l'autre. Par sa conception, la TEP ne fonctionne donc exclusivement qu'avec des

radionucléides émetteurs β^+ (Tableau 1). Les rayonnements sont détectés par des détecteurs gammas placés à 360° autour du patient (figure 4).

I.3 Les radionucléides utilisés en médecine nucléaire

Radionucléide	Période (h)	Emission	Application
^{18}F	1.83	β^+	TEP
^{64}Cu	12.7	β^+	TEP
^{68}Ga	1.13	β^+	TEP
^{89}Zr	78.4	β^+	TEP
^{11}C	0.34	β^+	TEP
^{99m}Tc	6	γ	TEMP
^{111}In	67.3	γ	TEMP
^{123}I	13.3	γ	TEMP
^{201}Tl	72.9	γ	TEMP

Tableau 2 : Liste non exhaustive des radionucléides habituellement utilisés en imagerie diagnostique nucléaire.

Radionucléide	Emission	Période
^{90}Y	β^-	64.1 heures
^{131}I	β^-	8.0 jours
^{153}Sm	β^-	46.5 heures
^{177}Lu	β^-	6.6 jours
^{211}At	α	7.2 heures
^{223}Ra	α	11.4 jours
^{225}Ac	α	10.0 jours
^{227}Th	α	18.7 jours

Tableau 3 : Liste non exhaustive des radioéléments utilisés pour la radiothérapie.

On note également ces dernières années un développement très importants de l'utilisation des radionucléide α en cancérologie.

I.4 Les stratégies thérapeutiques en médecine nucléaire en oncologie

I.4.1 Mécanisme d'action des rayonnements radioactifs

Les cellules cancéreuses sont détruites par des radiations dites ionisantes. Ce type de radiation va entraîner une ionisation et un dépôt d'énergie dans les cellules et tissus traversés. Les radiations de haute énergie entraînent des dommages sérieux au niveau de l'ADN, ce qui va provoquer la mort des cellules cancéreuses par apoptose ou nécrose. Les cellules normales ont un système de réparation de l'ADN plus performant que les cellules cancéreuses et peuvent plus facilement et rapidement réparer des dommages au niveau de l'ADN. Étant donné qu'il existe un lien entre la radio sensibilité et le cycle cellulaire, les cellules en mitose sont plus sensibles aux radiations que les cellules dans les autres phases du cycle. Cela suppose que les cellules cancéreuses sont plus sensibles aux rayonnements.

En plus des effets directs des rayonnements sur l'ADN, l'action des radiopharmaceutiques peut être amplifiée par divers mécanismes indirects. On peut retrouver ce qu'on appelle un effet « bystander » qui correspond à l'atteinte des cellules tumorales voisines malgré qu'elle n'ait pas été touchée par les radiations. Ce mécanisme se fait sans doute par des effets paracrines. On peut aussi observer un effet « abscopal » (à distance) qui correspond à des effets immunologiques radio-induits pouvant être associée à une augmentation de l'efficacité de l'immunothérapie.

I.4.2 La radiothérapie interne

La radiothérapie interne ou curiethérapie consiste à irradier une tumeur par mise en contact directement avec la source radioactive. Cette approche permet une administration précise dans la tumeur tout en limitant au maximum le risque d'irradiation des tissus sains avoisinants. Il existe différentes curiéthérapies classées selon la position du radioélément par rapport à la tumeur (22).

- La curiethérapie interstitielle : Dans ce cas, les sources radioactives sont placées directement à l'intérieur de la tumeur. Cette technique peut être utilisée pour le traitement du cancer de la langue, du sein ou de la prostate.
- La plésiocuriethérapie : Dans ce cas, les sources radioactives sont placées directement sur le tissu à irradier. Les cavités naturelles de l'organisme sont utilisées pour déposer le matériel radioactif à l'intérieur. Dans la plésiocuriethérapie, il est possible de distinguer deux sous types supplémentaires : la curiethérapie endocavitaire, notamment utilisée dans le cadre du traitement du cancer utérovaginal et la curiethérapie endoluminale utilisée dans le cadre du traitement des cancers bronchiques ou œsophagiens.

En curiethérapie, 4 modalités de traitement existent selon le type de débit de dose utilisée (22) :

- La curiethérapie à haut débit de dose (HDR) avec un traitement qui dure quelques minutes et qui est répété entre 2 et 10 fois. Ce traitement peut être répété plusieurs fois dans la semaine. De façon générale, ce traitement ne nécessite pas d'hospitalisation.
- La curiethérapie à bas débit de dose (LDR), dans ce cas les sources radioactives sont laissées en place de façon continue pendant plusieurs jours, en revanche ce traitement nécessite une hospitalisation de quelques jours.
- La curiethérapie pulsée consiste à utiliser une source radioactive de petite taille qui se déplace à l'intérieur des tissus à irradier. Chaque pulse peut durer entre 5 et 45 minutes, un pulse est délivré toutes les heures, 24h. sur 24.
- Pour finir, il peut arriver que l'élément radioactif soit déposé dans l'organisme et ne soit jamais retiré comme pour le cancer de la prostate ou l'iode 125 peut ne jamais être retirée.

I.4.3 La radiothérapie interne vectorisée (RIV)

Cette technique consiste à administrer l'irradiation via un médicament radiopharmaceutique par voie générale. Le radiopharmaceutique est composé d'un radioélément qui est couplé à un vecteur (peptide, anticorps ou nanobody) permettant le ciblage spécifique de la tumeur. Il s'agira d'un peptidothérapie (PDT) si le radioélément est couplé avec un peptide ou de radioimmunothérapie (RIT) en cas de couplage avec un anticorps/nanobody. Les premiers médicaments radiopharmaceutiques en RIV sont apparus au début des années 2000 avec les deux premiers anticorps monoclonaux radioconjugués indiqués en oncologie. Le Zevalin[®] couplé à l'⁹⁰Y de Biogenidec approuvé par la FDA en 2002 et ayant eu une AMM en 2004 dans le traitement du lymphome non hodgkinien et le Bexxar[®] couplé à l'¹³¹I de GSK ayant été approuvé par la FDA en 2003 dans le traitement de lymphome non hodgkinien (23). Malgré leur caractère innovant, leur mise sur le marché fut un échec commercial. Le Bexxar a été retiré du marché par GSK et les ventes du Zevalin[®] ont périclité. Pourquoi cet échec ? Une des raisons évoquées, en plus de l'accumulation non spécifique parfois retrouvée, était la nécessité de conduire les traitements dans des centres de médecines nucléaires, rendant leurs utilisations en clinique plus compliquée pour les hématologues. Une autre raison concernant le Zevalin[®] peut justifier sa mise à l'écart, c'est son ASMR

(amélioration du service médicale rendu) jugée seulement modérée par l'ANSM (24). Cela a certainement conduit les soignants à privilégier d'autres options thérapeutiques non radioactives et moins contraignantes. Il est important de comprendre les réelles causes de cet échec afin de ne pas les reproduire avec les nanobodies.

Aujourd'hui, comme le montre la figure 5, la médecine nucléaire en oncologie semble connaître un véritable « boom » ces dernières années. On observe une forte croissance du secteur avec un doublement des revenus générés de 2013 à 2022 et avec des prévisions de forte croissance prévus pour les années qui viennent. Alors que les revenus semblaient essentiellement provenir de l'imagerie par scintigraphique avec le ^{99m}Tc et la TEP qui représentait au moins 80% des revenus en 2020. Les données prévoient que c'est à partir de la radiothéranostique que seront issus la majorité des revenus du secteur en 2025. La radiothéranostique décrit la combinaison de diagnostic et de thérapeutique, elle repose sur l'utilisation d'un même agent pour réaliser le diagnostic précis avec une cartographie de la tumeur par TEP/TEMP et la thérapeutique notamment par RIV.

On constate concrètement sur le terrain la traduction de la croissance de ce secteur par l'émergence de nouveaux radiopharmaceutiques destinés au radiodiagnostic et à la RIV en oncologie ayant obtenu des autorisations de mise sur le marché.

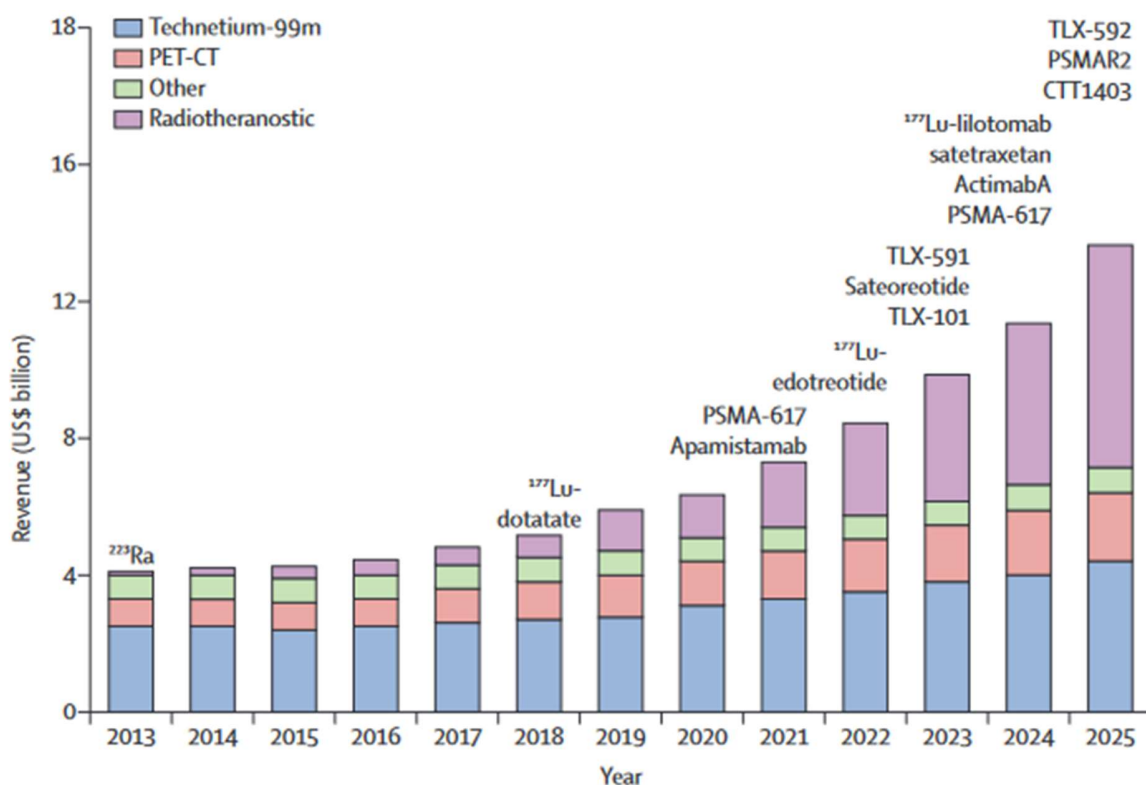


Figure 5 : Croissance des revenus dans le champ de la radiothérapie (25)

Dans le tableau suivant nous avons là une liste des couples radiothérapeutiques actuellement validés pour une utilisation en radiothérapie en oncologie.

Agent thérapeutiques	Approbation/ATU (FDA, EMA)	Compagnon diagnostiques	Indication
[¹³¹ I]sodium iodide	1971a,118	[¹³¹ I]sodium iodide	Traitement de certains cancers de la thyroïde
¹⁵³ Sm-EDTMP	1997, 1998	^{99m} Tc-bisphosphonates, incluant ^{99m} Tc-medronate; ^{99m} Tc-oxidronate; ^{99m} Tc-pyrophosphate	Palliation des douleurs osseuses chez les patients présentant des métastases squelettiques douloureuses multiples.
⁹⁰ Y-ibritumomab tiuxetan ^b	2002, 2004	¹¹¹ In-ibritumomab	LNH à cellules B de bas grade ou folliculaires R/R ; patients non traités antérieurement atteints de LNH folliculaire qui obtiennent une réponse partielle ou complète à la chimiothérapie de première ligne.

¹³¹ I- tositumomab ^c	2003, 2003	¹³¹ I-tositumomab	LNH de bas grade, folliculaire ou transformé CD20+ après progression de la maladie pendant ou après le rituximab.
¹³¹ I- iobenguane (or MIBG)	2018a,157	¹²³ I-iobenguane	Phéochromocytomes ou paragangliomes positifs à la noradrénaline
²²³ Ra- dichloride	2013, 2013	–	CPRC avec métastases osseuses symptomatiques et aucune métastase viscérale connue.
¹⁷⁷ Lu- DOTATATE	2018, 2017	⁶⁸ Ga-DOTATATE (USA); ⁶⁴ Cu-DOTATATE (USA); ⁶⁸ Ga-DOTATOC (EU)	Tumeurs neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques positives pour les récepteurs de la somatostatine.
¹⁷⁷ Lu-PSMA- 617	2022,	⁶⁸ Ga-PSMA-11, FDA approved in 2021 and 2022	Traitement du cancer prostatique résistant à la chimiothérapie métastatique après progression de la maladie sous inhibiteurs de l'AR et chimiothérapie à base de taxanes.

Tableau 4: Couple radiothéranostique validée en oncologie en 2022

I.4.3.1 Exemples des nouveaux radiopharmaceutiques

I.4.3.1.1 Le SOMAKIT TOC[®] et le couple radiothéranostique DOTATATE/LUTATHERA

Le SOMAKIT TOC[®] (édotrétotide + ⁶⁸Ga) est un médicament développé par le laboratoire AAA (*advance accelerator application*). Il a obtenu son autorisation de mise sur le marché en France en 2016 et une approbation de la FDA aux USA en 2019, dans l'indication du diagnostic et de la localisation des tumeurs neuroendocriniennes (TNE).

Dans ce médicament le peptide l'édotrétotide possède une spécificité pour le récepteur à la somatostatine surexprimée dans des tumeurs neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques (TNE GEP). Ce peptide est radiomarqué avec le gallium 68 juste avant son utilisation (figure 6), son couplage avec le ⁶⁸Ga permet ainsi son utilisation en imagerie TEP pour le diagnostic et le suivi des TNE GEP. Son service médical rendu (SMR) a été jugé comme important par les autorités sanitaires (26,27).

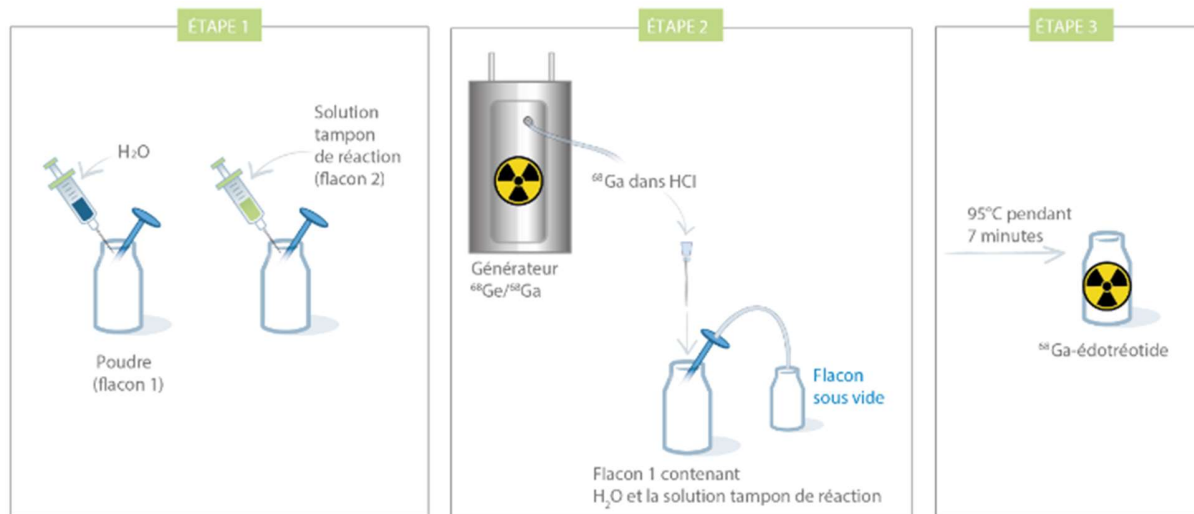


Figure 6 : Procédure de radiomarquage de l'édotrétotide au ⁶⁸Ga (SOMAKIT TOC)

D'autres radiopharmaceutiques permettant le diagnostic des tumeurs neuroendocriniennes sont aussi en cours de développement. Parmi eux, il existe le radiotracer ⁶⁸Ga-DOTATATE (peptide oxodotrétotide (=TATE) + ⁶⁸Ga), ce traceur a une affinité supérieure au SOMAKIT TOC[®] pour les récepteurs à la somatostatine sst2. Ce ⁶⁸Ga-DOTATATE a reçu une approbation par la FDA pour le diagnostic des TNE en 2016. Les données obtenues chez l'homme lors d'une étude comparée avec le SOMAKIT TOC[®] ont démontré que malgré une affinité supérieur au SOMAKIT TOC[®], le ⁶⁸Ga-DOTATATE a une efficacité équivalente dans le diagnostic des tumeurs neuroendocrines (28).

Toutefois, une autre étude comparant le SOMAKIT TOC[®] cette fois-ci au ⁶⁴Cu-DOTATATE pour la détection des lésions de tumeurs neuroendocrines semble démontrer une meilleure efficacité du ⁶⁴Cu-DOTATE avec plus de lésions détectées qu'avec le SOMAKIT TOC[®] malgré une sensibilité similaire dans la cohorte de patients de l'étude. Cependant il aurait été aussi intéressant de comparer le SOMAKIT TOC[®] non pas conjugué au ⁶⁸Ga mais lui aussi au ⁶⁴Cu avec le ⁶⁴Cu-DOTATATE afin de conclure sur l'apport réelle de ce derniers dans le diagnostic des TNE (figure 8) par rapport au SOMAKIT TOC (29).

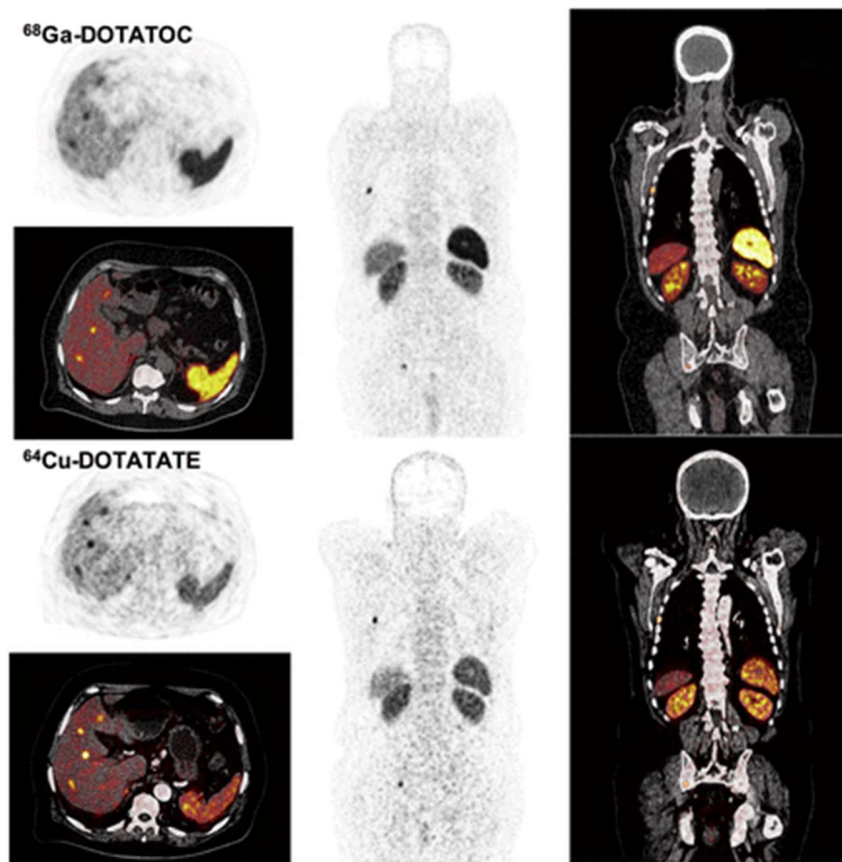


Figure 7 : Etude comparée du SOMAKIT TOC[®] et du ⁶⁴Cu-DOTATATE pour la localisation de tumeurs neuroendocriniennes via TEP (29)

I.4.3.1.2 Le LUTATHERA

Le succès clinique du ⁶⁸Ga-DOTATATE pour le diagnostic des TNE a logiquement conduit à l'association du DOTATATE avec le lutétium 177 pour la mise en œuvre du traitement RIV des TNE. Le radiopharmaceutique nommé LUTATHERA, est composé de l'association du lutétium 177 et du peptide ligand des récepteurs à la somatostatine l'oxodotrétotide (¹⁷⁷Lu-oxodotrétotide) qui est produit par la société AAA. Ce médicament a fait preuve d'une excellente tolérance ainsi que d'une grande efficacité au cours de son essai de phase III (figure 9) avec une amélioration de la survie globale et de la survie sans progression chez les patients l'ayant reçu comparativement au groupe contrôle (30). Il a ainsi pu obtenir une AMM en 2017(31) et une approbation de la FDA en 2018(32) pour le traitement des TNE-GEP inopérables, métastatiques, progressives et exprimant les récepteurs à la somatostatine.

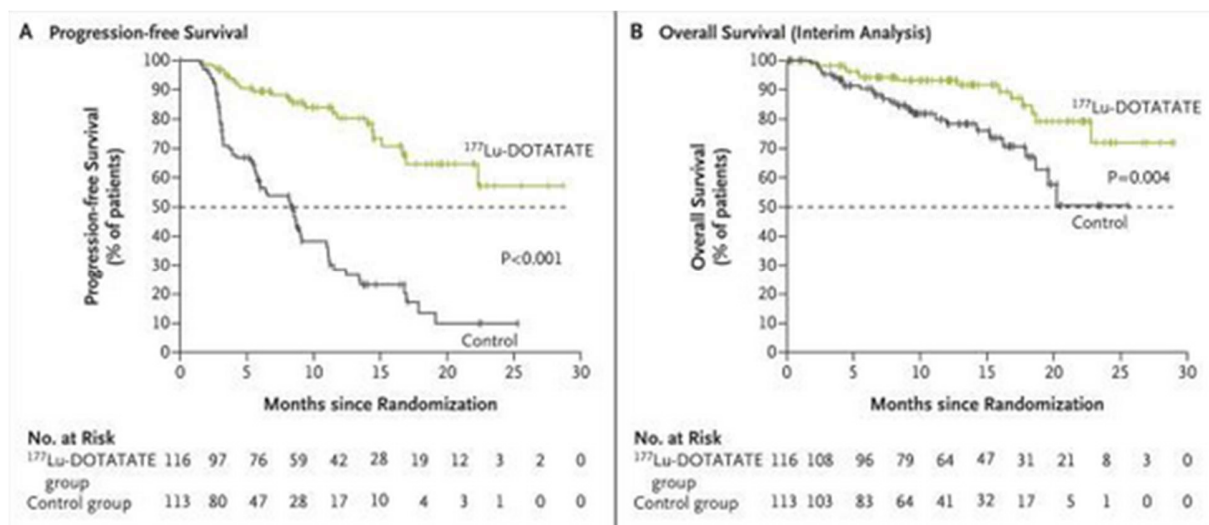


Figure 8 : Résultats de l'essai de phase 3 du LUTATHERA chez des patients atteints de TNE (30).

- A. Résultats de l'analyse Kaplan-Meier de la survie sans progression de la maladie évalués par des examinateurs centraux indépendants qui ne connaissaient pas l'affectation des traitements.*
- B. Résultats de l'analyse intermédiaire prévue de la survie globale.*

Les résultats positifs du LUTATHERA dans le traitement des TNE ont conduit l'équipe de Kasi PM et al. en 2019 à réaliser un essai clinique de radiothéranostique afin d'élargir son indication thérapeutique au traitement de patients atteints de carcinome à cellules de Merkel exprimant les récepteurs à la somatostatine. Après avoir localiser les lésions cancéreuses avec le $^{68}\text{Ga-DOTATATE}$, le traitement par LUTATHERA a ensuite été entrepris. Les résultats de l'essai ont montré un effet anticancéreux important de cette nouvelle thérapie en association avec l'immunothérapie pour le traitement des cancers de cellules de Merkel permettant d'envisager un élargissement de de l'utilisation du LUTATHERA au traitement d'autres cancers (33).

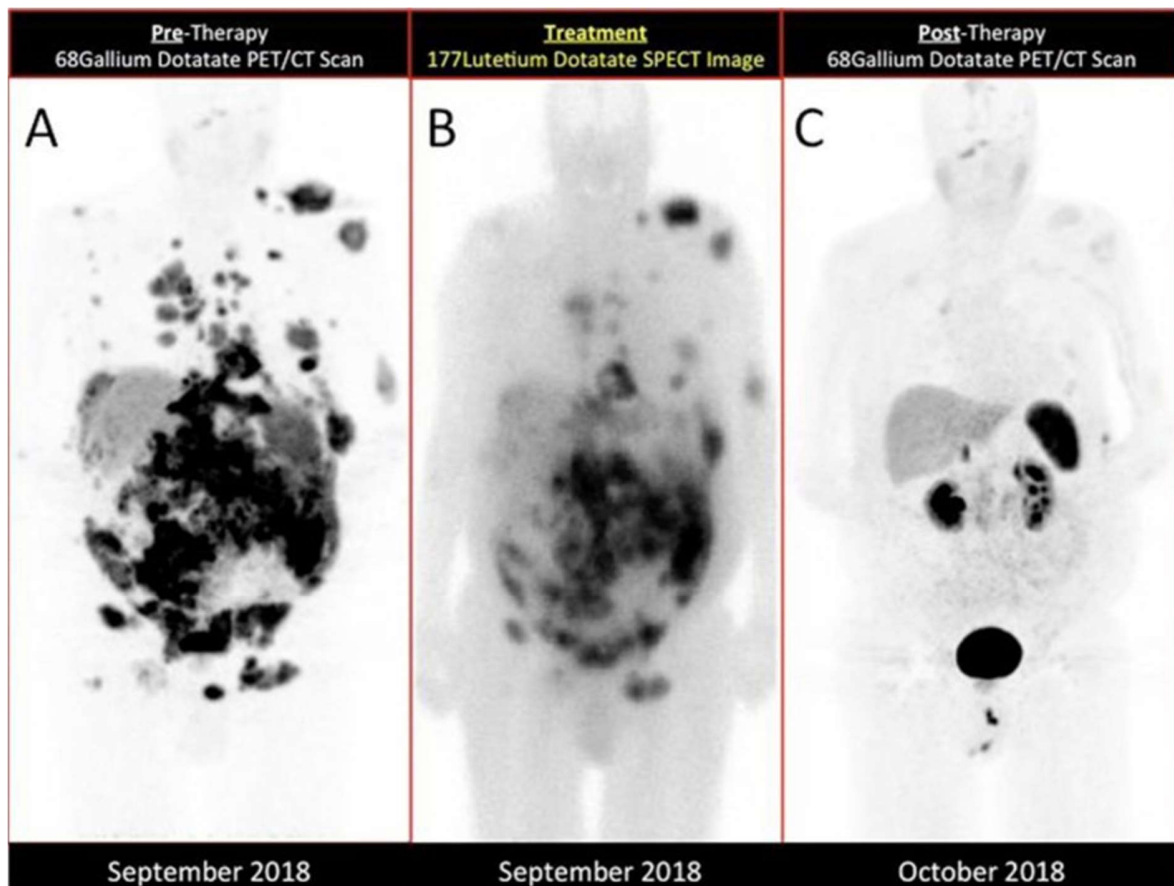


Figure 9 : Traitement d'un patient atteint de cancer de la cellule de Merkel métastasé par une approche théranostique utilisant le ^{68}Ga -DOTATE pour le diagnostic et la localisation des lésions cancéreuses suivi de l'utilisation du LUTATHERA pour la RIV (33).

A. Images diagnostiques (avant traitement) de la TEP/TDM au ^{68}Ga -DOTATE réalisées avant le traitement et montrant une positivité des récepteurs de la somatostatine chez un patient atteint d'un cancer de la cellule de Merkel. Les métastases cancéreuses sont visibles dans de nombreuses parties du corps (abdomen, os, le sternum/les côtes, et de grandes métastases sous la peau).

B. Preuve de principe montrant que le traitement par analogue de la somatostatine radiomarquée (^{177}Lu -Dotatate) se distribue dans tous les endroits où les récepteurs de la somatostatine sont positifs.

C. Images diagnostiques (post-traitement) de la TEP/TDM au ^{68}Ga dotatate réalisées 1 mois après le traitement, montrant une résolution quasi complète de toutes les métastases.

I.4.3.1.3 Le couple radiothéragnostique ^{68}Ga -PSMA-11/ ^{177}Lu -PSMA

Deux autres radiopharmaceutiques indiqués pour la prise en charge du cancer de la prostate ont également été mis au point. Ces deux radiopharmaceutiques sont le ^{68}Ga -PSMA-11 (Illuccix[®]) et le ^{177}Lu -PSMA-617. Le ^{68}Ga -PSMA-11 a été développé à visée diagnostique par l'entreprise australienne Telix Pharmaceuticals. Le ^{177}Lu -PSMA-617 est à visée radiothérapeutique, il est actuellement exploité par la société AAA. Tous deux sont des ligands antagonistes du PSMA. Pour rappel, le PSMA est un antigène membranaire prostatique spécifique.

Le ^{68}Ga -PSMA-11 a obtenu une autorisation d'accès compassionnelle de la part de l'ANSM et a été approuvée par la FDA en 2020(34). Il est aujourd'hui indiqué dans deux cas de figure (35) :

1. Pour les patients ayant une récurrence biologique d'un cancer de la prostate traité initialement de façon radicale, avec ré-augmentation de la concentration sérique du PSA, pour lequel les résultats des examens cliniques, biologiques et d'imagerie obligatoires sont discordants ou tous négatifs et ne permettent pas de conclusion sur la prise en charge du patient.
2. Chez un patient pour lequel la radiothérapie vectorisée du cancer de la prostate par ^{177}Lu -PSMA-617 ou ^{177}Lu -PSMA-11 est envisagée pour confirmer la surexpression du PSMA par les diverses lésions considérées comme cancéreuses, dont l'extension a été évaluée grâce à d'autres examens dont obligatoirement une TEP à la fluorocholine (^{18}F).

Le ^{177}Lu -PSMA-617, a obtenu une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) qui a démarré le 1^{er} décembre 2021 pour le traitement des adultes atteints d'un cancer de la prostate progressif, métastatique, résistant à la castration, surexprimant le PSMA et ayant été préalablement traité par une chimiothérapie et au moins une hormonothérapie anti-androgénique (36).

La figure 10 représente un patient atteint d'un cancer de la prostate récidivant traité par cette nouvelle thérapie. La cartographie des lésions cancéreuses a d'abord été réalisée par le PSMA-11 couplée au ^{68}Ga . Ensuite, la thérapie a été réalisée via le ^{177}Lu -PSMA-617. Les résultats obtenus ont témoigné d'une forte régression des métastases tumorales (37).

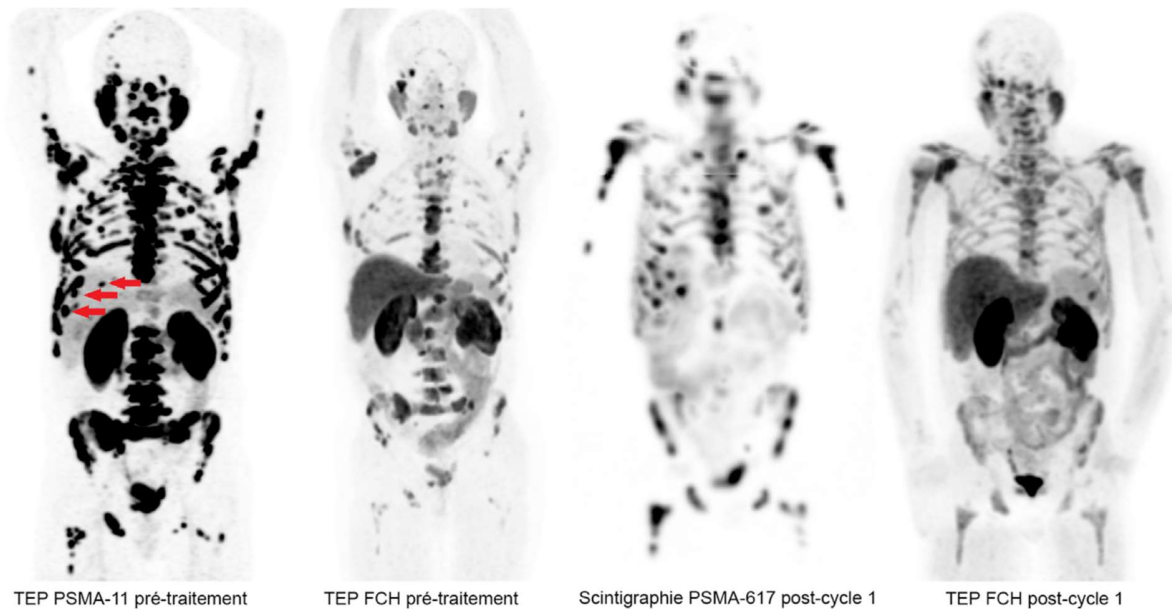


Figure 10 : Approche radiothéragnostique utilisant ciblant le PSMA dans le cancer de la prostate par le couple ^{68}Ga -PSMA11/ ^{177}Lu -PSMA617 (37).

Reconstructions de type projection d'intensité maximale (MIP) des TEP au ligand du PSMA marqué au gallium-68 (PSMA-11) et à la ^{18}F -fluorocholine (FCH) pré-thérapeutiques montrant une hyperfixation ostéomédullaire secondaire diffuse et des lésions secondaires hépatiques hyperfixantes (visualisées uniquement en PSMA- 11 ; flèches rouges). Reconstruction MIP de la TEMP réalisée 24 heures après le premier cycle de traitement par radiothérapie interne vectorisée (RIV) au ligand du PSMA marqué au lutétium-177 (PSMA-617). Il y a une bonne fixation du radiopharmaceutique par les lésions osseuses et hépatiques. Reconstruction MIP de la FCH réalisée 4 semaines après le premier cycle de RIV au PSMA-617 montrant la bonne réponse métabolique des lésions osseuses.

Une autre étude menée sur des patients atteints de cancer de la prostate à un stade avancé a été réalisée en utilisant le ligand PSMA-617 couplé à un émetteur α l'actinium 225 (^{225}Ac) au lieu du traditionnel ^{177}Lu émetteur β^- . Dans cette étude, un patient a été traité directement avec l'alphathérapie tandis qu'un autre patient a été traité préalablement avec le ^{177}Lu avant d'avoir fait l'objet d'un traitement au ^{225}Ac . Le patient traité au ^{225}Ac a montré une réponse thérapeutique très intéressante avec une disparition des lésions à l'imagerie TEP associée à une forte diminution plasmatique de la PSA (marqueur biologique du cancer de la prostate). Chez le patient ayant été préalablement traité par ^{177}Lu , une progression des lésions cancéreuses après la thérapie au ^{177}Lu (figure 11) a pu être observée. À la suite de ces résultats, il a fait l'objet d'un traitement par

alphathérapie au ^{225}Ac . Ce traitement de seconde ligne a permis une régression des lésions cancéreuses observable à l'imagerie, synonyme d'une efficacité thérapeutique (38).

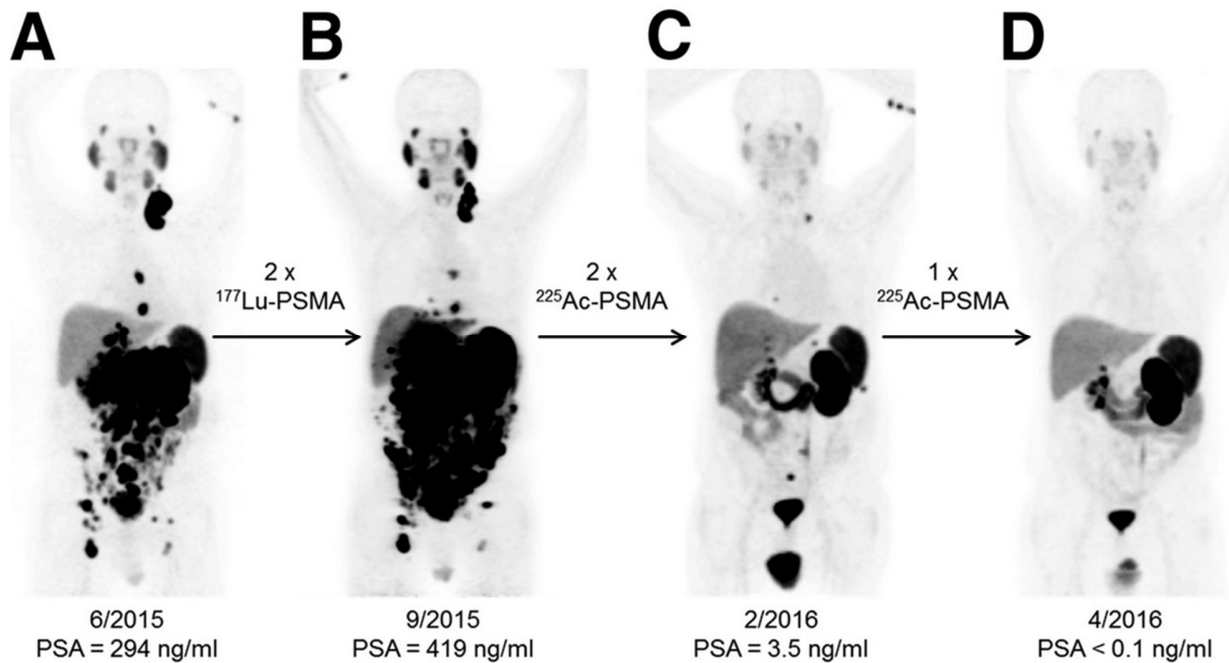


Figure 11 : Scintigraphie TEP/CT au ^{68}Ga -PSMA-11 du patient 2.

Imagerie au stade initial de la tumeur avant traitement au ^{177}Lu (A), imagerie après 2 cycles de β -émetteur ^{177}Lu -PSMA-617 a présenté une progression (B). En revanche, après les deuxième (C) et troisième (D) cycles d'émission α de ^{225}Ac -PSMA-617 présente une réponse impressionnante. (38)

Les résultats de cette étude sont intéressants car ils proposent une alternative en cas d'échec thérapeutique en RIV par « *béta thérapie* » avec l'alpha thérapie.

II. Les nanobodies, nouvelle génération de médicaments radiopharmaceutiques ?

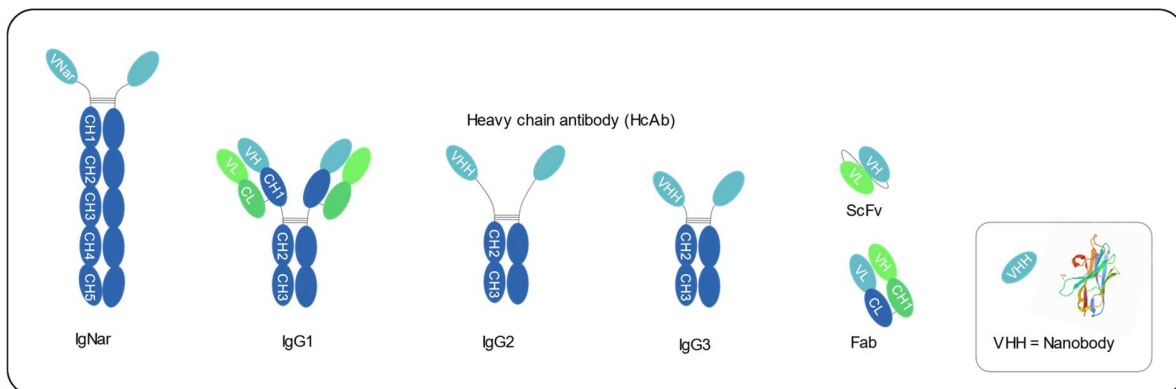
II.1 Histoire et découverte

En 1993, l'équipe de Hammer-Casterman de l'université de Bruxelles a mis en évidence la présence d'anticorps dépourvus de chaîne légère et du domaine constant n°1 de la chaîne lourde (CH1) dans du sérum de *camelidae* (*camelus dromedarius*). Ces anticorps ont été nommés anticorps simple chaîne lourde (en anglais *HCAB* pour *heavy chain antibody*).

Une étude plus approfondie du sérum de *camelidae* a permis de retrouver trois isotypes d'IgG. Une IgG₁ correspondant aux anticorps dits « conventionnels » avec deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, ainsi que deux isotypes différents de HCAs. Le premier isotype est de type IgG₂ avec une longue charnière reliant le domaine constant de la chaîne lourde au domaine variable. Le second est de type IgG₃ avec une charnière beaucoup plus courte reliant le domaine constant de la chaîne lourde au domaine variable. **Le nanobody correspond au domaine variable (VHH)** de ces HCAs (figure 13) (39).

En dehors de la famille des *camelidae* comprenant les chameaux, les lamas ou les alpacas, des anticorps simples chaînes lourdes ont pu être retrouvés dans d'autres familles d'espèces marines appartenant à différentes sous-classes de chondrichthyens ou poissons cartilagineux comme les élamobranches (40). Chez les élamobranches comme certaines espèces des requins, les raies ou les poissons raies, des anticorps simples chaîne lourde sont présents. Ils sont appelés *immunoglobuline new antigen receptor* (IgNAR). Ces IgNAR possèdent, comme les HCAs, deux chaînes lourdes homodimériques ayant la particularité de posséder 5 domaines constants (CH) et aucun domaine de chaîne légère (figure 12).

Les nanobodies obtenus à partir des HCAs pourront soit être utilisés tels quels, ou soit utilisés en tant que « brique » dans la construction de molécules plus complexes (figure 12).



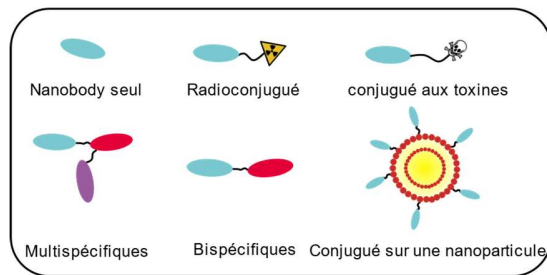


Figure 12 : Représentation des différents types d'anticorps, du nanobody et leurs potentielles mode d'utilisation

II.2 Génération des nanobodies

Les nanobodies sont générés après l'immunisation d'un lama par l'antigène d'intérêt (voir figure 13). Après immunisation, le sang du lama est collecté et les lymphocytes en sont extraits. L'ARN des lymphocytes est extrait puis transformé en ADNc via RT-PCR. Les gènes codant pour les domaines variables des anticorps (nanobodies) en sont ensuite isolés via PCR et sont clonés dans des vecteurs phagémides afin de constituer une librairie. Cette librairie encore sous format d'ADN va ensuite être utilisée pour transformer des bactéries *E. coli*. La librairie, alors sous format bactérien, pourra permettre la production des nanobodies sous forme de phage. La librairie sous format bactérien sera infectée par des phages helpers M13. Cela va permettre l'expression de cette dernière sous forme de phage exprimant à leur tête un nanobody et contenant dans leurs corps sa séquence génétique. Une fois cette librairie sous forme de phage, elle va faire l'objet d'une sélection contre l'antigène d'intérêt par phage display. La phage librairie est incubée avec l'antigène mentionné. Les phages exprimant des clones non spécifiques incapables de se lier à l'antigène sont éliminés par lavage. Les phages exprimant des clones spécifiques qui se sont liés à l'antigène sont élués et récupérés. Les phages exprimant les clones spécifiques sont soit utilisés pour une amplification avec un second tour de sélection, soit utilisés pour transformer des bactéries permettant l'isolement et l'identification de la séquence du clone. Les clones isolés seront ensuite produits sous format protéique purifié et caractérisé.

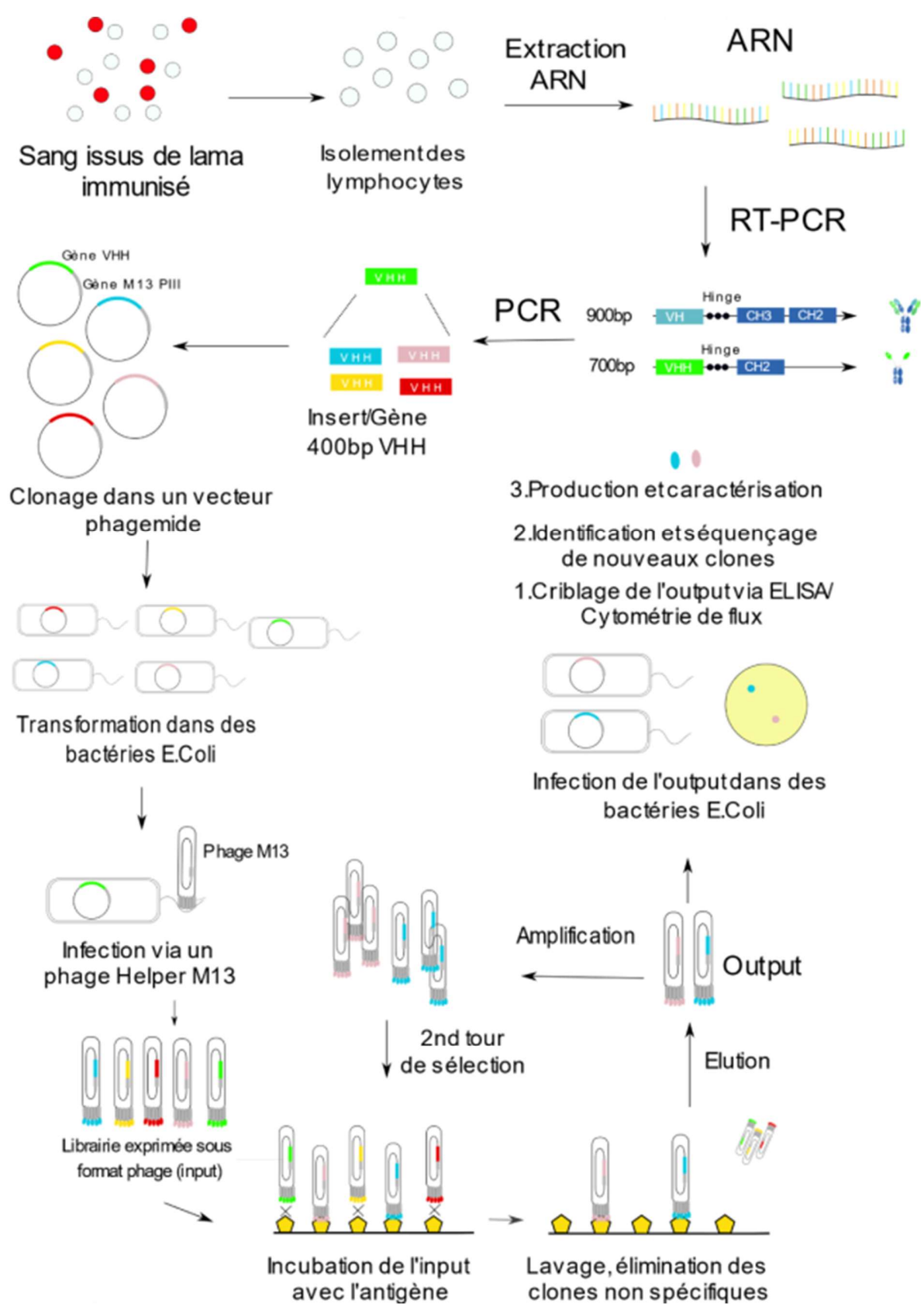


Figure 13 : Processus de génération des nanobodies

II.3 Caractéristiques des nanobodies

II.3.1 Structure des nanobodies

Les VHH, aussi appelés nanobodies ou Sdabs (*single domain antigen binding*), ont un poids moléculaire d'environ 12-13kDa. Bien que les nanobodies présentent une forte homologie de structure avec les domaines variables de la chaîne lourde (VH) des anticorps conventionnels on peut noter quelques différences. Parmi les différences que l'on retrouve, on a par exemple un nombre d'acides aminés polaires et chargés plus important au niveau de la zone d'interaction VH/VL chez les VHH que chez les VH. On note aussi un pont disulfure additionnel qui peut être retrouvé au sein des VHH dont le rôle serait de stabiliser leur structure en l'absence de chaîne légère.

Ces VHH comprennent 4 régions constantes appelées Framework et 3 régions variables nommées boucles hypervariables ou CDR (régions déterminant de complémentarité). Ces CDR correspondent l'interface d'interaction Ag/Ac, le paratope. Chez les VHH, le CDR 3 se retrouve avec une longueur supérieure avec en moyenne 3-4 aminoacides supplémentaires par rapport à ce qui est observé chez le VH. Cet allongement permet au VHH d'augmenter la capacité de son CDR3 à se diversifier en termes de séquences d'un facteur 20 pour chaque résidu supplémentaire. Le CDR 3 est également la zone la moins conservée. Il présente une grande diversité en termes de séquences en acides aminés. Cette longueur des VHH entraîne l'augmentation du nombre de conformations structurelles et spatiales que le CDR 3 peut adopter. Les VHH peuvent utiliser leurs CDR 3 comme un doigt capable de reconnaître des cavités épitopiques inaccessibles aux anticorps conventionnels. Des CDR3-VHH plus courts que les CDR3-VH ont aussi été retrouvés, les HCAbs semble exploiter pleinement les CDR 3 de leurs VHH cela contribue à la haute diversité du répertoire de reconnaissance d'antigène par les HCAbs retrouvée chez les *camelidae*.

II.3.2 Paramètre physico-chimique des nanobodies

II.3.2.1 Propriétés thermiques des nanobodies

Les nanobodies sont capables de maintenir leur conformation dans une large gamme de températures. Ils peuvent être conservés plusieurs mois à 4°C, plusieurs années à -20°C encore plus longtemps à -80°C, tout en conservant leur capacité de reconnaissance de l'Ag. Les nanobodies peuvent également être utilisés pour réaliser des incubations à 37°C pendant plusieurs jours sans perte d'affinité pour l'antigène. Ils peuvent être dénaturés de façon thermique à partir de températures comprises entre 60-80°. Certains peuvent retrouver leur conformation initiale après dénaturation à des températures de plus de 90°C (41). Il est même possible d'améliorer la stabilité thermique des nanobodies par modification ciblée d'un ou plusieurs acides aminés (42).

II.3.2.2 Stabilité chimique des nanobodies

Les nanobodies sont des protéines très solubles en milieu aqueux.

Les nanobodies sont sensibles à l'activité de certaines enzymes du tube digestif comme la chymotrypsine ou la pepsine, mais il est possible de les modifier et de les rendre résistants à ces enzymes par exemple par l'ajout de pont disulfure localisée (Cys position 54 et 78) (43).

De la même manière qu'il est possible d'améliorer leur stabilité thermique, il est également possible d'améliorer la stabilité des nanobodies aux conditions dénaturantes par intervention ciblée sur leur séquence d'acide aminée (44). Grâce aux techniques actuelles de biologie moléculaire et au fait que les nanobodies possèdent des fractions conservées (Framework) non impliquées dans la reconnaissance de l'antigène, des Framework identifiés comme conférant une meilleure stabilité thermochimique peuvent être greffés sur des nanobodies pour améliorer leur stabilité (45).

II.3.3 Interaction antigène/anticorps des nanobodies

Les nanobodies interagissent avec leur épitope antigénique via leur CDR 1, CDR2 et CDR 3. Le CDR 3 est responsable de la spécificité de reconnaissance de l'antigène. Les nanobodies par leur CDR 3 souvent plus long, vont préférentiellement reconnaître des épitopes sous forme de cavités généralement moins accessibles pour les anticorps conventionnels. D'un point de vue moléculaire, le mécanisme d'interaction avec l'antigène se fait par liaison non-covalente, de la même façon qu'avec les anticorps conventionnels. Ils sont capables de se lier à leur antigène avec une affinité de l'ordre du nanomolaire pouvant aller aux picomolaires pour certains (41,46).

II.3.4 La pharmacocinétique des nanobodies

Les nanobodies injectés par voie parentérale ont une bonne diffusion intratissulaire ainsi qu'une demi-vie d'élimination très courte de l'ordre d'une quinzaine de minutes. Cette élimination est quasi exclusivement rénale, la barrière de filtration glomérulaire étant de l'ordre de 60 Kda et les nanobodies étant d'un poids moléculaire d'environ 13 kDa. Une rétention rénale des nanobodies est également présente, celle-ci constitue l'un des principaux inconvénients de ces derniers en médecine nucléaire car pouvant être responsable d'une néphrotoxicité. Leur cinétique plasmatique peut être modifiés par construction de format, par exemple, l'ajout d'un second nanobody anti-albumine permet ainsi de rallonger la demi-vie plasmatique (47).

S'agissant de leur immunogénicité, leurs séquences étant proches de celle des VH humains, ils sont donc très peu immunogènes chez l'homme (41). La pharmacocinétique des nanobodies présente plus d'avantages que d'inconvénients pour leur utilisation en médecine nucléaire (figure 14)

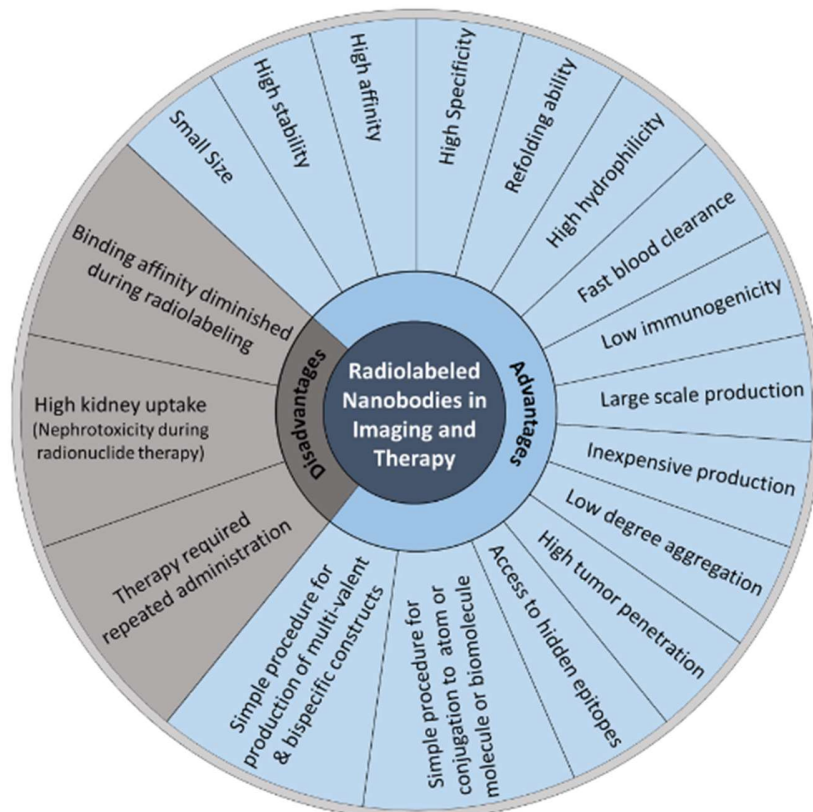


Figure 14 : Comparaisons des avantages et des inconvénients des nanobodies comme agents de radiothérapie (48).

II.4 Fonctionnalisation des nanobodies

II.4.1 Le radiomarquage des nanobodies

L'étape de radiomarquage des nanobodies est une étape très sensible car selon la procédure utilisée, cela peut entraîner des conséquences importantes sur l'affinité du nanobody pour son antigène. Différentes procédures de radiomarquage des nanobodies sont disponibles, le choix de la méthode dépendra du radioélément voulu, qui lui-même dépendra de l'application final souhaité. On distingue les méthodes de radiomarquage direct et indirect (figure 15).

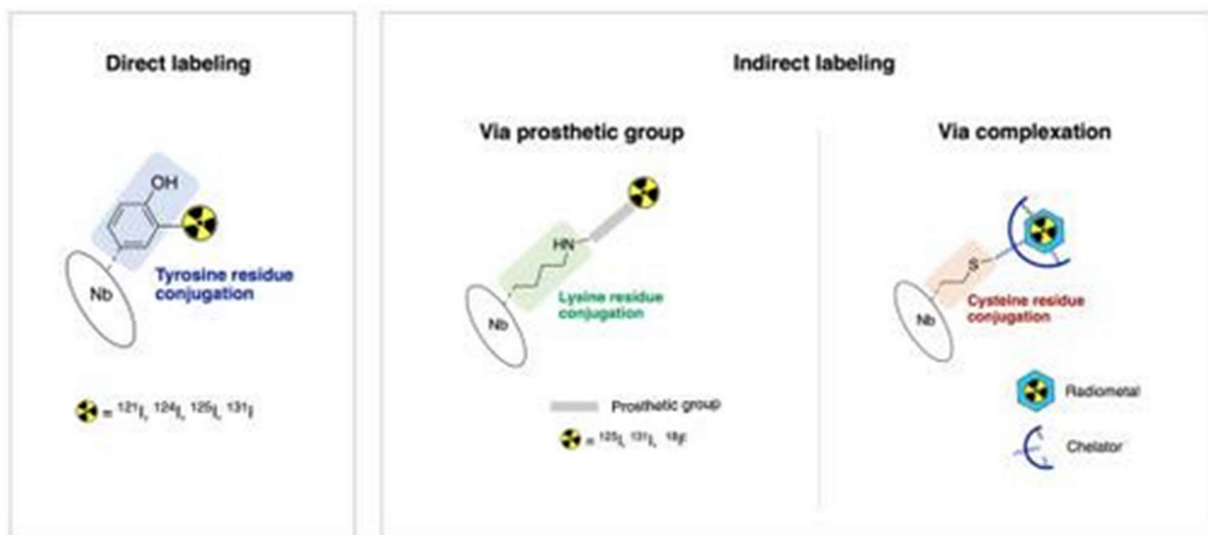


Figure 15 : Les différentes méthodes de radiomarquage des nanobodies (51)

II.4.1.1 Radiomarquage direct des nanobodies

Cette méthode consiste à marquer directement les protéines au niveau de leur séquence en acide aminée, elle concerne généralement le radiomarquage des protéines avec des radioéléments appartenant à la famille des halogènes. Un des exemples les plus fréquents de cette méthode est l'iodation des protéines, c'est-à-dire le marquage des protéines avec de l'iode radioactif. La fixation du radioélément se fait par méthode chimique à l'aide de kit de couplage via la chloramine T comme le IodoGen[®] Coated (49)(50). Cette technique entraîne la liaison d'un radionucléide sur le cycle aromatique d'acides aminés aromatiques comme la tyrosine. Le problème avec cette

méthode, c'est que le radiomarquage n'est pas toujours homogène. De plus, certains de ces acides aminés peuvent être localisés dans des régions sensibles pour la reconnaissance de l'épitope. La radioconjugaison de ces cycles aromatiques à ce niveau peut entraîner une perte d'affinité du nanobody pour son épitope.

II.4.1.2 Radiomarquage indirect

Le radiomarquage indirect consiste à conjuguer le radioélément non pas directement sur la séquence en acide aminée de la protéine mais par l'intermédiaire d'un groupement fonctionnel qui sera préférentiellement conjugué à la protéine en C-terminale.

Si le radioélément appartient au groupe des halogènes, ce groupement fonctionnel sera une molécule contenant le radioélément, c'est par exemple le cas pour le fluor 18 ou l'iode pour lesquels de nombreux groupement fonctionnel sont disponibles (figure 16).

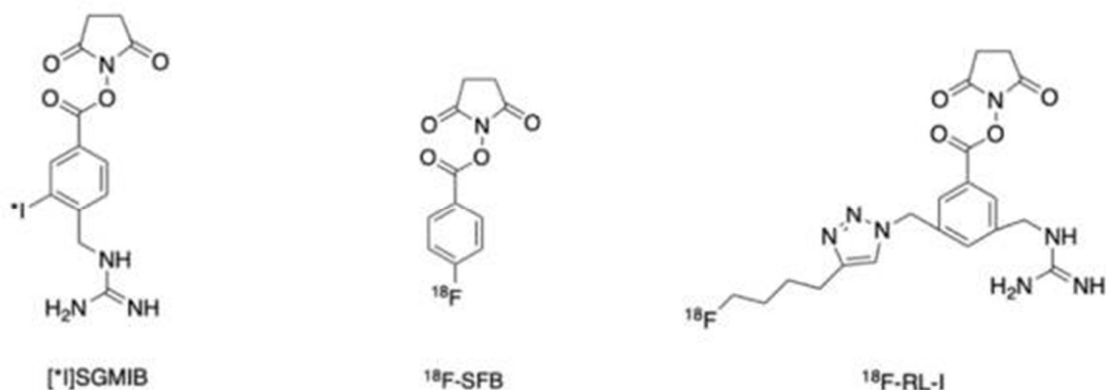


Figure 16 : Exemple de molécules permettant le radiomarquage indirect de radioélément de la famille des halogènes (51)

Dans le cas où le radioélément appartiendrait à la famille des métaux, le groupement fonctionnel sera un agent chélateur. Un agent chélateur (du grec *khêlê* : « pince ») est une molécule chimique capable de fixer un cation métallique. On peut établir deux grands groupes de chélateurs, les ligands macrocycliques et les ligands acycliques. Les ligands macrocycliques sont des molécules cycliques qui se définissent par la présence d'au moins 9 atomes et d'au minimum 3 liaisons avec le métal.

Dans le cas de l'utilisation d'un chélateur, le radioélément sera conjugué au nanobody par une réaction de complexation, ces réactions peuvent selon le couple radionucléide/chélateur utilisé,

nécessiter des conditions de réaction assez rude comme avec le DOTA pour le ^{177}Lu , ou la chélation doit se faire à 90°C pendant un certain temps. Bien que certains nanobodies soient capables de retrouver leur conformation d'origine après avoir été exposé à de telles conditions, ce n'est pas le cas de tous. Cela peut donc présenter un réel obstacle à leur utilisation en radiothérapie. Il faudra donc privilégier, si possible, un couple radionucléide/chélateur dont les conditions de couplage limitent le risque d'altérer le nanobody ou son affinité pour son antigène ou envisager un radiomarquage par une autre méthode.

Dans le cas des nanobodies, la majorité des situations rencontrées font appel au radiomarquage indirect via l'utilisation de chélateur.

II.4.1.2.1 Les agents chélateurs en médecine nucléaire

II.4.1.2.1.1 Stabilité des radiocomplexes

La stabilité du complexe radionucléide-chélateur dépend des caractéristiques du radionucléide et du chélateur. Les radionucléides comme le $^{68}\text{Ga}^{3+}$, $^{111}\text{In}^{3+}$, $^{92}\text{Y}^{3+}$ et le $^{177}\text{Lu}^{3+}$ nécessitent la présence d'atomes donneurs d'électrons comme l'oxygène ou l'azote dans le chélateur.

Les chélateurs macrocycliques polydentates, entraînent la formation de complexes bien plus stables que les chélateurs acycliques. La taille de la cavité centrale du chélateur devant accueillir le radionucléide est aussi un paramètre important pour la stabilité du complexe. Le radioélément doit pouvoir être encapsulé parfaitement dans le cœur du chélateur sans contrainte stérique.

Le pH est un des paramètres les plus importants à prendre en compte car il influence directement sur le niveau de protonation des chélateurs. Or les liaisons des radiométaux aux chélateurs se font par le biais des fonctions acide carboxylique ou amine de ces mêmes molécules, le niveau de protonation a donc un impact direct sur la liaison entre le radiométal et le chélateur.

D'un point de vue mathématique, ces paramètres sont synthétisés par la valeur de la constante de complexation pK_c propre à chaque couple radionucléide chélateur. Cette valeur est représentative de la stabilité de chaque radiocomplexe. Par définition plus la valeur du pK_c sera élevée plus le complexe sera stable. A noter que la valeur du pK_c est variable en fonction du pH, ce paramètre

est donc à ne pas négliger quand on sait que dans l'organisme le pH peut être différent entre le microenvironnement tumoral et le reste de l'organisme.

II.4.2.1.1.2 Les agents chélateurs utilisés en médecine nucléaire

Les chélateurs utilisés en médecine nucléaire dérivent de molécules cheffes de files dont les plus connues sont les dérivés du NOTA, du DOTA, DTPA, ATSM, TETA ainsi que les dérivés DiAmSar. Nous allons présenter certains des chélateurs les plus fréquemment rencontrer avec les radionucléides de la famille des métaux les plus utilisée en médecine nucléaire comme le gallium, l'indium, l'yttrium, le cuivre ou encore le lutétium.

Les chélateurs utilisables avec le gallium 68

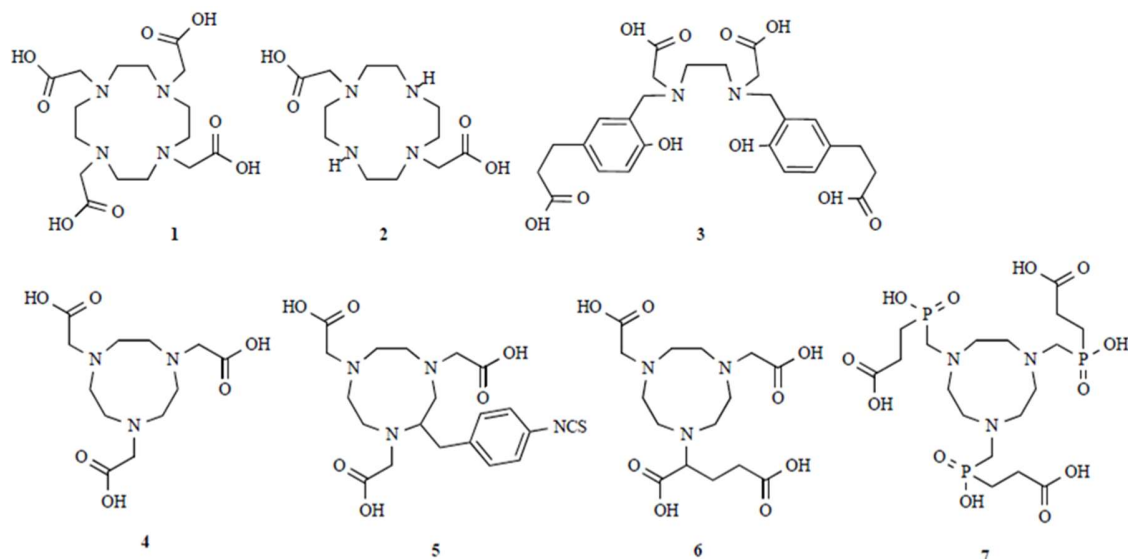


Figure 17 : Structure chimique des chélateurs permettant la chélation du gallium 68 (52).

1) DOTA. 2) DO2A. 3) HBED-CC. 4) NOTA. 5) *p*-SCN-Bn-NOTA. 6) NODAGA. 7) PrP9.

Les chélateurs utilisés avec l'indium

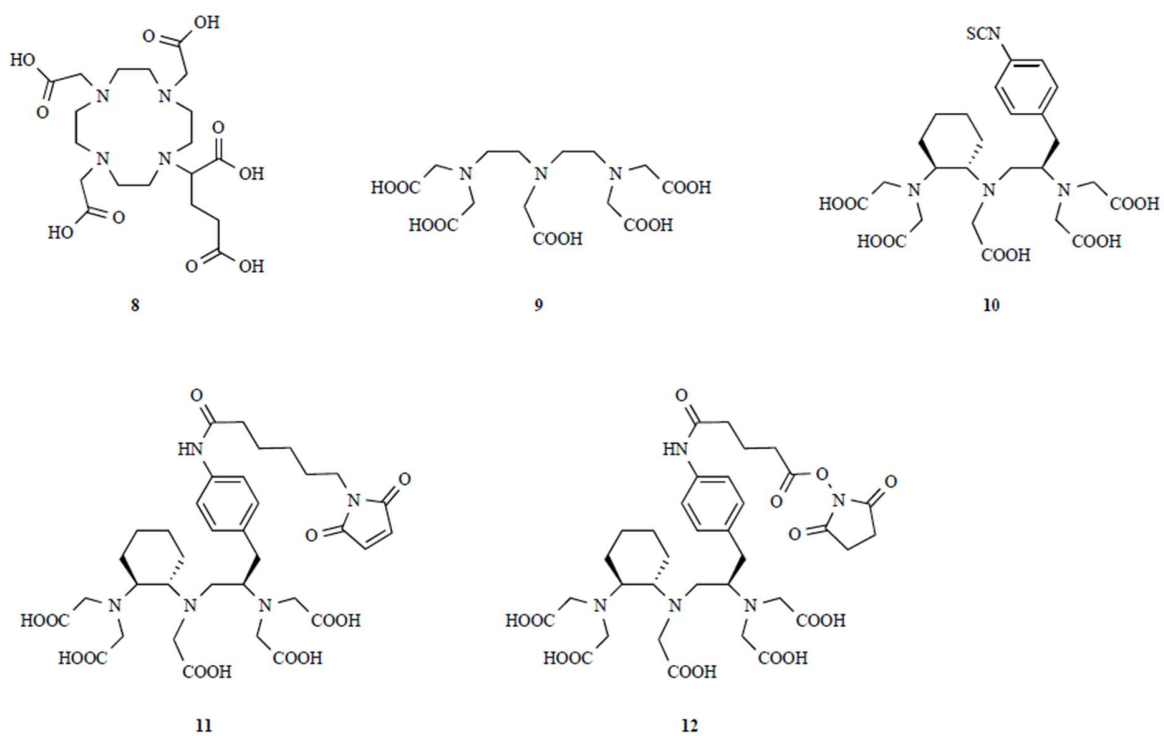
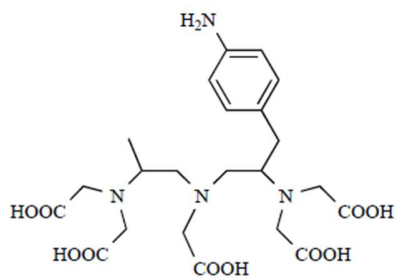


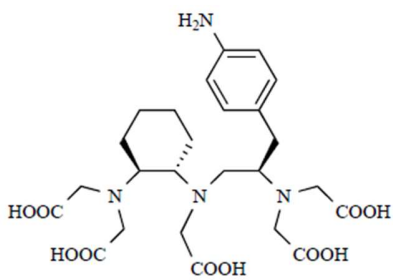
Figure 18 : Structures chimiques des chélateurs utilisés pour la chélation de l'indium (52).

8) DOTA-GA. 9) DTPA. 10) CHX-A''-DTPA-isothiocyanate. 11) CHX-A''-DTPA-maléimide. 12) CHX-A''-DTPA-glutaric acid NHS ester.

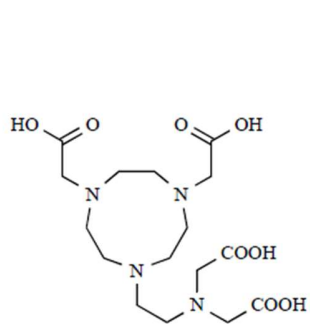
Les chélateurs utilisés avec l'yttrium



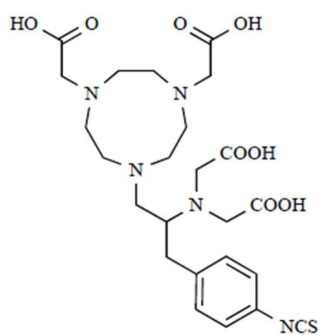
13



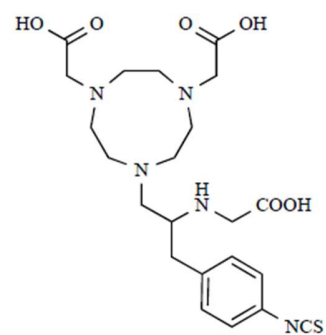
14



15



16



17

Figure 19 : Structures des chélateurs utilisés avec l'yttrium (52).

13) 1B4M-DTPA. 14) CHX''-DTPA. 15) NETA. 16) C-NETA. 17) C-NE3TA.

Les chélateurs utilisables avec le lutétium

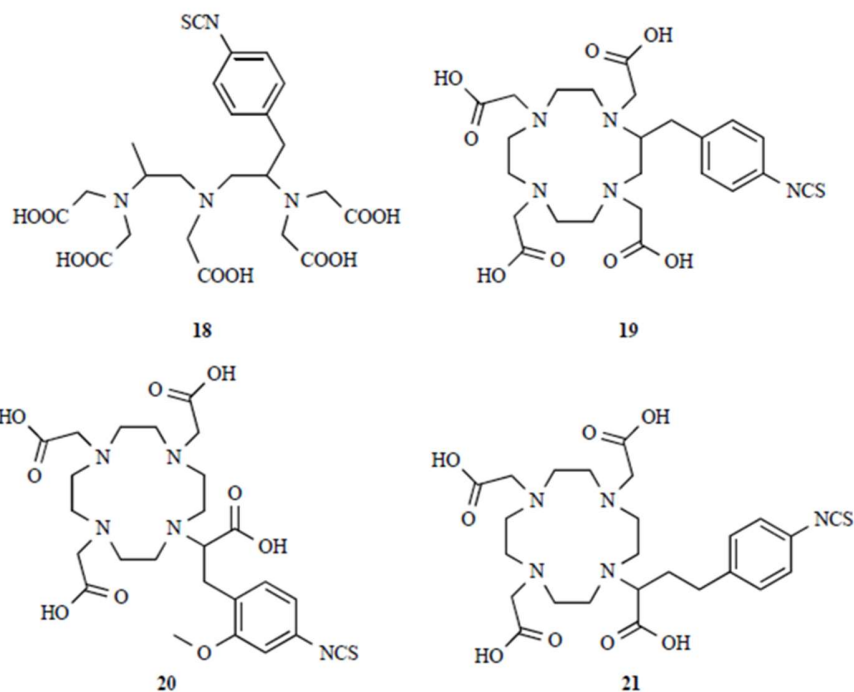


Figure 20 : Structures chimiques des chélateurs utilisés avec le lutétium (52).

18) 1B4M-DTPA. 19) C-DOTA. 20) MeO-DOTA. 21) PA-DOTA-isothiocyanate.

Les chélateurs utilisables avec le cuivre

De nombreuses familles de chélateurs peuvent être utilisées avec le cuivre en médecine nucléaire. Notamment les dérivés du NETA (voir figure 19), les dérivés ATSM (voir figure 20), les dérivés TETA (voir figure 21) et le dérivés DiAmSar (voir figure 22).

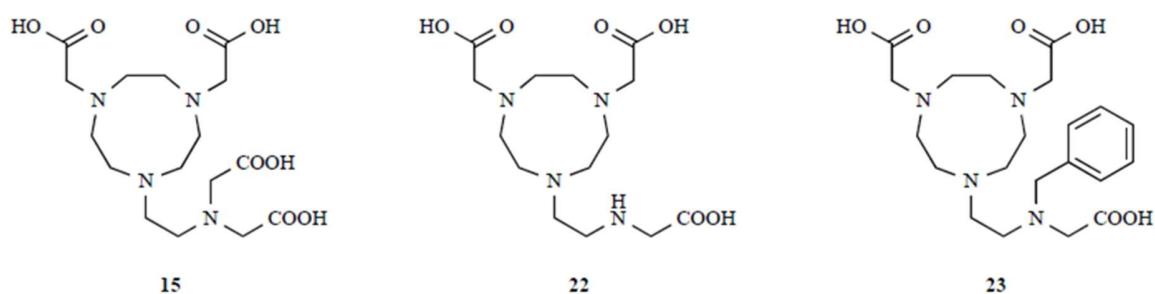


Figure 21 : Structures chimiques des chélateurs dérivés NETA utilisables avec cuivre (52).

15) NETA. 22) NE3TA. 23) NE3TA-Bn.

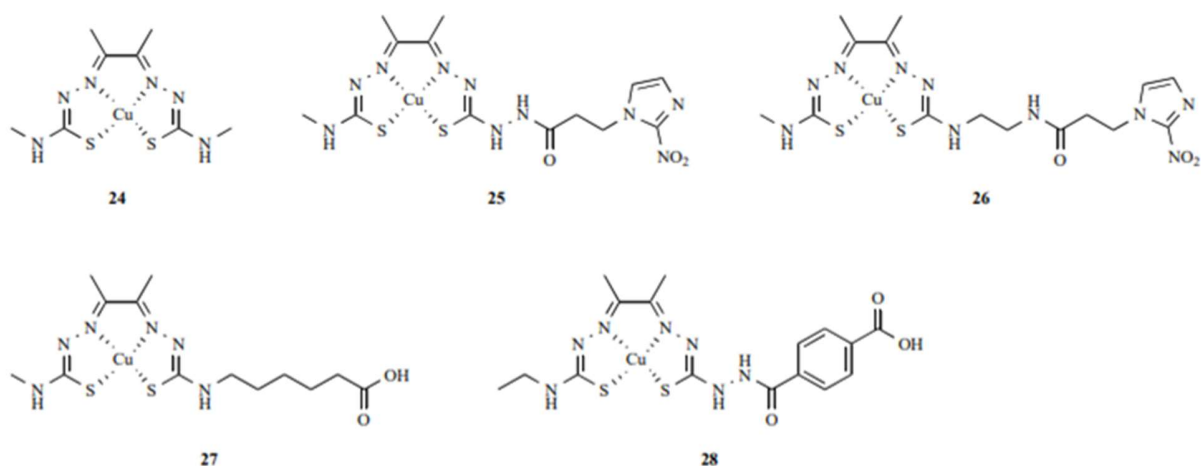


Figure 22 : Structures des dérivés ATSM utilisables avec le cuivre (52).

24) *Cu-ATSM*. 25) *Cu-diacetyl-(4'-methyl-4-N-ethyl-3-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)propanamide-bis-thiosemicarbazone*. 26) *Cu-diacetyl-(4'-methyl-4-N-ethyl-3-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)propanamide-bis-thiosemicarbazone*. 27) *Cu-diacetyl-4-hexanoic acid-4'-methyl-bis-thiosemicarbazone*. 28) *Cu-diacetyl-2-(4-N-ethyl-3-thiosemi-carbazonato)-3-[4-N-(amino)-4-carboxybenzamide]-3thiosemicarbazone*.

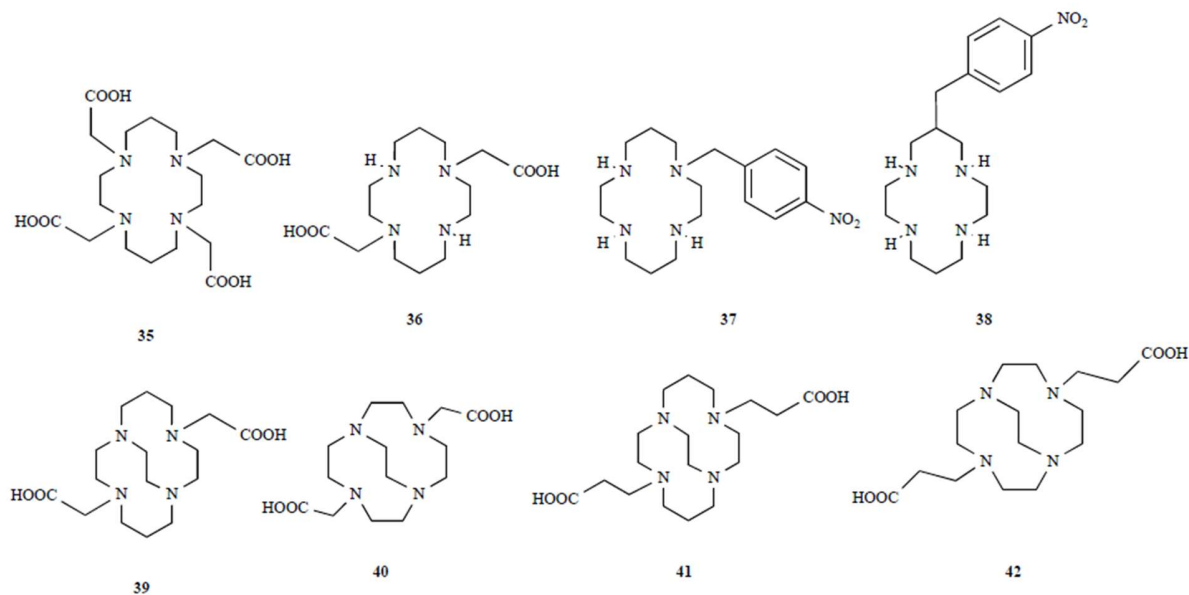


Figure 23 : Structures des dérivés TETA utilisables avec le cuivre (52).

35) *TETA*. 36) *TE2A*. 37) *1-(4-nitrobenzyl)-cyclam*. 38) *6-(4-nitrobenzyl)-cyclam*. 39) *CB-TE2A*. 40) *CB-DO2A*. 41) *3,3'-(11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane-4,11-diyl)dipropionic acid*. 42) *3,3'-(1,4,7,10-tetraazabicyclo[5,5,2]tetradecane-4,10-diyl)dipropionic acid*

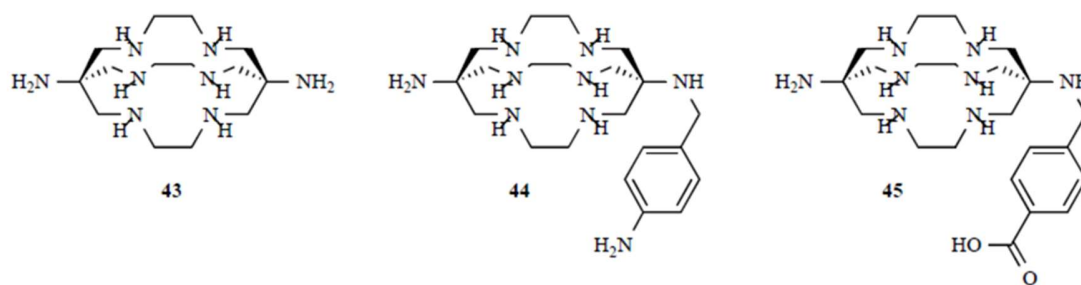


Figure 24 : Structures dérivés DiAmSar utilisables avec le cuivre (52).

43) *DiAmSar*. 44) *SarAr*. 45) *AmBaSar*.

II.4.3 Rappel sur les réactions de complexation

II.4.3.1 Définition

Un complexe est un édifice polyatomique centré autour d'un ion métallique coordinateur M autour duquel sont coordonnés des atomes, des ions ou des molécules appelés ligands ou coordinat. L'ion métallique M est lié au ligands L, via des liaisons dites de coordinences. Le ligand donne un doublet libre à l'ion coordinateur qui l'accepte. Le nombre de liaisons n formées entre le métal M et le ligand L correspond à ce que l'on appelle l'indice de coordination, coordinence ou denticité (voir figure 25). La charge du complexe correspond à la somme algébrique des éléments le constituant (53).

Deux types de complexes peuvent être distingués :

- Les complexes simples dans lesquels chaque coordinat est lié à l'ion central par une unique liaison de coordination.
- Les chélates ou complexes internes. Dans ce cas, le coordinat est lié au métal par plusieurs liaisons de coordination.

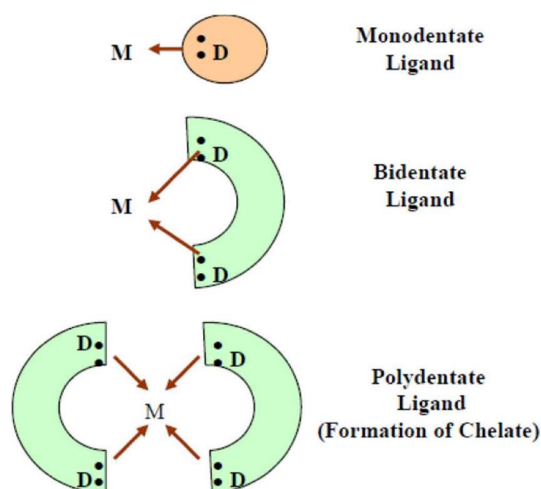


Figure 25 : Schéma représentatif d'un complexe métal ligand (54)

II.4.3.2 La nomenclature

L'union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) a décidé de l'utilisation des règles de nomenclatures suivantes(53) :

Dans les formules, le nom du métal central est placé en premier suivi par les ligands. Le tout doit être écrit entre crochet.

Les ligands anioniques prennent la terminaison « o ». Certains ligands ont des noms particuliers comme « *aqua* » pour l'eau, « *amine* » pour le NH_3 , « nitrosyl » pour le NO ou « *carbonyl* » pour le CO.

La dénomination du complexe dépend aussi de sa charge, on retrouve :

En cas de charge négative : nom du ligand + nom du métal + suffixe "ATE" + charge du métal (Ex : $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$: hexacyano ferrate II).

En cas de charge positive : nom du ligand + nom du métal + charge du métal (Ex : $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$: tétrammine cuivre II).

En cas de charge neutre : nom du ligand + nom du métal (Ex : $[\text{Fe}(\text{CO})_5]$: fer pentacarbonyle).

II.5.3.4 Les complexes en solution aqueuse

Les réactions de complexation sont des réactions réversibles, en solution aqueuse, la réaction de complexation est une réaction d'échange de ligands entre le donneur ML_n et l'accepteur M comme

lors d'une réaction acido-basique ou dans ce cas des protons sont échangés entre acide et base).
Les réactions de complexation peuvent être décrites de la façon suivante (53) :



Donneur de ligand \leftrightarrow accepteur de ligand + n ligand

Dans les complexes, sont définis la constante de complexation K_c (aussi appelée constante de dissociation) et son cologarithme le pK_c .

$$K_c = \frac{[M][L]^n}{[ML_n]} \quad pK_c = -\log K_c$$

Plus la valeur du pK_c est importante plus la réaction se fait dans le sens de la formation du complexe ML et moins le complexe se dissocie et donc plus celui-ci est stable.

II.5.3.4.1 L'impact du pH dans la stabilité des complexes

Du fait des propriétés acido-basiques de certains ligands, spécialement les agents chélateurs, les réactions de complexation sont sensibles à la variation de pH. La stabilité des chélates peut être influencée par le pH.

L'influence du pH sur la stabilité du complexe peut être évaluée par la détermination de la constante apparente de complexation K_c' et son cologarithme le pK_c' (figure 26). Cette constante apparente de complexation tient compte de la concentration en proton et du pK_a du ligand.

Elle est déterminée par la formule suivante :

$$K_c' = K_c \cdot (1 + ([H^+] / K_a)) \quad pK_c' = pK_c - \log(1 + ([H^+] / K_a))$$

Grâce à cette formule, trois cas de figure sont envisageables :

$pH < pK_a - 1$ alors on a $pK_c' = pK_c + pH - pK_a$, plus le pH sera faible plus la valeur du pK_c' sera diminuée. La stabilité du complexe sera impactée négativement.

$pH > pK_a + 1$ alors on a $pK_c' = pK_c$, le pH n'aura aucune influence sur la stabilité du complexe.

$$pK_a - 1 < pH < pK_a + 1 \text{ alors } pK_c' = pK_c - \log(1 + ([H^+] / K_a))$$

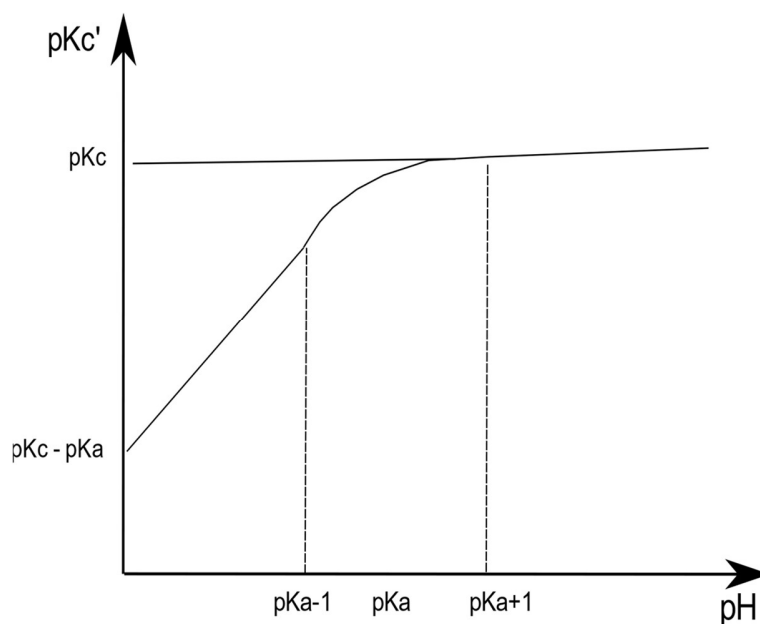


Figure 26 : Graphique $pKc'=f(pH)$ (53)

Pour résumer, afin d'éviter toute influence du pH sur la stabilité du complexe, il est préférable de se positionner à un pH au moins supérieur d'une unité à la valeur du pKa du ligand.

Nous allons voir maintenant les différentes techniques utilisables pour la conjugaison des groupements fonctionnels (chélateur ou molécules contenant le radioélément) dans le cadre du processus de radiomarquage indirect.

II.5 Les méthodes de couplage des groupements fonctionnels aux nanobodies

Selon l'utilisation des nanobodies en médecine nucléaire (diagnostique TEP/TEMP, radiothérapies internes vectorisées), le radionucléide le plus adapté sera choisi. À partir de cette sélection, la méthode de radiomarquage la plus adaptée sera aussi sélectionnée. La conjugaison du groupement fonctionnel pourra se faire par différentes méthodes. Ainsi, convient-il d'étudier successivement les différentes méthodes de conjugaison par voie chimique, enzymatique et chimio enzymatique.

II.5.1 Conjugaison par voie enzymatique

Les processus de conjugaison enzymatique permettent généralement la conjugaison site spécifique d'un groupement fonctionnel sur les nanobodies. Cela permet une conjugaison homogène et

reproductible des nanobodies. De cette façon, il est possible de conjuguer les nanobodies en modérant l'impact du groupement fonctionnel sur l'affinité pour l'antigène.

II.5.1.1 Conjugaison via transglutaminase

Les transglutaminases sont une famille d'enzymes capables de catalyser la formation de ponts isopeptidiques entre les groupements g-carbonyl amide des glutamines et les groupements amines des lysines. Sur le nanobody, l'ajout d'un tag C-myc (EQKLISEEDL) en c-terminal contenant un résidu glutamine/lysine permet, en principe, la fixation en C-terminal de la sonde d'intérêt. L'inconvénient avec cette approche c'est qu'il peut arriver que des lysines autres que celles localisées dans le tag c-myc soit conjuguées. Cela peut avoir pour inconvénient d'entraîner une conjugaison hétérogène du nanobody et d'altérer le binding pour l'antigène (figure 27) (55).

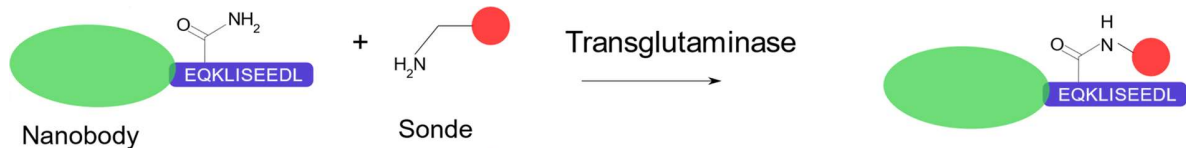


Figure 27 : Conjugaison site spécifique d'une sonde sur un nanobody via une transglutaminase.

II.5.1.2 Conjugaison par la sortase A

La sortase A est une transpeptidase isolée à partir de staphylococcus aureus. Elle est capable de reconnaître un tag « *sortag* » (LPXTG), de cliver entre la thréonine et la glycine afin d'ajouter un groupement enrichi en glycine qui, dans ce cas, sera conjugué à un chélateur. Dans les nanobodies, son positionnement en C-terminal juste avant un tag 6his, permet une conjugaison site spécifique de la sonde avec une sonde par tag et donc par nanobody. Ce positionnement permet d'éliminer le tag 6his du nanobody couplé. Par la suite, cela permettra d'éliminer par chromatographie d'affinité les nanobodies non-conjugués durant le processus. La perte du tag 6his des nanobodies conjugués présente, en plus, l'avantage de limiter la rétention rénale in-vivo. Le tag 6his étant connu comme impliqué dans ce phénomène de rétention (figure 28) (56).

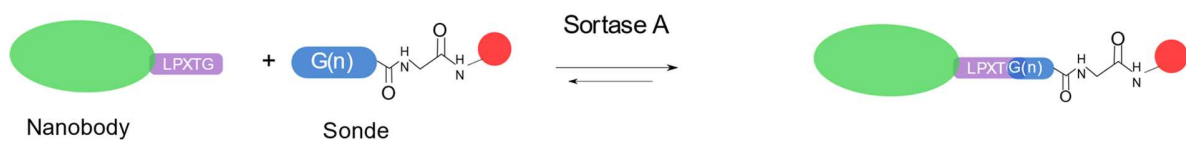


Figure 28 : Conjugaison site spécifique d'un nanobody via la sortase A.

II.5.2 Les couplages chimio-enzymatiques

Ces méthodes de couplage combinent une conjugaison des nanobodies qui requiert une première étape de couplage d'un groupement fonctionnel par voie enzymatique puis une seconde étape de couplage sur le groupement fixé par voie chimique. Parmi ces méthodes de couplage, peuvent être cités les exemples de l'acide lipoïque ligase et de la tubuline tyrosine ligase.

II.5.2.1 Conjugaison par l'acide lipoïque ligase (LpIA)

Cette LpIA reconnaît un peptide tag de 13 acides aminés appelé peptide accepteur d'acide lipoïque (LAP, GFEIDKVWYDKADA) et lie un acide lipoïque sur la chaîne latérale de ce peptide au niveau des résidus lysines. Des variants mutés au niveau du site catalytique de cette enzyme ont été générés pour permettre la fixation sur le LAP d'un groupement chimique d'intérêt fonctionnalisé différent de l'acide lipoïque. Une seconde étape permettant la fonctionnalisation du nanobody par le couplage d'une sonde sur ce groupement pourra être réalisée par réaction chimique (figure 29)(57).

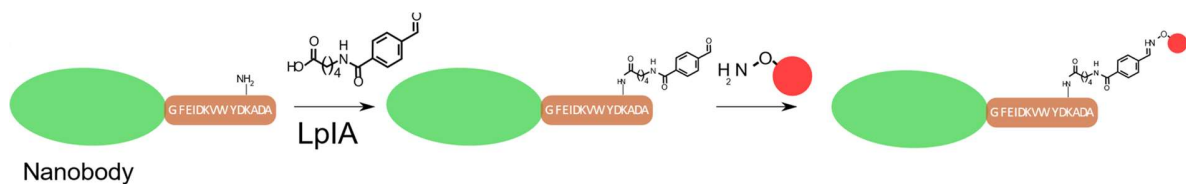


Figure 29 : Conjugaison site spécifique d'un nanobody par la LpIA

II.5.2.2 Conjugaison via la tubuline tyrosine ligase (TTL)

Cette enzyme est capable de reconnaître un tub-tag spécifique de 14 acides aminés (Tub-tag, VDSVEGEGEEEGEE). Cette enzyme fonctionne avec de l'ATP, elle est capable de fixer sur ce tag un dérivé tyrosine fonctionnalisée pouvant comporter des groupements azides, aldéhydes ou encore iodures. Cela va permettre le couplage d'une sonde d'intérêt comme une sonde par une réaction chimique sur cette tyrosine fonctionnalisée fixée aux nanobodies. Le site catalytique de cette enzyme formant une cavité assez large, cela permet en plus l'utilisation d'une plus grande diversité de substrats qui ont permis la fixation de conjugués fonctionnels en une seule étape. Il est donc envisageable de conjuguer des molécules directement radioactives sur le nanobody, le rendant ainsi directement fonctionnel (figure 30)(58).

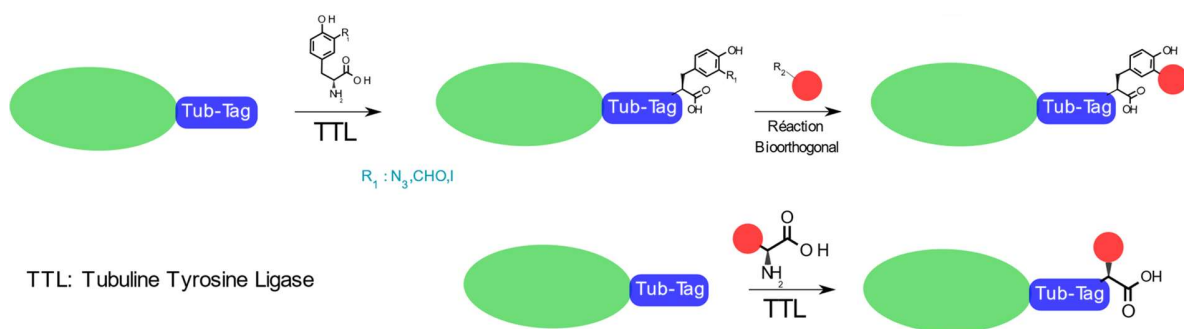


Figure 30 : Conjugaison site spécifique via la tubuline tyrosine ligase.

II.5.3 Conjugaison par voie chimique

La conjugaison via des méthodes chimiques, comme l'acylation des aminés ou encore l'alkylation des groupements thiol sur les cystéines reste encore largement utilisée. Cette façon de faire présente tout de même de nombreux inconvénients. L'absence de spécificité des sites de conjugaison donne lieu à une conjugaison hétérogène des nanobodies et pose des problèmes de reproductibilité. La conjugaison au niveau de sites proches des CDR peut aboutir à une perte d'affinité et/ou de spécificité dans la reconnaissance de l'antigène par le nanobody.

II.5.3.1 Conjugaison via NHS-Ester

Cette technique consiste généralement à fonctionnaliser les résidus lysines avec des groupement (NHS) N-Hydroxysuccimide ester couplés à la sonde d'intérêt. La non-spécificité de cette technique conduit à la fonctionnalisation de lysine située à proximité des CDR. Cela peut entraîner une réduction significative des propriétés de reconnaissance de l'épitope par le nanobody. Cependant, il est possible de contourner cette problématique par ajout d'une polylysine en C-terminal. Ce groupement polylysine oriente favorablement la conjugaison au niveau C-terminal au détriment des autres sites Lysines (figure 31)(58).

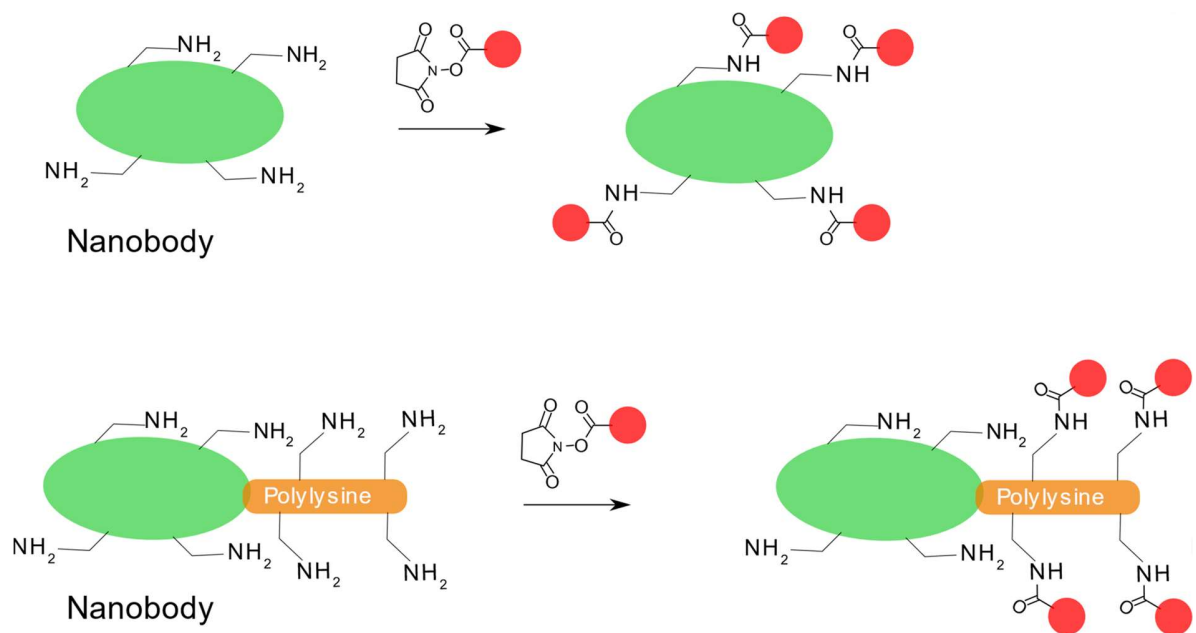


Figure 31 : Marquage de nanobody par voie chimique via conjugaison au niveau des lysines.

II.5.3.2 Conjugaison via pont disulfure entre cystéines

Cette technique consiste à fonctionnaliser les groupements thiols réduits présents sur les cystéines libres avec une sonde cystéine sélective. L'avantage de cette méthode est que le nombre de cystéines libres étant moins important que les lysines cela limite le risque de conjugaison aléatoire et améliore l'homogénéité de la conjugaison des nanobodies. L'un des problèmes réside dans le fait que les cystéines sont souvent impliquées dans la formation de ponts disulfures limitant le nombre de cystéines libres et que les nanobodies n'ont pas de cystéine libre. Pour pallier ce problème, il est possible d'ajouter une cystéine libre en C-terminal. Cela permettra là encore une conjugaison site spécifique de la sonde d'intérêt (figure 32)(59).

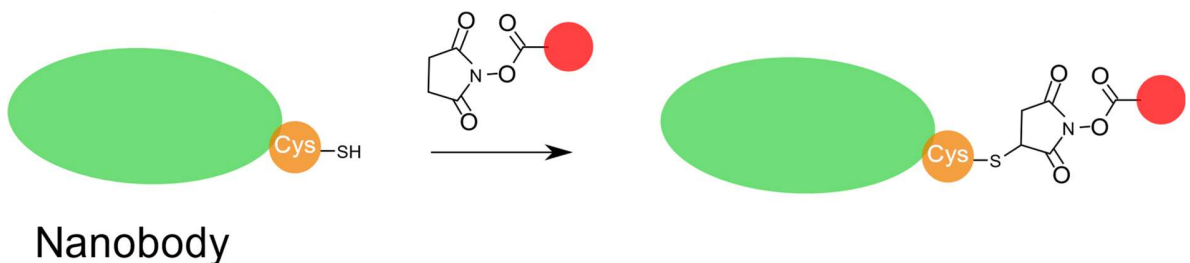


Figure 32 : Attachement d'une sonde sur un nanobody de façon cystéine sélective.

La purification post couplage est aussi relativement simple. Une chromatographie d'affinité pour éliminer l'enzyme en cas de couplage enzymatique, une chromatographie d'exclusion suffit à purifier le nanobody en éliminant l'excès de sonde non conjugué.

Dans le cas où le groupement serait un chélateur, il est important de veiller à une élimination complète du chélateur non conjugué. Il arrive que certains chélateurs libres aient une affinité pour le radiométal bien plus importante que lorsqu'ils sont conjugués. Cela peut avoir pour conséquence l'impossibilité du radiomarquage par un phénomène de compétition entre le chélateur conjugué et le chélateur libre. Durant le processus de purification il est également important d'éviter toute utilisation de métaux notamment en faisant attention aux résines de cobalt ou de nickel fréquemment utilisées en chromatographie d'affinité. Cela peut avoir pour conséquence une chélation de ces métaux par les chélateurs sur les nanobodies conjugués. Là aussi, cela peut avoir pour conséquence un mauvais rendement de radiomarquage par un phénomène de compétition mais cette fois-ci entre le radiométal contenu et le métal contaminant.

II.6 Les nanobodies radiopharmaceutiques idéals pour la médecine nucléaire

II.6.1 Les nanobodies agents de diagnostic via TEP/TEMP en cancérologie

En cancérologie, un nombre important de nanobodies se trouve en phase d'essai pré-clinique et clinique pour des applications de diagnostic scintigraphique (tableau 5).

Dans le tableau, on observe que les antigènes tumoraux ciblés par les nanobodies aux stades de développement les plus avancés sont des antigènes où il existe déjà des thérapies ciblées. On a par exemple déjà des thérapies ciblées dirigées contre le récepteur Her 2 avec le trastuzumab et le récepteur PD1 avec le nivolumab ou le pembrolizumab et malgré cela, ce sont ces 2 antigènes qui concentrent l'ensemble des nanobodies actuellement en essais cliniques pour le diagnostic scintigraphique en oncologie. Les thérapies ciblées dirigées contre ces antigènes ayant largement fait leur preuve en clinique. Les équipes de recherche ou les entreprises de biotechnologies souhaitent certainement optimiser leurs chances de réussite aux essais cliniques. Cette vision des choses les a probablement conduits à prendre un minimum de risque en développant des thérapies dirigées contre ces antigènes.

Target	Agent	Reactivity	Clinical Trials: Stage and Status (If Applicable)
EGFR	99mTc-8B6	Human	Preclinical
	99mTc-7C12	Human	Preclinical
HER2	177Lu-2Rs15dHIS	Human	Preclinical
	18F-FB-2Rs15d	Murine	Preclinical
	18F-RL-I-5F7	Murine	Preclinical
	68Ga-2Rs15d	Human	Clinical
	99mTc-NM-02	Human	Clinical
HER3	89Zr-MSB0010853	Murine	Preclinical
CEA	99mTc-NbCEA5	Human	Preclinical
PSMA	111In-JVZ007	Human	Preclinical
HGF	89Zr-1E2, ⁸⁹ Zr-6E10	Human	Preclinical
CD20	68Ga-9079	Human	Preclinical
CD38	68Ga-NOTA-Nb1053	Murine	Preclinical
Mesothelin	99mTc-A1, ^{99m} Tc-C6	Human	Preclinical
MHC II	[¹⁸ F]FDG -VHH7	Murine	Preclinical
	64Cu- VHH4	Human	Preclinical
CD11b	89Zr-VHHDC13 (PEGylated)	Murine	Preclinical
	18F-VHHDC13	Human	Preclinical
CD8	89Zr-VHH-X118 (PEGylated)	Murine	Preclinical
	68Ga-NOTA-SNA006	Human	Preclinical
Mouse Dendritic	99mTc-Nb-DC2.1	Murine	Preclinical

Cells	99mTc-Nb-DC1.8	Murine	Preclinical
PD-L1	18F-B3, 18F-A12, 64Cu-B3	Murine	Preclinical
	99mTc-C3, 99mTc-C7, 99mTc-E2, 99mTc-E4, 99mTc-K2	Murine	Preclinical
	68Ga-NOTA-Nb109	Human	Preclinical
	99mTc-NM-01	Human	Clinical, NCT02978196 (Concluded)
	89Zr-envafolimab (Fc fusion)	Human	Clinical, NCT03638804 (Active)
CTLA-4	18F-H11, 89Zr-H11	Murine	Preclinical
LAG-3	99mTc-anti-moLAG-3 3206, 99mTc-anti-moLAG-3 3208,	Murine	Preclinical
	99mTc-anti-moLAG-3 3132, 99mTc-anti-moLAG-3 3141		
FN-EIIIB (ECM)	64 Cu-NJB2	Human, Murine	Preclinical
Vsig4	99m Tc-NbV4	Murine	Preclinical
Clec4F (KC)	99m Tc-NbC4	Murine	Preclinical

Tableau 5 : Nanobodies en développement clinique et préclinique en imagerie TEP/TEMP en cancérologie (60).

II.6.1.2 Exemple de nanobodies en développement

II.6.1.2.1 En préclinique

Le nanobody ^{99m}Tc -7C12 ciblant l'antigène tumoral EGFR retrouvé dans des cancers variés, a montré une accumulation spécifique au niveau tumoral chez des souris xéno greffes en sous cutané de tumeur EGFR positive. Les données obtenues avec l'imagerie TEMP prouvent qu'il est possible d'obtenir, une heure après l'injection du traceur, des images dont la résolution est suffisante pour permettre une interprétation avec une faible marge d'erreur. Sur les images, une accumulation spécifique peut être observée chez les souris greffées avec les tumeurs A431 EGFR positives tandis qu'aucun signal n'est visible dans les tumeurs des souris greffées avec la lignée R1M EGFR négative confirmant la spécificité du signal (61).

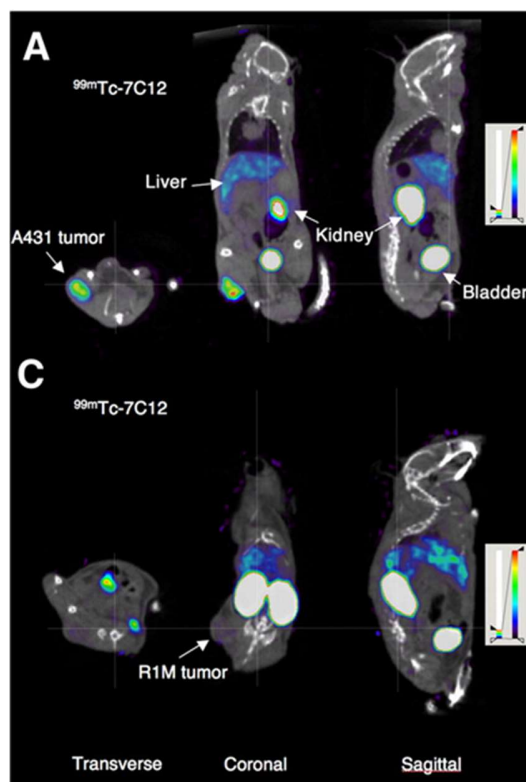


Figure 33 : Essais in-vivo du ^{99m}Tc -7C12 pour le diagnostic de tumeur EGFR positive via TEMP

Vues transversale, coronale et sagittale d'images TEMP et micro-CT fusionnées de souris portant des xéno greffes A431 et R1M. Tumeurs A431 (A) et R1M (C) injectées avec ^{99m}Tc -7C12. Les images ont été acquises 1 heure après l'injection. L'échelle de couleur NIH+blanc est utilisée, et les images sont également réduites à 10% par rapport à l'activité maximale de l'image (61).

III.6.1.2.2 En clinique

Un premier essai clinique de phase I utilisant un nanobody anti-Her 2 (2RS-15d) couplé au gallium 68 pour évaluer l'expression du Her 2 dans le cancer du sein via TEP a été réalisé chez des patientes

atteintes de cancer du sein (figure 34 et 35). L'essai a permis d'évaluer la tolérance qui s'est avérée être excellente puisqu'aucun effet secondaire consécutif à l'injection du traceur n'a été observé. La biodistribution du nanobody montre une accumulation au niveau rénal, hépatique et intestinal. Un très faible bruit de fond est mesuré dans les organes hébergeant habituellement les tumeurs. Un signal variable selon les patients est mesuré au niveau des tumeurs primaires et des sites métastatiques exprimant Her 2. Le niveau d'irradiation global du patient reste acceptable et est comparable avec ceux obtenus habituellement en routine lors d'examens TEP. Ce ^{68}Ga -2Rs15d a démontré sa capacité à être utilisé sans risque d'effet secondaire grave en routine pour le diagnostic cancer du sein Her 2 (62).

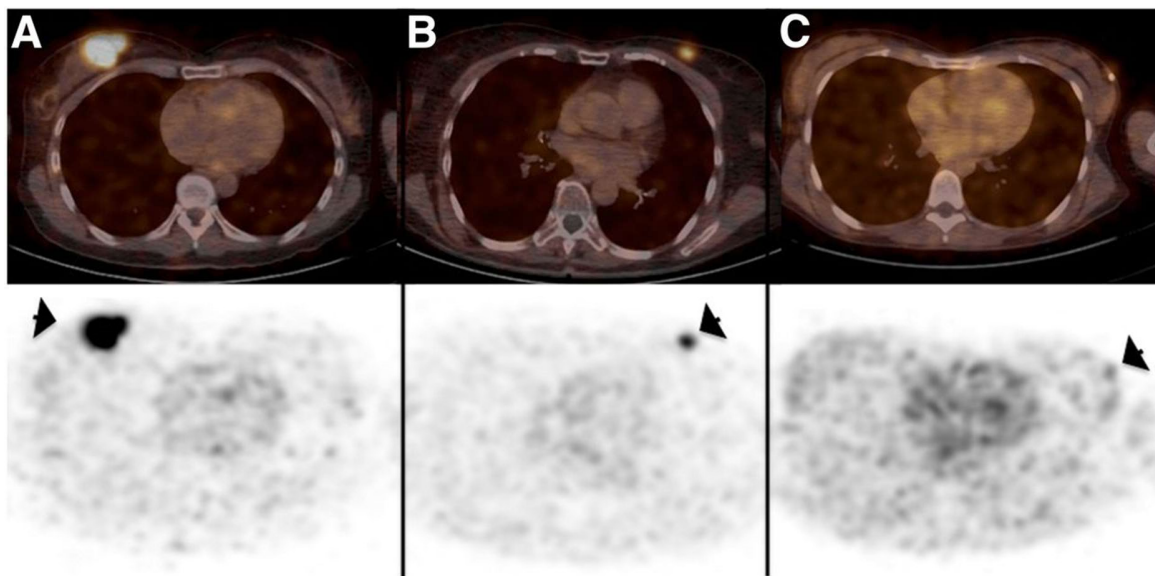


Figure 34 : Fixation tumorale du ^{68}Ga -Her2-Nanobody chez des patientes atteintes de cancer du sein (62).

A) La patiente 14 présente la plus forte absorption de traceur.

B) La patiente 15 a montré une absorption modérée du traceur.

C) Le patient 6 n'a montré aucune absorption, le CT montrant un point de marqueur dans la région de la tumeur.

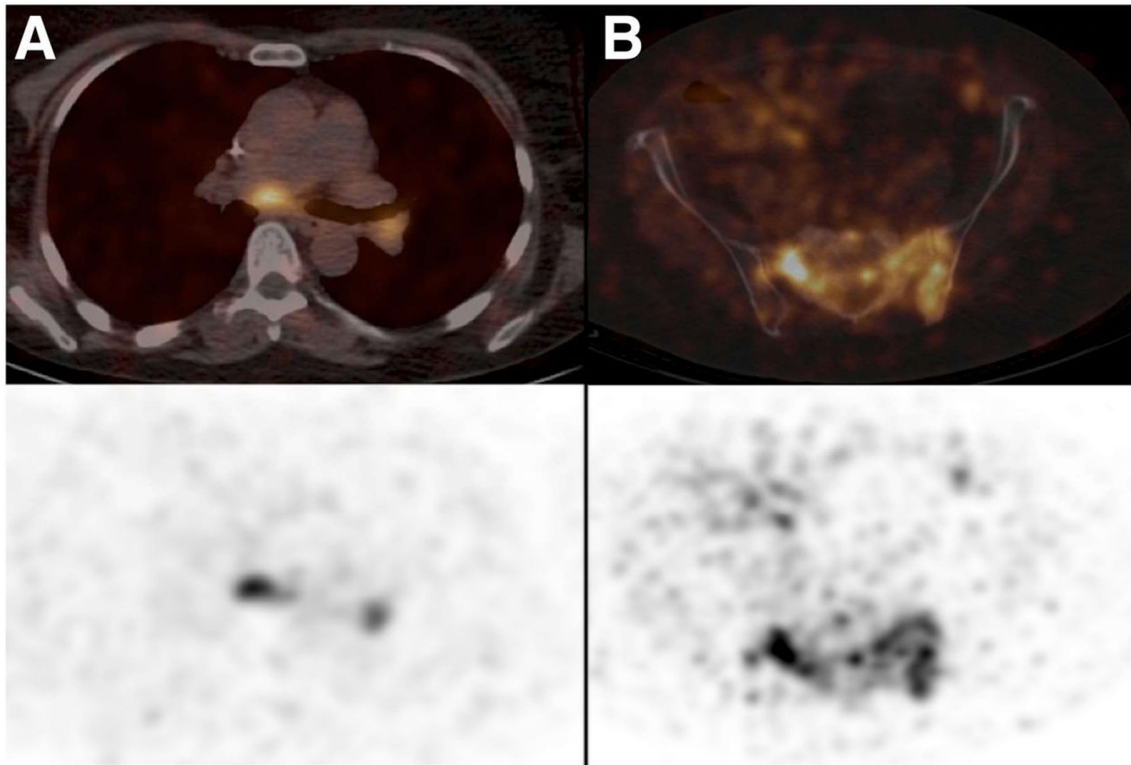


Figure 35 : Captage du ^{68}Ga -Her2-Nanobody dans les lésions métastatiques (62).

A) Patient 18, avec des ganglions lymphatiques envahis dans le médiastin et la région hilare gauche. B) Patient 20, avec des métastases osseuses dans le pelvis.

Un autre nanobody anti-Her 2 couplé au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NM-02) a été développé et a fait l'objet d'études cliniques (figure 36). Ce radiotracer a été utilisé chez des patientes atteintes de cancer du sein dans le but d'évaluer sa biodistribution, sa sécurité d'utilisation et son potentiel en tant qu'agent pour le diagnostic non-invasif de tumeur du sein via TEMP. Les résultats ont démontré une bonne tolérance du nanobody sans effet secondaire détecté après l'injection du radiotracer. La biodistribution a montré une accumulation au niveau rénal, hépatique, et partielle au niveau de la rate, des intestins et de la thyroïde. Des signaux spécifiques ont été observés au niveau des tumeurs primaires et des sites métastatiques résultant d'une accumulation tumorale spécifique du traceur. L'étude a conclu que l'utilisation de ce traceur pouvait constituer une alternative crédible à la biopsie pour l'évaluation du statut Her 2 des patients atteints de cancer du sein (63).

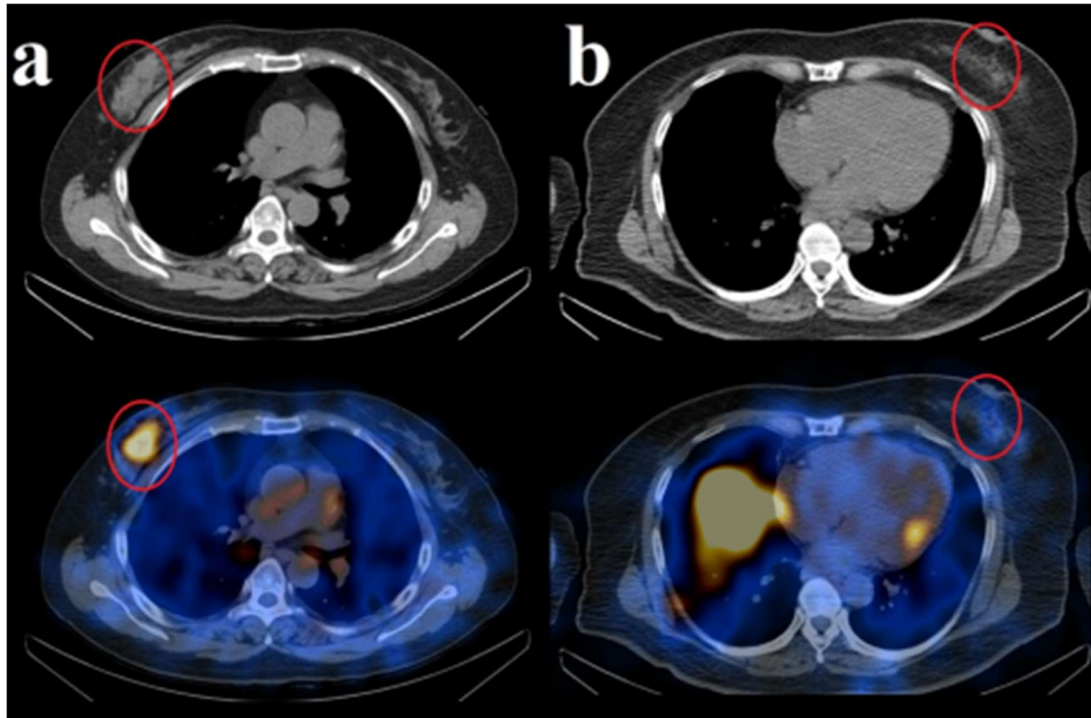


Figure 36 : Biodistribution du ^{99m}Tc -NM-02 chez des patients atteints de cancer du sein via TEMP (63).

A) Patient atteint de cancer Her 2 3+.

B) Patient atteint de cancer Her 2 low.

Un autre essai clinique de phase I utilisant un nanobody ciblant le ligand PDL1 du récepteur immune checkpoints PD1, couplé au ^{99m}Tc (^{99m}Tc -NM01) pour de l'imagerie en TEMP a été réalisé (figure 37 et 38). Le but de l'étude a été d'évaluer sa tolérance, le niveau d'irradiation et d'établir une corrélation entre le niveau d'expression de PDL1 mesuré par immunohistochimie et celui détecté avec l'imagerie TEMP pour les cancers du poumon à petites cellules. Les résultats ont établi une excellente tolérance du traceur. Aucun effet secondaire n'a été détecté et l'irradiation globale du patient était acceptable. La biodistribution du radiotracer révèle une accumulation au niveau des reins, du foie, la rate et de la moelle osseuse. Les données ont montré une accumulation spécifique dans les tumeurs PDL-1 avec un ratio de signal tumeur sur pool sanguin optimal obtenu deux heures après injection. L'intensité du signal tumoral obtenu via TEMP a pu être corrélée avec le niveau d'expression de PDL-1 évalué par immunohistochimie. Ces résultats préliminaires démontrent tous l'intérêt de l'utilisation de ce traceur dans le diagnostic et l'évaluation du statut PDL-1 des tumeurs (64).

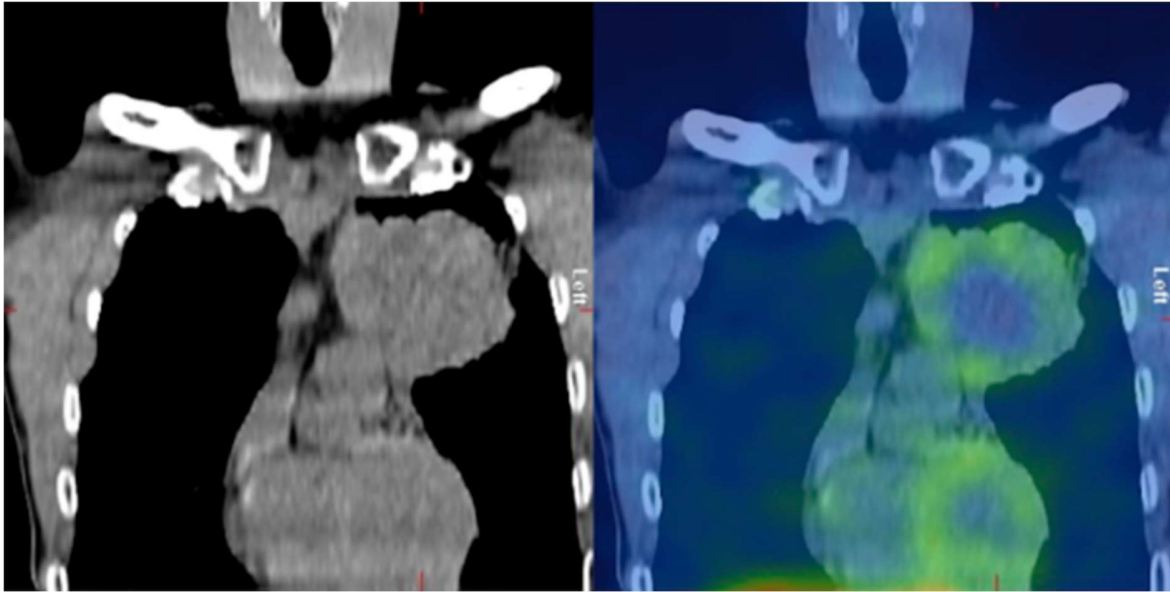


Figure 37 : Étude de l'expression de PDL-1 via le nanobody $^{99m}\text{Tc-NM-01}$ chez un patient atteint d'un cancer du poumon (64).

Tumeur du lobe supérieur gauche montrant une hétérogénéité de l'expression de PD-L1. Hétérogénéité de la captation dans la composante périphérique solide de la tumeur.

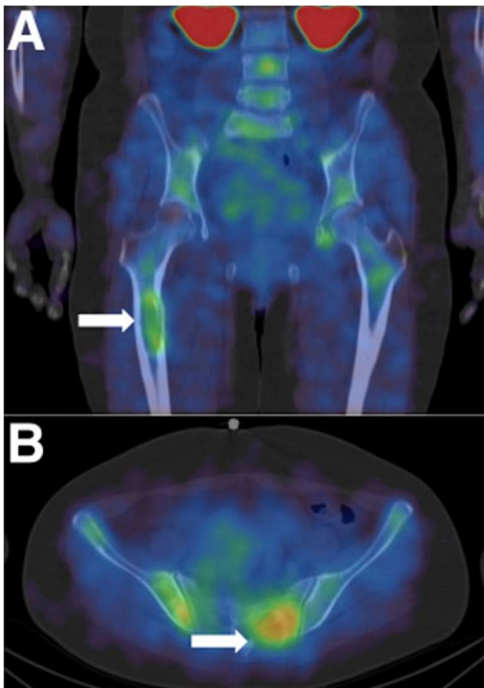


Figure 38 : Diagnostic et cartographie des métastases osseuses exprimant PDL1 via le $^{99m}\text{Tc-NM-01}$ (64).

Images TEMP/CT coronales (A) et axiales (B) au $^{99m}\text{Tc-NM-01}$ d'un patient présentant des métastases squelettiques (flèches) démontrant l'expression de PD-L1.

L'utilisation des nanobodies en imagerie pour le diagnostic de cancers avec l'imagerie en est à ses balbutiements. À ce jour, les nanobodies les plus avancés en clinique ciblent des antigènes disposant de thérapies ciblées ayant déjà fait leurs preuves en termes d'efficacité clinique comme Her 2 avec le trastuzumab ou PDL1 avec les anti-

PD1/PDL1. Il est aussi possible d'observer une grande diversité des antigènes tumoraux faisant l'objet d'un développement de nanobodies en stade préclinique et dont le résultat préliminaire semble assez prometteur.

II.7 Les nanobodies en radio immunothérapie

En RIT, les nanobodies n'ont pas encore atteints le stade des essais cliniques. Cependant, les premières données précliniques issues d'expérimentations animales semblent très encourageantes.

Il y a, par exemple, le nanobody 2-RS-15d anti-her2 qui fait actuellement l'objet d'essais cliniques en diagnostic pet-scan de tumeur du sein Her 2 positive. Ce nanobody, a également fait l'objet d'essais précliniques sur l'animal pour de la radio immunothérapie. Il a été conjugué au lutétium 177 et a été utilisé avec des modèles de souris xéno greffes avec une lignée de cancer du sein skov 3. L'étude a montré que ce nanobody est capable d'empêcher la croissance tumorale au sein des souris traitées avec celui-ci comparativement au groupe contrôle composé d'un nanobody irrelevante couplé au lutétium 177 et du second groupe contrôle ayant fait l'objet d'une injection de PBS (65). Les résultats ont pu montrer une amélioration de la survie chez les souris traitées et un volume tumoral qui n'augmentait pas chez ces-mêmes souris.

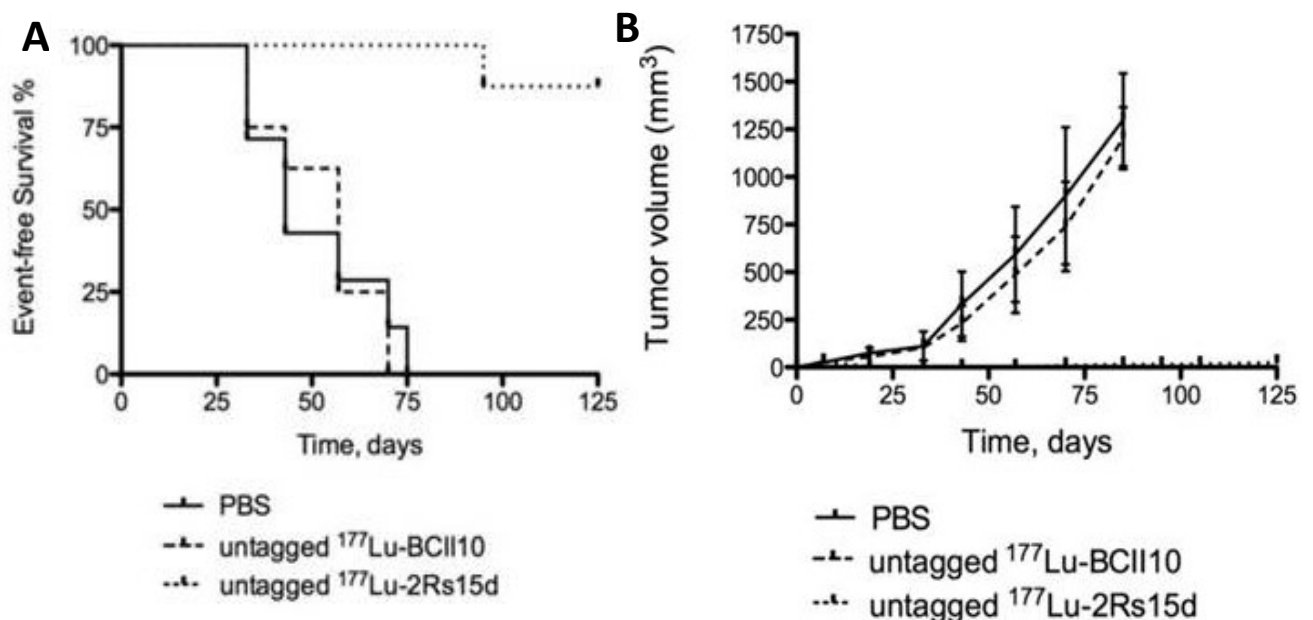


Figure 39 : RIT via le ^{177}Lu -2Rs15d (65).

A. Survie sans événement pendant la thérapie ciblée par radionucléides. Les événements sont définis comme suit : 1. mortalité ; 2. perte de poids > 20 % ; 3. ulcération du tissu tumoral ; 4. volume tumoral > 250 mm³. Les animaux (n=8 par groupe) ont été traités par une injection hebdomadaire de 2Rs15d non marqué au ¹⁷⁷Lu (20,7 ± 0,4 MBq) et dans les groupes témoins par du PBS ou du BCII10 marqué au ¹⁷⁷Lu (19,3 ± 0,8 MBq). Tous les traitements ont été effectués avec une co-injection de 150 mg/kg de Gelofusin.

B. Mesures du calibre (mm³), en fonction du temps (jours).

Un autre nanobody spécifique du CD20 le ¹⁷⁷Lu-DTAP-Sdab 9079 a été radiocouplé au ¹⁷⁷Lu pour évaluer son efficacité potentielle dans la prise en charge du lymphome non hodgkinien. Une étude sur souris a été menée, durant ces travaux le nanobody anti-CD20 a été comparé au rituximab couplé au ¹⁷⁷Lu et à un nanobody control négatif non spécifique du CD20 le ¹⁷⁷Lu-DTPA-ctrl (figure 40). Le rituximab est un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20, il est déjà indiqué dans le traitement du lymphome non hodgkinien. Cette étude a mis en évidence une différence significative de la survie médiane entre les souris traitées par ¹⁷⁷Lu-DTPA-sdAb 9079 et PBS ou ¹⁷⁷Lu-DTPA-ctrl en faveur du ¹⁷⁷Lu-DTPA-sdAb 9079. Ce nanobody arrive également à égaler le rituximab avec un effet similaire sur la croissance tumorale de ce-dernier, qu'il soit conjugué au ¹⁷⁷Lu ou pas. Le nanobody présente en plus une exposition des tissus/organes sains, hormis les reins, bien moins importante que ce qui est observé avec le rituximab (figure 40A). Ces données sont à mettre en corrélation avec la demi-vie plasmatique de anticorps monoclonaux bien plus longue que celle des nanobodies, cela permet d'anticiper des effets secondaires moins importants avec le nanobody pour un effet thérapeutique similaire (66).

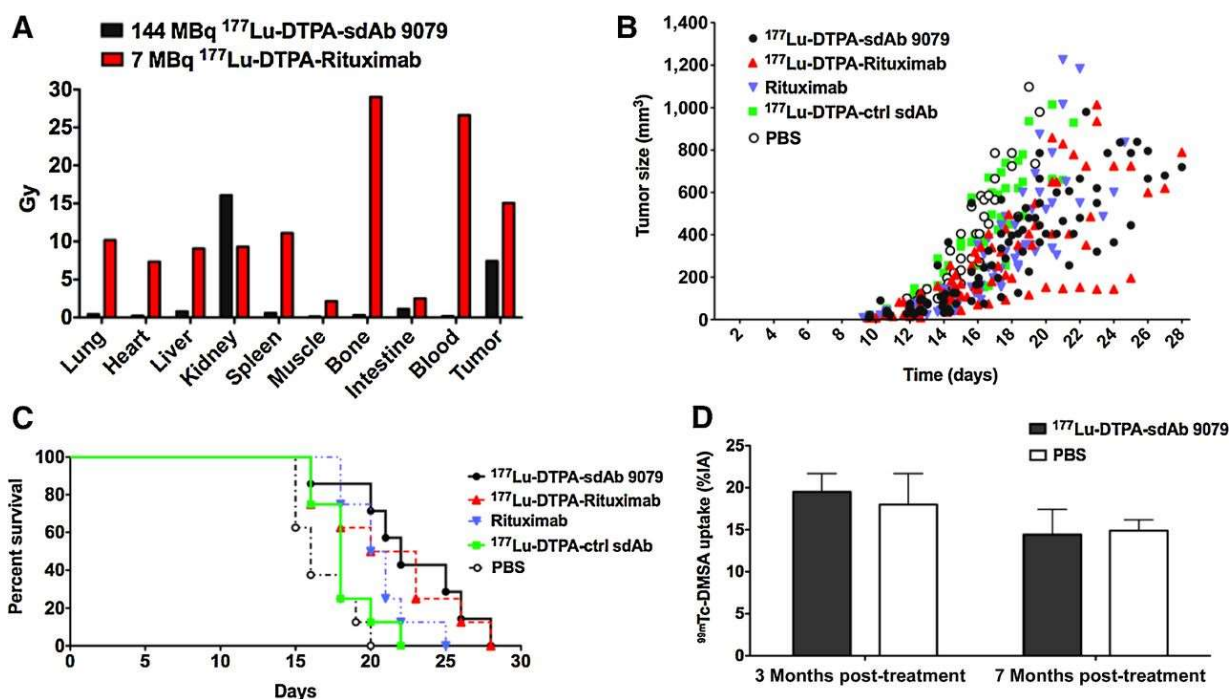


Figure 40 : Efficacité thérapeutique de ^{177}Lu -DTPA-sdAb 9079 chez des souris porteuses de tumeurs CD20pos (66).

A. Dosimétrie après une injection thérapeutique de ^{177}Lu -DTPA-rituximab ou de ^{177}Lu -DTPA-sdAb 9079 en co-injection avec 150 mg/kg de gefosine. **B.** Pour évaluer l'efficacité thérapeutique de ^{177}Lu -DTPA-sdAb 9079, des souris ont été inoculées avec des cellules B16 hCD20pos. Les souris portant des tumeurs hCD20pos palpables (jour 8) ont été divisées en cinq groupes. Quatre groupes de souris ont reçu quatre injections i.v. de ^{177}Lu -DTPA-sdAb 9079 (dose radioactive cumulative totale de $144 \pm 1,8$ MBq), de ^{177}Lu -DTPA-ctrl sdAb ($135 \pm 2,74$ MBq), de rituximab ($200 \mu\text{g}/\text{injection}$) ou de PBS ($200 \mu\text{L}/\text{injection}$) les jours 8, 10, 12 et 14. Un groupe a reçu une injection i.v. de ^{177}Lu -DTPA-rituximab ($7,0 \pm 1,48$ MBq) le jour 8. **C.** Courbes de survie de Kaplan-Meier. **D.** Aucune différence significative dans la captation rénale du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA n'a été observée entre les souris traitées par PBS et ^{177}Lu -DTPA-sdAb 9079.

Les résultats de ces essais de RIT ouvrent des perspectives très encourageantes pour leurs utilisations cliniques.

III. Discussion et conclusions

Avec l'émergence de la médecine personnalisée et des thérapies ciblées, les nanobodies avec leurs diffusions intratissulaires et leurs spécificités de reconnaissance des antigènes tumoraux, permettent de solutionner certains problèmes rencontrés avec les autres thérapies, comme le

manque de spécificité responsables d'effets secondaires avec les chimiothérapies ou encore la trop longue demi-vie des anticorps monoclonaux qui peut poser des problèmes en médecine nucléaire. Certains nanobodies sont même capables de franchir la barrière hématoencéphalique laissant entrevoir la possibilité de développer des thérapies ciblées pour traiter des tumeurs cérébrales ou d'autres affections neurologiques.

La courte demi-vie des nanobodies dans le sang, en moyenne une dizaine de minutes, rend leur utilisation très intéressante pour diagnostiquer des tumeurs avec l'imagerie TEP/TEMP. Grâce à cette courte demi-vie, ils sont compatibles avec les radionucléides à courte demi-vie utilisés pour le diagnostic TEP comme le ^{68}Ga . Cette courte demi-vie permet une acquisition d'image très rapide avec l'obtention un ratio signal tumoral sur bruit de fond parfois obtenu en moins de 2h. Grâce à cela, en plus de limiter l'exposition des tissus sains à la radioactivité, il est envisageable de réaliser un examen de scintigraphie avec un nanobody en gardant le patient à l'hôpital seulement 24h. Cette particularité constitue un avantage certains par rapport au anticorps monoclonaux pour leur utilisation en pratique clinique. En effet, une étude réalisée chez l'homme avec un anticorps monoclonal (^{111}In -Amatuximab), a montré qu'il était parfois nécessaire d'attendre jusqu'à 96h avant d'avoir ratio de signal tumeur/bruit de fond permettant une interprétation médicale (67).

Cependant en radiothérapie, la courte demi-vie des nanobodies peut constituer un inconvénient, une élimination trop rapide du médicament radiopharmaceutique peut avoir pour conséquence une sous exposition de la tumeur au rayonnement avec pour risque principale de perdre en efficacité. Pour remédier à ce problème, il est possible d'adapter le schéma posologique avec des injections plus fréquentes. Cependant, la nécessité de devoir préparer des doses supplémentaires peut entraîner une augmentation du coût du traitement et exposer le personnel médical à une dose de radioactivité plus importante. Il est aussi envisageable de tenter de moduler la demi-vie du nanobody par différentes méthodes. Par exemple, en combinant le nanobody avec un second nanobody anti-albumine dont l'affinité pour l'albumine pourra être adaptée à la demi-vie souhaitée. Il est possible de tenter d'alourdir le nanobody par pegylation de façon à augmenter son poids pour qu'il devienne supérieur à la barrière de filtration glomérulaire. Il faut aussi garder à l'esprit que le rallongement de la demi-vie peut entraîner plus d'effets secondaires consécutifs à une exposition à la radioactivité plus longue ainsi qu'une diminution de la diffusion intratumorale. En plus d'agir sur la demi-vie du nanobody, pour tenter d'améliorer les chances de succès en RIT on peut

également envisager de conjuguer le nanobody avec un radionucléide émetteur α pour réaliser de l'alphathérapie. Les particules α sont plus énergétiques que les particules β avec en plus l'avantage d'avoir une pénétration tissulaire plus faible. Ceci peut donc permettre d'améliorer l'efficacité du traitement tout en limitant le risque d'irradiation des tissus sains aux alentours des tumeurs.

Concernant l'élimination rénale des nanobodies, celle-ci peut être responsable d'une néphrotoxicité consécutive à une exposition des reins aux rayonnements. En effet, les études de biodistribution faites pendant les essais précliniques et cliniques ont montré une rétention rénale importante chez l'animal et chez l'homme. Pour y remédier, il est possible d'injecter de façon concomitante de la gélofusine et/ou des acides aminés chargés positivement. Des études ont montré une diminution significative de la rétention rénale des nanobodies lors de leur utilisation concomitante avec de la gélofusine et/ou d'acides aminés chargés positivement (68).

Les nanobodies ayant aujourd'hui atteint le stade de développement clinique en médecine nucléaire en oncologie, le sont pour des applications de diagnostics scintigraphique. Cependant, les premiers essais pré-cliniques chez l'animal de nanobodies pour leur utilisation en RIT ont aboutis à des résultats très prometteurs. Il est donc fort à parier que nous allons assister assez rapidement à un démarrage des premiers essais clinique en RIT utilisant des nanobodies.

En oncologie, pour le diagnostic, les nanobodies peuvent aussi être utilisés avec d'autres techniques d'imagerie médicale comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'échographie ou l'imagerie proche infrarouge. Le nanobody sera couplé avec une sonde adaptée à la technologie utilisée. Cela pourra être des bulles de gaz en échographie, des particules métalliques pour l'IRM ou encore un fluorophore en imagerie proche infrarouge (69)(70)(71). Cette possibilité peut constituer une alternative dans les pays en développement ne disposant souvent pas d'une filière nucléaire permettant de gérer le risque environnemental que peuvent poser les déchets radioactifs.

En dehors de la médecine nucléaire, en oncologie, les nanobodies sont aussi utilisés pour développer différentes stratégies d'immunothérapies (figure 41). Par exemple, certains d'entre eux sont utilisés pour la construction de format bispécifique, dans cette approche, un nanobody cible un antigène tumoral et un autre cible un effecteur immunitaire (LT via CD3, NK via CD16...). Cela permet de créer une synapse immunologique et de rediriger le système immunitaire contre la

tumeur. Il s'agira de BiTe (*Bispécifique T cell engager*), dans le cas où les LT (72) sont redirigés contre la tumeur, ou de NK cell engager dans le cas dans le cadre de la redirection les NK (73). Certains sont utilisés pour la construction des Car-t-cell, où ils vont permettre au CAR-T cell ingénieriez de cibler spécifiquement les tumeurs (74). Les récepteurs checkpoints immunitaires (PDL1/PDA, CTLA-4, LAG3...) peuvent aussi être utilisés comme un modulateur. Des nanobodies sont capables de bloquer l'interaction entre ces récepteurs et leurs ligands afin réactiver le système immunitaire contre les tumeurs (75). Ils peuvent aussi être utilisés pour moduler le système immunitaire par l'adressage de cytokines ou chimiokines au niveau du site tumoral afin d'en modifier l'activité immunitaire. Il est même possible de combiner ces différentes stratégies. Une interleukine chimio attractive sur un nanobody bispécifique ou ciblant PDL-1 peut être conjuguée afin de renforcer la présence du système immunitaire en intratumoral et améliorer l'efficacité du traitement.

De la même façon que peuvent être conjugués ces nanobodies avec des cytokines, il est possible de les conjuguer à des agents de chimiothérapie ou des toxines donnant ainsi lieu à des ADC (*antibody drug conjugated/antibody toxin's conjugate*). En effet, malgré leur monovalence certains sont capables d'entraîner l'internalisation de leurs antigènes après liaison. Cela permet de limiter les effets secondaires importants des chimiothérapies par un adressage plus spécifique au niveau du site tumoral.

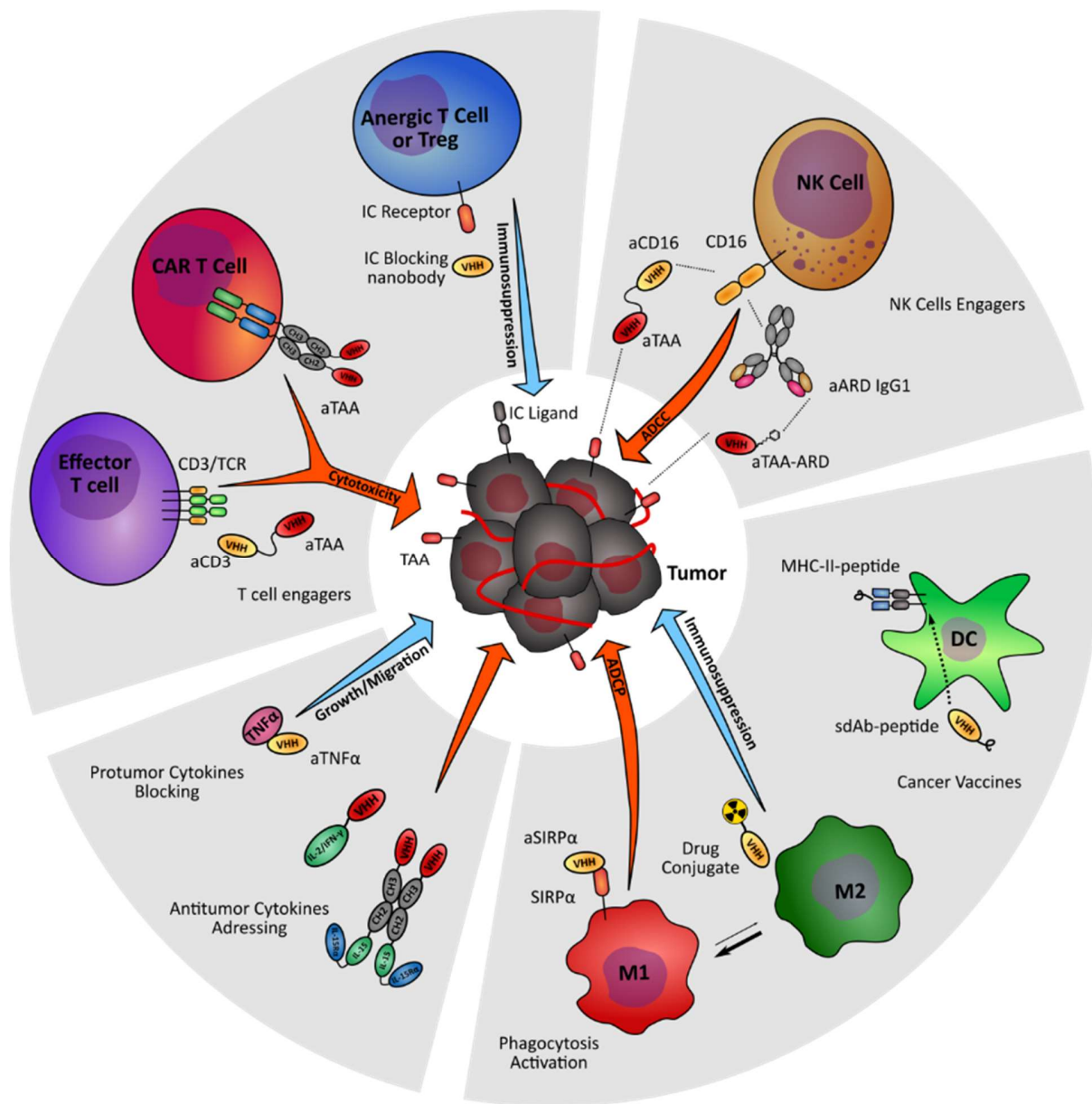


Figure 41 : L'utilisation des nanobodies dans le développement de stratégies thérapeutiques en oncologie (76).

En dehors de la cancérologie, les nanobodies sont utilisables dans d'autres spécialité médicale comme l'immunologie, la cardiologie ou l'hématologie.

D'ailleurs, le premier médicament est actuellement toujours le seul composé d'un nanobody ayant obtenu son AMM n'est pas un anticancéreux. C'est un médicament indiqué dans le traitement de première intention des épisodes de Purpura Thrombotique Thrombocytopénique Acquis. Il s'agit

du caplacizumab (CABLIVI®). Ce médicament a obtenu son AMM le 31 août 2018. Il a été développé par l'entreprise belge, titulaire du brevet sur les nanobodies Ablynx (77).

En médecine nucléaire, certains nanobodies qui ne sont pas destinés à la cancérologie, peuvent être retrouvés. On a par exemple un nanobody dirigé contre la protéine VCAM-1 (protéine impliquée dans le phénomène d'athérosclérose) qui est en cours d'essais cliniques de phase I/II (ATHENA). L'idée est d'utiliser ce nanobody pour aider au diagnostic et à la localisation de plaques d'athérosclérose avec l'imagerie scintigraphique (78,79). En immunologie, un nanobody est en développement pour aider au diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde avec l'imagerie TEMP. Ce nanobody cible le récepteur MMR (*macrophage mannose receptor*). Il a pu montrer une accumulation spécifique au niveau des articulations atteintes sur de modèle animal de souris malades (80).

Les applications possibles que nous venons de voir avec les nanobodies ne leurs sont pas exclusive. En effet, dans cette « niche » thérapeutique et commerciale de la radiothéranostique, les nanobodies vont devoir composer avec la « concurrence » des peptides. Les peptides avec leurs petites tailles, ont des propriétés pharmacocinétique/pharmacodynamique comparable à ces derniers avec l'avantage économique de pouvoir être produit par synthèse chimique.

Une entreprise au Royaume-Uni baptisée Bicycle Therapeutics s'est orienter vers ce créneau (81), cette sociétés est capable de sélectionner et d'isoler des peptides contre un antigène via phage display, tout comme les nanobodies. Cette entreprise développe actuellement des thérapies ciblées en cancérologie basées sur des peptides. Ces peptides, comme les nanobodies, semblent capables de reconnaître un antigène d'intérêt avec une bonne affinité mais présentent une taille au moins 3 fois inférieure. Cette entreprise semble plus orientée vers la réalisation d'ADC et de molécules bispécifiques pour l'immunothérapie anticancéreuse que vers la radioimmunothérapie. Cependant, il est tout à fait envisageable de conjuguer ces peptides avec des radioisotopes pour développer des stratégies de radioimmunothérapie.

D'autant plus que les peptides en radiothéranostique ont déjà fait leurs preuves avec, comme cité plus haut, avec le SOMAKIT et pour diagnostiquer les tumeurs neuroendocriniennes, et le LUTATHERA pour la RIV de ces mêmes tumeurs.

L'avènement de la peptidothérapie avec les premières AMM et ATU obtenus ces dernières années, le succès des phases précoces des premiers essais cliniques des nanobodies en tant que radiopharmaceutiques en cancérologie, laisse entrevoir un grand espoir pour la découverte de nouvelles thérapies ciblées de radiothéranostique pour des cancers qui jusqu'à aujourd'hui, en ont été privés.

En conclusion, les nanobodies sont en train d'émerger au côté des peptides en tant que représentant d'une nouvelle génération de médicament radiopharmaceutique en oncologie.

Références Bibliographiques

1. *Médecine nucléaire* [Internet]. Elsan. 2021 [cité 29 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.elsan.care/fr/patients/medecine-nucleaire>
2. *EUR-Lex - 31989L0594 - FR* [Internet]. Journal officiel n° L 341 du 23/11/1989 p. 0019 - 0029; édition spéciale finnoise: chapitre 6 tome 3 p. 0013 ; édition spéciale suédoise: chapitre 6 tome 3 p. 0013 ; OPOCE; 2021 [cité 29 nov 2021]. Disponible sur : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:31989L0594&from=BG>
3. *Avec les rayons X et la radiologie, Röntgen bouscule le monde | L'Humanité* [Internet]. 2021 [cité 29 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.humanite.fr/avec-les-rayons-x-et-la-radiologie-rontgen-bouscule-le-monde-588964>
4. Myers WG. *Bequerel's Discovery of Radioactivity in 1896*. 17(7):4.
5. Keith S, Doyle JR, Harper C, Mumtaz M, Tarrago O, Wohlers DW, et al. *Overview of basic radiation physics, chemistry and biology* [Internet]. Toxicological Profile for Radon. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); 2012 [cité 15 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK158792/>
6. *Les différents rayonnements ionisants : alpha, beta, gamma...* [Internet]. [cité 15 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/rayonnements-ionisants-effets-radioprotection-sante/effets-rayonnements-ionisants/Pages/2-differents-rayonnements-ionisants.aspx>
7. *Radioactivite : Méthode des indicateurs* [Internet]. 2021 [cité 29 nov 2021]. Disponible sur: https://www.laradioactivite.com/site/pages/Methode_Indicateurs.htm
8. Patton DD. *The Birth of Nuclear Medicine Instrumentation: Blumgart and Yens, 1925*. Journal of Nuclear Medicine. 1 août 2003;44(8):1362-5.
9. Hamilton JG, Soley MH. *A Comparison of the Metabolism of Iodine and of Element 85 (Eka-Iodine)*. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 août 1940;26(8):483-9.
10. Keston AS, Ball RP, Frantz VK, Palmer WW. *Storage of radioactive iodine in a metastasis from thyroid carcinoma*. Science. 3 avr 1942;95(2466):362-3.
11. *The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium* [Internet]. 2021 [cité 30 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC436212/>
12. Lawless S, McMullin MF, Cuthbert R, Houston R. *(32)P in the treatment of myeloproliferative disorders*. Ulster Med J. mai 2016;85(2):83-5.
13. Brown AP, Greening WP, McCready VR, Shaw HJ, Harmer CL. *Radioiodine treatment of metastatic thyroid carcinoma: the Royal Marsden Hospital experience*. Br J Radiol. avr 1984;57(676):323-7.
14. Blake GM, Fogelman I. *Bone Radionuclide Imaging, Quantitation and Bone Densitometry*. In: McCready R, Gnanasegaran G, Bomanji JB, éditeurs. A History of Radionuclide Studies in the UK: 50th Anniversary of the British Nuclear Medicine Society [Internet]. Cham (CH): Springer; 2016 [cité 26 janv 2022]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500203/>
15. Ell PJ. *Nuclear medicine*. Postgrad Med J. févr 1992;68(796):82-105.
16. Peterson TE, Furenlid LR. *SPECT detectors: the Anger Camera and beyond*. Phys Med Biol. 7 sept 2011;56(17):R145-82.

17. Carlier T. *Reconstruction 3D complete par modelisation Monte Carlo de la matrice systeme Apport aux approches quantitatives a l'iode 131*. 2009.
18. CEA. *L'homme et les rayonnements* [Internet]. CEA/Découvrir & Comprendre. CEA; 2014 [cité 17 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.cea.fr/comprendre/Pages/radioactivite/homme-rayonnements.aspx>
19. *The origins of SPECT and SPECT/CT* - PubMed [Internet]. [cité 18 janv 2022]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24218098/>
20. Jones T, Townsend D. *History and future technical innovation in positron emission tomography*. J Med Imaging (Bellingham). janv 2017;4(1):011013.
21. Sgouros G, Bodei L, McDevitt MR, Nedrow JR. *Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges*. Nat Rev Drug Discov. sept 2020;19(9):589-608.
22. *Curietherapie* [Internet]. Gustave Roussy. 2022 [cité 18 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.gustaveroussy.fr/fr/curietherapie>
23. Green DJ, Press OW. *Whither Radioimmunotherapy: To Be or Not To Be?* Cancer Research. 30 avr 2017;77(9):2191-6.
24. Barbet J, Gouill SL, Pèlerin A. *Radioimmunothérapie - Les raisons d'une utilisation clinique confidentielle et celles d'un espoir de développement*. Med Sci (Paris). 1 déc 2019;35(12):1062-5.
25. Herrmann K, Schwaiger M, Lewis JS, Solomon SB, McNeil BJ, Baumann M, et al. *Radiotheranostics: a roadmap for future development*. The Lancet Oncology. mars 2020;21(3):e146-56.
26. *SOMAKIT TOC (68Ga-édotréotide), radiopharmaceutique à usage diagnostique* [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 4 sept 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2788656/fr/somakit-toc-68ga-edotreotide-radiopharmaceutique-a-usage-diagnostique
27. Hennrich U, Benešová M. *[68Ga]Ga-DOTA-TOC: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging*. Pharmaceuticals (Basel). 3 mars 2020;13(3):38.
28. Poeppel TD, Binse I, Petersenn S, Lahner H, Schott M, Antoch G, et al. *68Ga-DOTATOC Versus 68Ga-DOTATATE PET/CT in Functional Imaging of Neuroendocrine Tumors*. Journal of Nuclear Medicine. 1 déc 2011;52(12):1864-70.
29. Johnbeck CB, Knigge U, Loft A, Berthelsen AK, Mortensen J, Oturai P, et al. *Head-to-Head Comparison of 64Cu-DOTATATE and 68Ga-DOTATOC PET/CT: A Prospective Study of 59 Patients with Neuroendocrine Tumors*. Journal of Nuclear Medicine. 1 mars 2017;58(3):451-7.
30. Strosberg J, El-Haddad G, Wolin E, Hendifar A, Yao J, Chasen B, et al. *Phase 3 Trial of 177Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors*. New England Journal of Medicine. 12 janv 2017;376(2):125-35.
31. *LUTATHERA (177Lutécium oxodotréotide), radiopharmaceutique* [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 4 sept 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2864194/fr/lutathera-177lutecium-oxodotreotide-radiopharmaceutique
32. Hennrich U, Kopka K. *Lutathera®: The First FDA- and EMA-Approved Radiopharmaceutical for Peptide Receptor Radionuclide Therapy*. Pharmaceuticals (Basel). 29 juill 2019;12(3):114.
33. Kasi PM, Sharma A, Jain MK. *Expanding the Indication for Novel Theranostic 177Lu-Dotatate Peptide Receptor Radionuclide Therapy: Proof-of-Concept of PRRT in Merkel Cell Cancer*. Case Rep Oncol. 21 janv 2019;12(1):98-103.

34. *Commissioner O of the. FDA Approves First PSMA-Targeted PET Imaging Drug for Men with Prostate Cancer* [Internet]. FDA. FDA; 2020 [cité 20 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-psma-targeted-pet-imaging-drug-men-prostate-cancer>
35. *ATU/RTU - PSMA-11 - ANSM* [Internet]. [cité 5 sept 2022]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/tableau-acces-derogatoire/psma-11>
36. *ATU/RTU - [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 - ANSM* [Internet]. [cité 5 sept 2022]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/tableau-acces-derogatoire/177lu-lu-psma-617-solution-injectable-pour-perfusion>
37. Turpin L, Calzada MC, Zhang Yin J, Rusu T, Dumont Bruzek A, Aveline C, et al. *Radiothérapie interne vectorisée par 177Lu-PSMA-617 de l'adénocarcinome prostatique métastatique résistant à la castration : à propos d'un cas et revue de la littérature*. *Médecine Nucléaire*. 1 mai 2019;43(3):298-303.
38. Kratochwil C, Bruchertseifer F, Giesel FL, Weis M, Verburg FA, Mottaghy F, et al. *225Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted α -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer*. *Journal of Nuclear Medicine*. 1 déc 2016;57(12):1941-4.
39. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*. *Nature*. 3 juin 1993;363(6428):446-8.
40. Juma SN, Gong X, Hu S, Lv Z, Shao J, Liu L, et al. *Shark New Antigen Receptor (IgNAR): Structure, Characteristics and Potential Biomedical Applications*. *Cells*. 8 mai 2021;10(5):1140.
41. *Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies | Annual Review of Biochemistry* [Internet]. 2020 [cité 25 mars 2020]. Disponible sur: https://www-annualreviews-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/full/10.1146/annurev-biochem-063011-092449?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rft_dat=cr_pub++0pubmed
42. Kunz P, Flock T, Soler N, Zaiss M, Vincke C, Sterckx Y, et al. *Exploiting sequence and stability information for directing nanobody stability engineering*. *Biochim Biophys Acta*. sept 2017;1861(9):2196-205.
43. Harmsen MM, van Solt CB, van Zijderveld-van Bommel AM, Niewold TA, van Zijderveld FG. *Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1 sept 2006;72(3):544-51.
44. Dolk E, Vaart M van der, Hulsik DL, Vriend G, Haard H de, Spinelli S, et al. *Isolation of Llama Antibody Fragments for Prevention of Dandruff by Phage Display in Shampoo*. *Applied and Environmental Microbiology*. janv 2005;71(1):442.
45. Saerens D, Pellis M, Loris R, Pardon E, Dumoulin M, Matagne A, et al. *Identification of a Universal VHH Framework to Graft Non-canonical Antigen-binding Loops of Camel Single-domain Antibodies*. *Journal of Molecular Biology*. 23 sept 2005;352(3):597-607.
46. Henry KA, MacKenzie CR. *Antigen recognition by single-domain antibodies: structural latitudes and constraints*. *MAbs*. 15 août 2018;10(6):815-26.
47. Hassanzadeh-Ghassabeh G, Devoogdt N, De Pauw P, Vincke C, Muyldermans S. *Nanobodies and their potential applications*. *Nanomedicine*. 1 juin 2013;8(6):1013-26.
48. *Radiolabeled nanobodies for tumor targeting: From bioengineering to imaging and therapy* - PubMed [Internet]. [cité 15 mai 2022]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33647388/>
49. Man TP. *How to Iodinate Proteins with Iodo-Gen®* [Internet]. [cité 16 mai 2022]. Disponible sur: <https://info.gbiosciences.com/blog/how-to-iodinate-proteins-with-iodo-gen>

50. Bailey GS. *The Chloramine T Method for Radiolabeling Protein*. In: Walker JM, éditeur. *The Protein Protocols Handbook* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2002 [cité 16 mai 2022]. p. 963-5. (Springer Protocols Handbooks). Disponible sur: <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:963>
51. Hrynchak I, Santos L, Falcão A, Gomes CM, Abrunhosa AJ. *Nanobody-Based Theranostic Agents for HER2-Positive Breast Cancer: Radiolabeling Strategies*. *Int J Mol Sci*. 4 oct 2021;22(19):10745.
52. Wängler B, Schirmacher R, Bartenstein P, Wängler C. *Chelating agents and their use in radiopharmaceutical sciences*. *Mini Rev Med Chem*. oct 2011;11(11):968-83.
53. M.Beljean-Leymarie, J-P.Dubost, M.Galliot-Guilley. *Chimie analytique* [Internet]. *Chimie analytique, chimie des solutions*. [cité 14 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.unitheque.com/chimie-analytique/abreges-pharma-1/elsevier-masson/Livre/1706>
54. Flora SJS, Pachauri V. *Chelation in Metal Intoxication*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. juill 2010;7(7):2745-88.
55. *Transglutaminase mediated PEGylation of nanobodies for targeted nano-drug delivery* - *Journal of Materials Chemistry B* (RSC Publishing) [Internet]. 2022 [cité 17 janv 2022]. Disponible sur: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/tb/c7tb03132g>
56. Massa S, Vikani N, Betti C, Ballet S, Vanderhaegen S, Steyaert J, et al. *Sortase A-mediated site-specific labeling of camelid single-domain antibody-fragments: a versatile strategy for multiple molecular imaging modalities*. *Contrast Media & Molecular Imaging*. 2016;11(5):328-39.
57. Puthenveetil S, Liu DS, White KA, Thompson S, Ting AY. *Yeast display evolution of a kinetically efficient 13-amino acid substrate for lipoic acid ligase*. *J Am Chem Soc*. 18 nov 2009;131(45):16430-8.
58. Schumacher D, Helma J, Schneider AFL, Leonhardt H, Hackenberger CPR. *Nanobodies: Chemical Functionalization Strategies and Intracellular Applications*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 23 févr 2018;57(9):2314-33.
59. Küppers J, Kürpig S, Bundschuh RA, Essler M, Lütje S. *Radiolabeling Strategies of Nanobodies for Imaging Applications*. *Diagnostics (Basel)*. 25 août 2021;11(9):1530.
60. Berland L, Kim L, Abousaway O, Mines A, Mishra S, Clark L, et al. *Nanobodies for Medical Imaging: About Ready for Prime Time?* *Biomolecules*. 26 avr 2021;11(5):637.
61. Gainkam LOT, Huang L, Caveliers V, Keyaerts M, Hernot S, Vaneycken I, et al. *Comparison of the Biodistribution and Tumor Targeting of Two 99mTc-Labeled Anti-EGFR Nanobodies in Mice, Using Pinhole SPECT/Micro-CT*. *Journal of Nuclear Medicine*. 1 mai 2008;49(5):788-95.
62. Keyaerts M, Xavier C, Heemskerk J, Devoogdt N, Everaert H, Ackaert C, et al. *Phase I Study of 68Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Carcinoma*. *Journal of Nuclear Medicine*. 1 janv 2016;57(1):27-33.
63. Zhao L, Liu C, Xing Y, He J, O'Doherty J, Huang W, et al. *Development of a 99mTc-Labeled Single-Domain Antibody for SPECT/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Cancer*. *Mol Pharmaceutics*. 6 sept 2021;18(9):3616-22.
64. Xing Y, Chand G, Liu C, Cook GJR, O'Doherty J, Zhao L, et al. *Early Phase I Study of a 99mTc-Labeled Anti-Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Single-Domain Antibody in SPECT/CT Assessment of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer*. *J Nucl Med*. sept 2019;60(9):1213-20.

65. D’Huyvetter M, Vincke C, Xavier C, Aerts A, Impens N, Baatout S, et al. *Targeted Radionuclide Therapy with A ¹⁷⁷ Lu-labeled Anti-HER2 Nanobody*. *Theranostics*. 2014;4(7):708-20.
66. Krasniqi A, D’Huyvetter M, Xavier C, Van der Jeught K, Muyldermans S, Van Der Heyden J, et al. *Theranostic Radiolabeled Anti-CD20 sdAb for Targeted Radionuclide Therapy of Non-Hodgkin Lymphoma*. *Molecular Cancer Therapeutics*. 3 déc 2017;16(12):2828-39.
67. Lindenberg L, Thomas A, Adler S, Mena E, Kurdziel K, Maltzman J, et al. *Safety and biodistribution of ¹¹¹In-amatumaximab in patients with mesothelin expressing cancers using Single Photon Emission Computed Tomography-Computed Tomography (SPECT-CT) imaging*. *Oncotarget*. 4 févr 2015;6(6):4496-504.
68. Gainkam LOT, Caveliers V, Devoogdt N, Vanhove C, Xavier C, Boerman O, et al. *Localization, mechanism and reduction of renal retention of technetium-99m labeled epidermal growth factor receptor-specific nanobody in mice*. *Contrast Media Mol Imaging*. avr 2011;6(2):85-92.
69. Chakravarty R, Goel S, Cai W. *Nanobody: The “Magic Bullet” for Molecular Imaging?* *Theranostics*. 29 janv 2014;4(4):386-98.
70. Huang H, Wu T, Shi H, Wu Y, Yang H, Zhong K, et al. *Modular design of nanobody-drug conjugates for targeted-delivery of platinum anticancer drugs with an MRI contrast agent*. *Chem Commun (Camb)*. 25 avr 2019;55(35):5175-8.
71. Hernot S, Unnikrishnan S, Du Z, Shevchenko T, Cosyns B, Broisat A, et al. *Nanobody-coupled microbubbles as novel molecular tracer*. *J Control Release*. 10 mars 2012;158(2):346-53.
72. Molloy ME, Valenzuela LB, Basak PE. *Combinatorial antitumor effects of CD3-based trispecific T cell activating constructs (TriTACs) and checkpoint inhibitors in preclinical models*. :1.
73. Del Bano J, Florès-Florès R, Josselin E, Goubard A, Ganier L, Castellano R, et al. *A Bispecific Antibody-Based Approach for Targeting Mesothelin in Triple Negative Breast Cancer*. *Front Immunol*. 10 juill 2019;10:1593.
74. Safarzadeh Kozani P, Naseri A, Mirarefin SMJ, Salem F, Nikbakht M, Evazi Bakhshi S, et al. *Nanobody-based CAR-T cells for cancer immunotherapy*. *Biomarker Research*. 25 avr 2022;10(1):24.
75. Yu S, Xiong G, Zhao S, Tang Y, Tang H, Wang K, et al. *Nanobodies targeting immune checkpoint molecules for tumor immunotherapy and immunoimaging (Review)*. *Int J Mol Med*. févr 2021;47(2):444-54.
76. *Nanobody Engineering : Toward Next Generation Immunotherapies and Immunoimaging of Cancer* - PubMed [Internet]. [cité 18 janv 2022]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31544819/>
77. *CABLIVI 10 mg (caplacizumab)* [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 18 janv 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3295753/fr/cablivi-10-mg-caplacizumab
78. University Hospital, Grenoble. *Phase I Study, Prospective, Monocentric, Uncontrolled, Non-randomized, Open, Interventional. First Human Administration of an Inflammation Tracer (^{99m}Tc-cAbVCAM1-5) Using the Scintigraphy in Healthy Volunteers and Asymptomatic Patients*. [Internet]. clinicaltrials.gov; 2020 août [cité 12 mai 2022]. Report No.: NCT04483167. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04483167>
79. Bala G, Crauwels M, Blykers A, Remory I, Marschall ALJ, Dübel S, et al. *Radiometal-labeled anti-VCAM-1 nanobodies as molecular tracers for atherosclerosis – impact of radiochemistry on pharmacokinetics*. *Biological Chemistry*. 1 mars 2019;400(3):323-32.
80. Put S, Schoonooghe S, Devoogdt N, Schurgers E, Avau A, Mitera T, et al. *SPECT Imaging of Joint Inflammation with Nanobodies Targeting the Macrophage Mannose Receptor in a Mouse Model for Rheumatoid Arthritis*. *Journal of Nuclear Medicine*. 1 mai 2013;54(5):807-14.

81. *Peptide Bicycle Therapeutics* [Internet]. [cité 18 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.bicycletherapeutics.com/approach/#platform>

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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

