



HAL
open science

Développement d'un radiotracteur à visée théranostique des tumeurs solides : conjugaison et radiomarquage au gallium-68 d'un nanobody

Thibault Guenard

► **To cite this version:**

Thibault Guenard. Développement d'un radiotracteur à visée théranostique des tumeurs solides : conjugaison et radiomarquage au gallium-68 d'un nanobody. Sciences pharmaceutiques. 2023. dumas-04127848

HAL Id: dumas-04127848

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04127848v1>

Submitted on 14 Jun 2023

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2023

**DÉVELOPPEMENT D'UN RADIOTRACEUR À VISÉE
THÉRANOSTIQUE DES TUMEURS SOLIDES : CONJUGAISON ET
RADIOMARQUAGE AU GALLIUM-68 D'UN NANOBODY**

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

SPÉCIALITÉ : RECHERCHE

Par M. Thibault GUENARD

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 17/05/2023

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Présidente du jury :

Mme le Dr Delphine MORIN ALDEBERT

Membres :

Mme le Dr Mitra AHMADI (directrice de thèse)

M. le Dr Julien LEENHARDT (tuteur universitaire)

M. le Dr Alexis BROISAT

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

ENSEIGNANTS - CHERCHEURS Année 2022 / 2023

Doyen de la Faculté - Pr Michel SÈVE
Vice-Doyen Pédagogie - Dr Pierre CAVAILLÈS
Vice-Doyen Recherche – Pr Walid RACHIDI

| STATUT | NOM | PRÉNOM | LABORATOIRE | HDR |
|--------------------|---------------------------|-------------|---|-----|
| MCF | ALDEBERT | DELPHINE | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx | Oui |
| PU-PH | ALLENET | BENOÎT | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS | Oui |
| AHU | AMEN | AXELLE | | |
| Professeur Emérite | BAKRI | ABDELAZIZ | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS | |
| MCF | BARDET | JEAN-DIDIER | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS | |
| MCF | BATANDIER | CÉCILE | LBFA – INSERM U1055 | |
| PU-PH | BEDOUCHE | PIERRICK | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS | Oui |
| MAST | BELLET | BÉATRICE | - | |
| MCF | BOUCHERLE | BENJAMIN | DPM - UMR 5063 CNRS | |
| PU | BOUMENDJEL | AHCENE | LRB /INSERM U 1039 | Oui |
| MCF | BOURGOIN | SANDRINE | TIMC | |
| MCF | BRETON | JEAN | LCIB – UMR E3 CEA | Oui |
| MCF | BRIANÇON-MARJOLLET | ANNE | HP2 – INSERM U1042 | Oui |
| PU | BURMEISTER | WILHEM | UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS | Oui |
| MCU-PH | BUSSER | BENOÎT | Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309 | Oui |
| Professeur Emérite | CALOP | JEAN | | |
| MCF | CAVAILLÈS | PIERRE | IAB | |
| MCU-PH | CHANOINE | SÉBASTIEN | CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309 | |
| MCF | CHOISNARD | LUC | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| MCU-PH | CHOVELON | BENOIT | DPM – UMR 5063 CNRS | |
| MAST | COMBE | JÉRÔME | - | |
| PU-PH | CORNET | MURIEL | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx | Oui |
| Professeur Emérite | DANEL | VINCENT | - | |
| ATER | DARRACQ GHITALLA CLOCK | MARIE | | |
| Professeur Emérite | DECOUT | JEAN-LUC | DPM – UMR 5063 CNRS | |
| MCF Emérite | DELÉTRAZ-DELPORTE | MARTINE | LPSS – EAM 4129 LYON | |
| MCF | DEMEILLIERS | CHRISTINE | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS | Oui |
| PU-PH | DROUET | CHRISTIAN | GREPI EA7408 | Oui |
| PU | DROUET | EMMANUEL | IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale | Oui |
| MCF | DURMORT | CLAIRE | IBS – UMR 5075 CEA CNRS | Oui |
| PU-PH | FAURE | PATRICE | DPM – UMR5063 | Oui |
| MCF | FAURE-JOYEUX | MARIE | HP2 – INSERM U1042 | Oui |

| STATUT | NOM | PRÉNOM | LABORATOIRE | HDR |
|---------------------|-----------------|---------------|---|-----|
| PRCE | FITE | ANDRÉE | - | |
| MCU-PH | GARNAUD | CÉCILE | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX | |
| PRAG | GAUCHARD | PIERRE-ALEXIS | - | |
| PU-PH | GERMI | RAPHAËLE | IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale | Oui |
| MCF | GÈZE | ANNABELLE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| MCF Émérite | GILLY | CATHERINE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| MCF | GONINDARD | CHRISTELLE | LECA – UMR CNRS 5553 | Oui |
| Professeure Émérite | GRILLOT | RENÉE | - | |
| MCF | GUIEU | VALÉRIE | DPM – UMR 5063 CNRS | |
| MCU-PH | HENNEBIQUE | AURÉLIE | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX | |
| MCF | HININGER-FAVIER | ISABELLE | LBFA – INSERM U1055 | Oui |
| MCF | KHALEF | NAWEL | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS | |
| MCF | KOTZKI | SYLVAIN | HP2 – UMR S1042 | |
| MCF | KRIVOBOK | SERGE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| AHU | LEENHARDT | JULIEN | INSERM – U1039 | |
| PU | LENORMAND | JEAN-LUC | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX | Oui |
| AHU | LEO | CAROLINE | | |
| PU | MARTIN | DONALD | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS | Oui |
| PRCE | MATTHYS | LAURENCE | - | |
| AHU | MINOVÉS | MÉLANIE | HP2 – INSERM U1042 | |
| PU | MOINARD | CHRISTOPHE | LBFA - INSERM U1055 | Oui |
| PU-PH | MOSSUZ | PASCAL | IAB – INSERM U1209 | Oui |
| MCF | MOUHAMADOU | BELLO | LECA – UMR 5553 CNRS | Oui |
| MCF | NICOLLE | EDWIGE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| MCF | OUKACINE | FARID | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| ATER | OZCAN | BILGEHAN | | |
| MCF | PERES | BASILE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| AHU | PERRIER | QUENTIN | | |
| MCF | PEUCHMAUR | MARINE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| PU | PEYRIN | ERIC | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| PU | RACHIDI | WALID | BGE/BIOMICS/ CEA | Oui |
| PU | RAVELET | CORINNE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| PU | RIBUOT | CHRISTOPHE | HP2 – INSERM U1042 | Oui |
| Professeure Émérite | ROUSSEL | ANNE-MARIE | - | Oui |
| PU-PH | SÈVE | MICHEL | TIMC | Oui |
| MCF | SOUARD | FLORENCE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |

| STATUT | NOM | PRÉNOM | LABORATOIRE | HDR |
|--------------------|--------------|---------|-------------------------|-----|
| MCF | SPANO | MONIQUE | IBS – UMR 5075 CEA CNRS | |
| MCF | TARBOURIECH | NICOLAS | IBS – UMR 5075 CEA CNRS | |
| AHU | TRUFFOT | AURÉLIE | | |
| MCF | VANHAVERBEKE | CÉCILE | DPM – UMR 5063 CNRS | |
| AHU | VITALE | ELISA | | |
| MCF | WARTHER | DAVID | DPM | |
| Professeur Emérite | WOUESSIDJEWE | DENIS | - | |

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche INSERM
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institute for Advanced Biosciences
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel
MCF : Maître de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR : Unité Mixte de Recherche
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements.

Merci Mitra pour ton accompagnement tout au long de ce travail de thèse, pour ta gentillesse et ta patience au cours de ces derniers mois.

Merci Mme Aldebert d'assurer la présidence du jury ainsi que votre accompagnement durant mon parcours recherche.

Merci Julien et Alexis d'avoir accepté de participer au bon déroulement de ma thèse.

Merci à l'équipe du LRB pour votre accueil durant mes stages m'ayant permis de réaliser les manipulations nécessaires.

Table des matières

| | | |
|---------------------------|--|----|
| I. | Introduction générale..... | 11 |
| II. | Rappels historiques & bibliographiques..... | 12 |
| A. | Concepts en radiopharmacie | 13 |
| i. | Médicament radiopharmaceutique | 13 |
| ii. | Radioéléments et rayonnements..... | 14 |
| iii. | Applications | 16 |
| B. | Oncologie | 19 |
| i. | Généralités..... | 19 |
| ii. | Arsenal thérapeutique..... | 20 |
| C. | Théranostique..... | 22 |
| i. | Définition | 22 |
| ii. | Radioéléments impliqués | 23 |
| D. | Couple théranostique Gallium/ Lutétium..... | 24 |
| i. | Ga-68..... | 24 |
| ii. | Lutétium | 28 |
| iii. | Association Ga-68/ Lu-177 | 29 |
| E. | La cible : la mésothéline..... | 29 |
| i. | Physiologie : Distribution et rôle | 29 |
| ii. | Pathologie : Distribution et rôle | 30 |
| F. | Le vecteur : les nanobodies | 32 |
| i. | Généralités..... | 32 |
| ii. | Applications | 33 |
| G. | Design du radiomarquage..... | 34 |
| i. | DOTA..... | 36 |
| ii. | NOTA..... | 37 |
| III. | | 38 |
| Matériels & Méthodes..... | | 38 |
| A. | Analyses chromatographiques..... | 39 |
| B. | Dichroïsme circulaire | 41 |
| C. | Conjugaison/ Purification/ Analyses | 43 |
| i. | Optimisation des conditions de conjugaison A1-His avec DOTA..... | 45 |
| ii. | Optimisation des conditions de conjugaison A1-His avec NOTA..... | 46 |
| iii. | Stabilité A1-His conjugué..... | 46 |

| | | |
|---------------------------------|---|----|
| iv. | Conjugaison des dérivés de A1-His au Dota et suivi de stabilité..... | 46 |
| D. | Mise au point de radiomarquage de A1-His au Ga-68 | 47 |
| i. | Optimisation du pH | 48 |
| ii. | Optimisation du temps d'incubation | 48 |
| iii. | Augmentation de l'activité spécifique..... | 49 |
| iv. | Suivi de stabilité in vitro | 49 |
| E. | Radiomarquage des dérivés de A1-His | 49 |
| F. | Dosage..... | 50 |
| i. | Dosage spectroscopique | 51 |
| ii. | Méthode de Bradford | 52 |
| iii. | Mesure fluorimétrique..... | 52 |
| IV. | | 53 |
| Résultats. | | 53 |
| A. | Analyses chromatographiques..... | 54 |
| B. | Dichroïsme circulaire | 56 |
| C. | Conjugaison/ Purification/ Analyses | 58 |
| i. | Optimisation des conditions de conjugaison A1-His avec DOTA..... | 58 |
| ii. | Optimisation des conditions de conjugaison A1-His avec NOTA..... | 66 |
| iii. | Etude de stabilité des nanobodies conjugués | 68 |
| iv. | Conjugaison des dérivés de A1-His avec Dota et suivi de stabilité | 70 |
| D. | Mise au point de radiomarquage de A1-His-Dota au Ga-68 | 72 |
| i. | Optimisation du pH | 72 |
| ii. | Optimisation de temps d'incubation | 74 |
| iii. | Augmentation de l'activité spécifique..... | 75 |
| iv. | Optimisation de la concentration de réaction | 75 |
| v. | Suivi de stabilité in vitro | 76 |
| E. | Radiomarquage des dérivés de A1-His | 78 |
| F. | Dosage..... | 80 |
| V. | | 82 |
| Discussion et perspectives..... | | 82 |
| A. | Interprétation des résultats | 83 |
| i. | Méthodes analytiques..... | 83 |
| ii. | Conjugaison..... | 84 |
| iii. | Radiomarquage..... | 87 |
| B. | Perspectives et évolutions à long terme | 88 |
| i. | Optimisation et automatisation du radiomarquage au Ga-68 | 88 |

| | | |
|------|--|----|
| ii. | Développement du radiomarquage au Lutétium | 89 |
| iii. | Modifications structurales du vecteur | 89 |
| VI. | Bibliographie..... | 92 |
| VII. | Annexes..... | 97 |
| | | 99 |

Liste des figures.

| | |
|--|----|
| Figure 1 Types de rayonnements : pouvoir ionisant et pénétration, lelivrescolaire.fr | 14 |
| Figure 2 Principes de fonctionnement de la TEP et de la SPECT, Illustration of PET and SPECT. (researchgate.net) | 16 |
| Figure 3 Répartition de l'incidence des cancers en 2020 selon leur localisation, Global Cancer Observatory (iarc.fr)..... | 19 |
| Figure 4 Résumé de l'approche théranostique par l'association ⁶⁸ Ga/ ¹⁷⁷ Lu, Plateforme Théranostique - Adacap | 22 |
| Figure 5 Schéma de désintégration du Ge-68/ Ga-68, Physikalisch-Technische Bundesanstalt (ptb.de)..... | 25 |
| Figure 6 Expression de la mésothéline dans différents types de cancer..... | 30 |
| Figure 7 Origine des nanobodies, Llama Antibodies (VHHs) Neutralize Coronaviruses (novusbio.com)..... | 32 |
| Figure 8 Schéma général d'un vecteur conjugué et radiomarqué | 34 |
| Figure 9 Structure chimique p-SCN-Bn-DOTA | 36 |
| Figure 10 Structure chimique p-SCN-Bn-NOTA | 37 |
| Figure 11 Gradients de solvants utilisés pour la méthode RP-HPLC | 41 |
| Figure 12 Spectres de trois différentes structures secondaires caractéristiques obtenus en dichroïsme circulaire, Electronic Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins: Chem (cell.com) | 42 |
| Figure 13 Spectre d'absorption au temps de rétention du nanobody anti-mésothéline en fonction de la longueur d'onde | 54 |
| Figure 14 Exemple de profil A1-His en SE-HPLC | 55 |
| Figure 15 Profils de dichroïsme circulaire de A1-His 205 à 260 nm et de 25°C à 80°C | 56 |
| Figure 16 Normalisation des résultats de dichroïsme circulaire pour le nanobody anti-mésothéline à 216nm..... | 57 |
| Figure 17 Profil de purification SE-HPLC A1-His-DOTA en condition P1..... | 59 |
| Figure 18 Analyse de masse A1-His-DOTA en condition P1..... | 59 |
| Figure 19 Profil de purification SE-HPLC A1-His-DOTA en condition P2..... | 60 |
| Figure 20 Analyse de Masse A1-His-DOTA en condition P2 | 60 |
| Figure 21 Profil de purification SE-HPLC A1-His-DOTA en condition P3..... | 61 |
| Figure 22 Analyse de masse A1-His-DOTA en condition P3..... | 61 |
| Figure 23 Profil de radiomarquage A1-His-DOTA en condition P3 | 62 |
| Figure 24 Profil de purification SE-HPLC A1-His-DOTA en condition P5..... | 63 |
| Figure 25 Analyse de masse A1-His-DOTA en condition P5..... | 63 |
| Figure 26 Profil de radiomarquage A1-His-DOTA en condition P5 | 64 |
| Figure 27 Analyse de masse de A1-His+NOTA en condition P1 | 66 |
| Figure 28 Analyse de masse de A1-His+NOTA en condition P5..... | 67 |
| Figure 29 Analyse de masse A1-His+DOTA 1 mois après la conjugaison | 68 |
| Figure 30 Analyse de masse A1-His+ Nota 1 mois après la conjugaison..... | 69 |
| Figure 31 Analyse de masse des dérivés A1-His post-conjugaison..... | 70 |
| Figure 32 Profils RP-HPLC des marquages à T0 PH3, PH4, PH5 | 72 |
| Figure 33 Profils RP-HPLC des marquages à T2H PH3, PH4, PH5 | 73 |
| Figure 34 PRC – Optimisation de la durée d'incubation | 74 |
| Figure 35 PRC - optimisation de l'activité spécifique (10, 20, 30 MBq/ nmol)..... | 75 |
| Figure 36 PRC - optimisation de la concentration (50 et 100 µg) | 75 |
| Figure 37 Suivi de stabilité in vitro NMR-DOTA radiomarqué au Ga-68/ Sang de souris | 76 |
| Figure 38 Suivi de stabilité in vitro NMR-NOTA radiomarqué au Ga-68/ Sang de souris | 77 |

Figure 39 a : Ga-DOTA-A1-His et b: Ga-Nota-A1-His 2 ans après la conjugaison conservé à -80 et à 1mg/mL 81

Liste des Tableaux.

| | |
|---|----|
| Tableau 1 Evaluation des critères de conjugaison | 46 |
| Tableau 2 récapitulatif des différentes conditions de conjugaison | 65 |
| Tableau 3 récapitulatif des différents taux de conjugaison des différents dérivés A1-His avec DOTA..... | 72 |
| Tableau 4 récapitulatif des radiomarquages et suivi de stabilité A1-His-DOTA et dérivés..... | 79 |

I. Introduction générale.

La médecine nucléaire se différencie de l'approche radiologique, classiquement utilisée dans l'application des rayonnements en médecine, car elle se base sur l'administration de radiopharmaceutiques aux patients. Dans les applications « classiques », les rayonnements ionisants (rayonnements X) sont utilisés pour réaliser une imagerie essentiellement structurale. Cette approche radiologique permet également de réaliser de la radiothérapie, par le traitement d'une zone, sans distinction particulière. L'administration de radiopharmaceutiques permet a contrario d'avoir une source radioactive interne et spécialement dirigée contre une cible. L'image obtenue pourra alors être une imagerie fonctionnelle ou métabolique. Les examens scintigraphiques sont aujourd'hui largement utilisés pour la réalisation d'imagerie fonctionnelles dans de nombreuses pathologies. Lorsqu'il s'agit de radiothérapie interne, la médecine nucléaire permet de diriger plus précisément la source de rayonnement et ainsi de permettre une diminution des effets indésirables liés aux radiothérapies.

Les applications en oncologie de la médecine nucléaire sont aujourd'hui nombreuses face à des pathologies complexes et parfois résistantes aux chimiothérapies classiques. L'une des nouvelles approches est le théranostique pour une prise en charge complète et efficace des patients atteints de cancers.

Ainsi, cette thèse porte sur le développement d'un nouvel outil théranostique pour la prise en charge des tumeurs solides. Elle s'intéresse plus particulièrement aux étapes préliminaires de ce développement qui concerne essentiellement la conjugaison et le radiomarquage d'un nanobody ainsi que la mise en place des analyses associées.

II. Rappels historiques & bibliographiques

A. Concepts en radiopharmacie

i. Médicament radiopharmaceutique

Un médicament radiopharmaceutique (MRP) se définit selon le code de la santé publique comme tout médicament contenant un ou plusieurs radionucléides, aussi appelé radioéléments. Le MRP peut être composé soit uniquement d'un radionucléide soit d'une molécule non radioactive sur laquelle est fixé un radioélément « le radiotraceur ». Ces molécules agissent alors comme des vecteurs visant à distribuer spécifiquement le rayonnement radioactif à une cible, pouvant être le reflet d'une activité métabolique, d'une pathologie ou d'un organe. Les MRP ont deux présentations distinctes, soit prêts à l'emploi soit sous une forme de trousse/ d'un kit qui doit être marqué par un radionucléide afin d'être administré de manière extemporanée.

Les MRP répondent à des conditions particulières d'utilisation. Ils ont en effet un statut de médicament, le plus souvent administré de manière parentérale. Ils doivent ainsi répondre à des critères d'asepsie, et respecter les BPF applicables aux médicaments injectables. Ces médicaments doivent également prendre en compte les règles de radioprotection et les contraintes d'exposition, notamment pour le personnel en lien avec la préparation des MRP. Les périodes radioactives de ces composés imposent également une contrainte temporelle dans leur préparation et leur administration.

Les radioéléments entrant dans la composition des MRP sont de natures variées ce qui implique que ces médicaments ont des applications multiples.

ii. Radioéléments et rayonnements

Un radioélément se définit comme un élément chimique dont les isotopes sont instables. Les systèmes étant naturellement à la recherche de leur configuration la plus stable afin de minimiser leur énergie, l'instabilité de ces éléments est évacuée par différents types de rayonnements répertoriés sur la figure 1 ci-dessous.

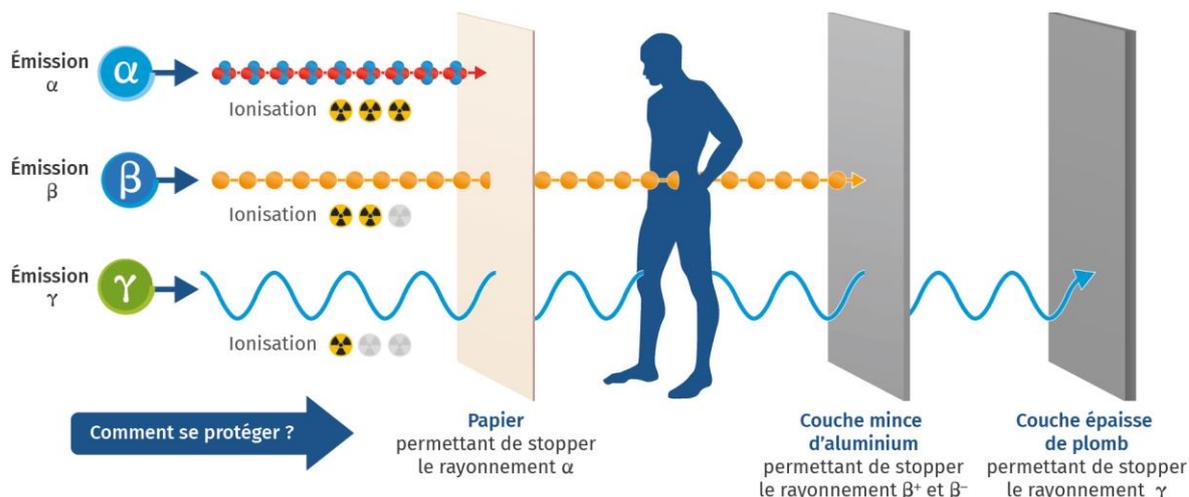


Figure 1 Types de rayonnements : pouvoir ionisant et pénétration, lelivrescolaire.fr

<https://www.livrescolaire.fr/page/12177885>

Les radioéléments sont caractérisés par leurs types d'émission ainsi que leur demi-vie. La demi-vie ou période radioactive d'un élément, correspond au temps au bout duquel la moitié des noyaux radioactifs d'une source se sont désintégrés.

Chaque type de rayonnement a un usage particulier en médecine nucléaire lié aux caractéristiques représentées ci-dessus qui sont le pouvoir pénétrant du rayonnement ainsi que son pouvoir ionisant. On différencie ainsi trois types de rayonnements.

Les émetteurs gamma, comme le Technétium-99m, l'Iode-123 ou le Thallium-201, sont utilisés en tomographie par émission monophotonique (SPECT) afin de réaliser de l'imagerie, en raison de leur faible pouvoir ionisant, mais un fort pouvoir pénétrant ce qui permet une détection aisée.

Ensuite, on retrouve deux catégories d'émetteurs β : les émetteurs β^+ qui émettent un positon et les émetteurs β^- qui émettent un électron.

Les radionucléides β^+ , avec une énergie de 10 KeV à 2 MeV, comme le Fluor-18 (F-18) ou le Gallium-68 (Ga-68), émettent un positon. Cette particule β^+ produit 2 photons d'annihilation de directions diamétralement opposées lorsqu'elle entre en collision avec un électron de l'environnement. Ces photons peuvent alors être exploités en imagerie par une caméra TEP (Tomographie par émission de positons).

Les radionucléides β^- , avec une énergie de 30 KeV à 2,3 MeV, comme l'Yttrium-90 (Y-90) ou le Lutetium-177 (Lu-177), représentent une source de rayonnement avec un pouvoir ionisant plus élevé mais une pénétration relativement faible, entre 50 μm et 12 mm dans les tissus. Ces propriétés les rendent adaptés pour un usage thérapeutique, ils permettent la destruction d'un environnement relativement restreint.

Enfin les émetteurs alpha émettent une particule correspondant à un noyau d'hélium, composée de 2 neutrons et 2 protons. Cette particule présente une forte énergie, un pouvoir ionisant important mais une faible pénétration, entre 50 et 100 μm (1). Actuellement différents émetteurs α sont en voie de développement comme l'actinium-225, le bismuth-213 ou l'astate-211. Cependant ce type de radioélément est encore faiblement utilisé en radiothérapie chez l'homme pour différentes raisons (2). La toxicité sur les autres organes de ces composés n'est pas clairement connue. La chaîne de décroissance complexe de ces éléments, comme l'Ac-225 qui décroît en 4 particules α (3). Enfin la distribution des éléments de décroissance est souvent différente de l'élément de départ, ce qui rend la dosimétrie difficile à réaliser (4).

La combinaison d'isotopes de différentes natures permet d'allier les propriétés relatives à l'imagerie et à la radiothérapie afin de s'intégrer dans une approche théranostique de la médecine nucléaire.

iii. Applications

a. Diagnostiques

La médecine nucléaire est depuis longtemps utilisée en imagerie médicale à des fins diagnostiques. Deux méthodes principales sont utilisées dont les modes de fonctionnement sont résumés sur la figure 2 ci-dessous.

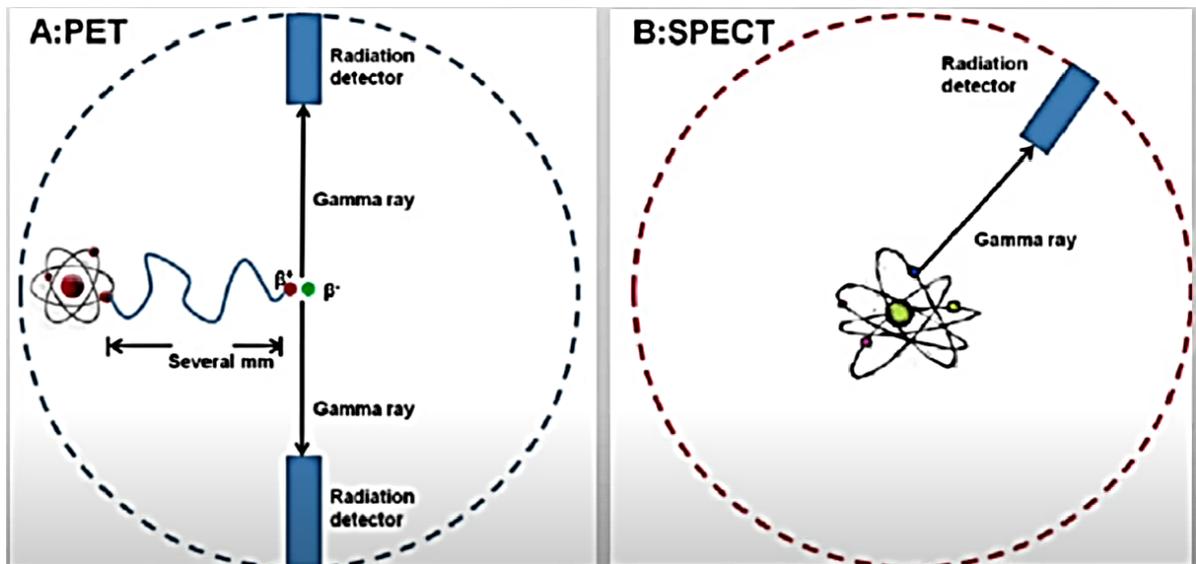


Figure 2 Principes de fonctionnement de la TEP et de la SPECT, Illustration of PET and SPECT. (researchgate.net)

https://www.researchgate.net/figure/Illustration-of-PET-and-SPECT-A-Positron-annihilation-in-PET-the-emitted-positron_fig4_51815430

On retrouve d'une part la TEP qui se base sur l'utilisation de radionucléides émetteurs β^+ , les photons d'annihilation émis lors de la rencontre du positon avec un électron du milieu sont détectés par deux détecteurs diamétralement opposés. Aujourd'hui la TEP offre une haute résolution ainsi qu'une bonne sensibilité ce qui en fait la méthode de choix pour l'imagerie nucléaire. Nous pouvons citer l'exemple du ^{18}F FDG (fluorodésoxyglucose), un glucose dont le groupement hydroxyle du carbone 2 a été substitué par du Fluor-18. Il est utilisé pour visualiser des cancers variés comme celui du poumon, le lymphome ou encore le mélanome. Le principe ici repose sur une imagerie métabolique, l'image obtenue fait ressortir les sites avec une forte consommation énergétique comme les tumeurs (5).

D'autre part la SPECT se base sur l'utilisation d'émetteurs gamma. Dans ce cas un unique photon est directement émis par le radioélément. La combinaison des signaux des radioéléments fixés sur la cible permet alors de recréer une image. Aujourd'hui c'est le Technétium-99 qui est le radioélément le plus fréquemment utilisé en SPECT pour l'imagerie en clinique. Le Thallium-201 est employé en imagerie nucléaire en tant qu'analogue du potassium, il est utilisé pour le diagnostic des sténoses des artères coronaires (6). Dans un cas particulier où le radionucléide n'est pas fixé à un vecteur nous pouvons citer l'Iode-123 qui est utilisé pour réaliser des scintigraphies de la thyroïde, ce composé ayant intrinsèquement une distribution essentiellement thyroïdienne lors de son administration.

b. Thérapeutiques

Les applications des radioéléments en thérapeutique se font via une approche vectorisée. Le radionucléide est distribué vers la cible contre laquelle le MRP est dirigé et l'environnement (dont les cellules tumorales par exemple) est détruit par le pouvoir ionisant du rayonnement β - ou α .

Actuellement la radiothérapie interne vectorisée en clinique cible essentiellement l'utilisation des rayonnements β -. On peut citer les exemples de l'Yttrium-90 (90Y-Ibritumomab tiuxetan, Zevalin®) ainsi que d'Iode-131 (^{131}I -tositumomab, Bexxar®) couplés à des anticorps monoclonaux anti-CD20. Le CD20 est un antigène exprimé à la surface des lymphocytes B. Ces traitements sont utilisés dans le traitement des lymphomes non hodgkinien (7).

L'un des émetteurs α utilisé en clinique est le Radium-223 utilisé dans certains cas de métastases osseuses, il a notamment une utilité en soins palliatifs avec une AMM associée à la réduction des douleurs osseuses (8).

La radiothérapie interne peut également se faire de manière non vectorisée par l'utilisation d'Iode-131 administré par voie entérale sous forme de gélule ou de solution buvable. Ce radioélément est utilisé seul dans le cadre de la radiothérapie des cancers de la thyroïde ou également pour le traitement des hyperthyroïdies.

B. Oncologie

i. Généralités

Les cancers représentent un ensemble de pathologies caractérisées par la prolifération de cellules transformées ayant notamment acquis des propriétés de survie et de croissance indépendante des signaux de régulation habituels. Cette prolifération importante, causant une invasion locale (tumeur primitive) et à distance (métastase) des tissus sains est à l'origine de la symptomatologie cancéreuse.

Aujourd'hui responsables de près de 10 millions de décès chaque année à travers le monde, les cancers représentent la deuxième cause de mortalité. Avec un taux d'incidence de l'ordre de 19 millions de nouveaux cas en 2020, les cancers constituent à ce jour un véritable enjeu de santé publique (9).

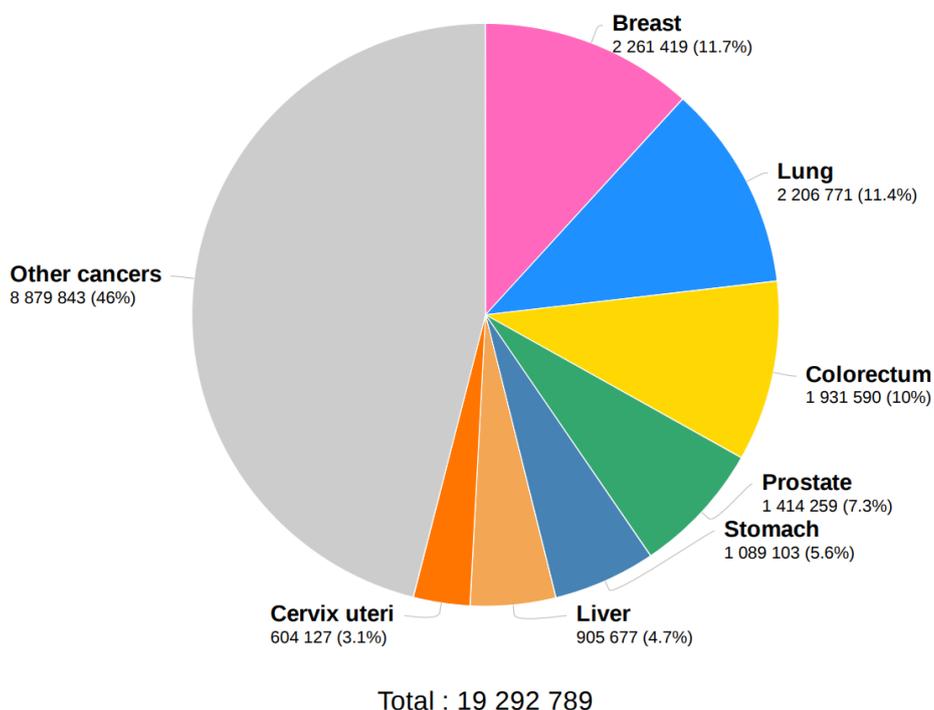


Figure 3 Répartition de l'incidence des cancers en 2020 selon leur localisation, Global Cancer Observatory (iarc.fr)

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0

ii. Arsenal thérapeutique

De nombreuses actions préventives sont envisageables pour la réduction de la prévalence et de la morbidité de ces pathologies. En effet la plupart des cancers sont en lien avec des facteurs de risques comportementaux (alimentation, tabagisme, consommation d'alcool...) ou environnementaux (pollution, rayonnements UV...). L'hétérogénéité des cancers en termes de localisation, d'expression physiopathologique et moléculaire est à l'origine d'un arsenal thérapeutique varié.

a. Chimiothérapie

De nombreux traitements médicamenteux sont aujourd'hui disponibles pour le traitement des cancers. Depuis quelques années, l'apparition des biothérapies avec notamment l'usage des anticorps monoclonaux permet le développement de traitements plus spécifiques, permettant de participer à la réduction des effets indésirables des chimiothérapies classiques (10). La combinaison d'un anticorps monoclonal conjugué à des composés cytotoxiques permet d'allier la spécificité de distribution des biothérapies avec l'efficacité des chimiothérapies, par exemple l'utilisation du Mylotarg® (Gemtuzumab/Ozogarmicin) indiqué dans le traitement de la leucémie aigüe myéloïde (11).

b. Chirurgie

Dans certains cas il est possible de réséquer de manière chirurgicale la tumeur et/ ou les métastases selon leur localisation. La chirurgie peut être associée à des chimiothérapies ou à des séances de radiothérapies avant l'opération afin de limiter la taille de la résection et/ ou après l'opération afin de s'assurer de la bonne élimination des cellules cancéreuses.

c. Radiothérapie

De manière historique les rayons X et gamma sont utilisés pour le traitement et l'imagerie des cancers avec une technique dite de radiothérapie externe. Dans ce cas, la source radioactive est située à l'extérieure du patient et irradie une zone localisée autour de la tumeur, sans distinction particulière. Différentes techniques sont disponibles notamment en fonction de la localisation et de la taille des zones à traiter.

Plus récemment des méthodes de radiothérapie interne ont été développées. Les débuts de cette méthode n'étaient pas spécialement dirigés contre les cellules tumorales mais sur la destruction d'un environnement restreint autour des tumeurs. La curiethérapie, qui consiste en l'implantation de grains radioactifs à proximité de la zone à traiter, illustre parfaitement cette approche. Ce type de thérapie est notamment utilisée dans le cadre du traitement du cancer de la prostate ou encore celui du col de l'utérus. Depuis quelques années on assiste au développement de la radiothérapie interne vectorisée en oncologie, avec l'usage croissant de MRP, sujet de cette thèse. Ce développement est de plus en plus axé sur une approche théranostique.

C. Théranostique

i. Définition

La notion de théranostique correspond à un néologisme combinant les notions de thérapie et de diagnostic. Le principe de cette approche émergente notamment dans la prise en charge oncologique se base sur l'injection d'un même radiotracer visant à réaliser une imagerie médicale, pour diagnostiquer mais aussi assurer un suivi de la pathologie et l'injection d'un MRP à visée thérapeutique (12). Un résumé de l'approche théranostique se trouve en figure 4, illustrée par le couple théranostique Ga-68/ Lu-177.

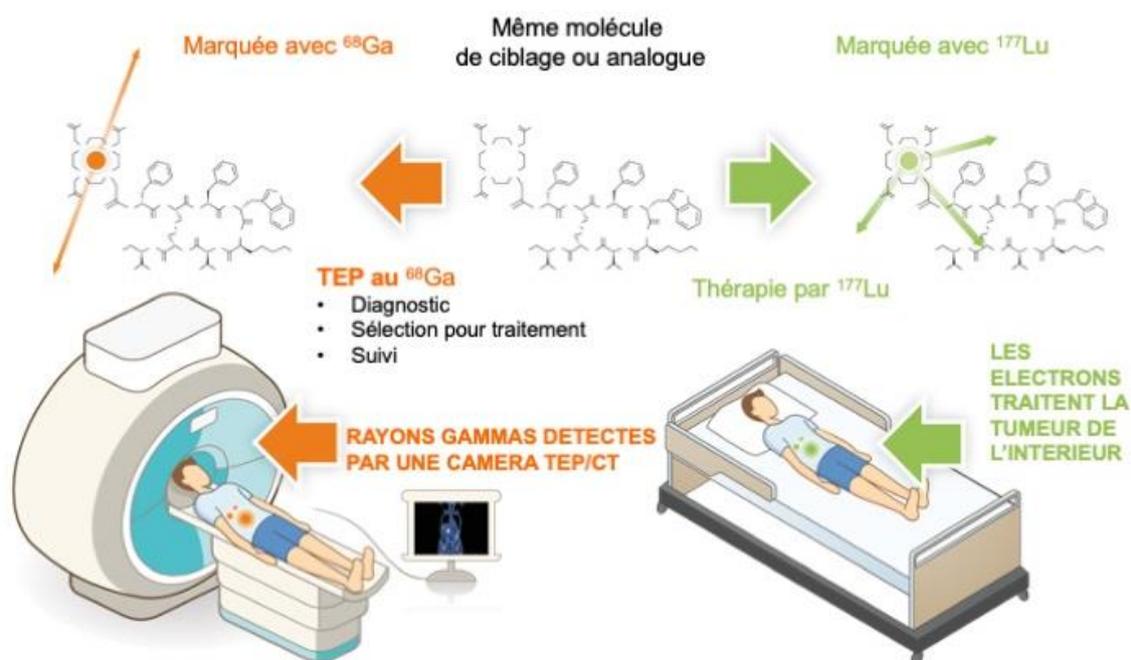


Figure 4 Résumé de l'approche théranostique par l'association $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$, Plateforme Théranostique - Adacap
<https://www.adacap.com/fr/theragnostic-platform/>

La notion de théranostique s'inscrit dans l'évolution actuelle de la prise en charge des patients, et du virage vers la médecine personnalisée où les traitements sont de plus en plus ciblés pour un patient spécifique afin de gagner en efficacité tout en participant à la réduction des effets indésirables (13). En effet, une imagerie permet de sélectionner les patients exprimant la cible du MRP ce qui permet une meilleure utilisation des traitements. L'optimisation de cette balance bénéfice/ risques apparaît nécessaire pour des traitements à forts effets indésirables concernant des populations de plus en plus fragiles et qui ont des coûts très importants pour la société.

ii. Radioéléments impliqués

Le radiotracteur utilisé peut être marqué par deux isotopes différents, comme dans l'exemple cité précédemment mais il peut également être composé d'un unique élément tel que le Tb-155/161, l'Iode-124/131 ou le Cuivre-64/67 (14). Les radioéléments utilisés et leur combinaison dépendent en effet des caractéristiques de leurs rayonnements radioactifs.

On retrouve généralement des combinaisons d'émetteur en théranostique, les plus utilisées sont les combinaisons γ/β^- parmi lesquelles on peut citer l'association Technétium-99/ Rhénium 188 (15,16) ou β^+/β^- , dont un exemple est détaillé dans cette thèse.

Dans certains cas, c'est le même radionucléide qui remplit les deux fonctions de diagnostic et de traitement, c'est le cas notamment de l'Iode, I-123 et I-131, émetteur γ et β^- qui est utilisé pour les scintigraphies et la radiothérapie des cancers de la thyroïde (17).

D. Couple théranostique Gallium/ Lutétium

i. Ga-68

a. *Propriétés physico-chimiques*

Le Ga-68 est un métal mou dont le potentiel d'utilisation en médecine nucléaire a été découvert il y a de nombreuses années. Cependant l'utilisation d'autres radioéléments en imagerie a longtemps été favorisée, du fait de certaines difficultés dans la production de ce radioélément. L'évolution des modalités de production du Ga-68 a conduit à un regain d'intérêt pour ce radioélément ces dernières années en TEP.

Le Ga-68 est un acide fort de $pK_a = 2,6$ qui présente un degré d'oxydation de +III en solution aqueuse. Sa polarité lui confère des caractéristiques similaires au fer, Fe +III, notamment en termes de chélation. Ainsi, il convient de s'assurer de la bonne stabilité d'un complexe formé entre le Ga-68 et le vecteur afin d'éviter que le Ga-68 ne se retrouve en libre circulation dans le sérum et soit alors transporté par la transferrine, habituellement en charge du transport du fer. La libération du Ga-68 de son chélatant, par exemple par des processus d'hydrolyse pourrait avoir un impact négatif sur les images obtenues.

Le Ga-68 a essentiellement une désintégration en β^+ avec une émission de positon d'énergie maximale à 1899 MeV. Une faible partie de sa désintégration en Zn se fait par capture électronique. La demi-vie de ce radioélément est relativement courte, de l'ordre de 68 minutes ce qui implique différentes contraintes dans son utilisation. Le vecteur utilisé pour l'administration du Ga-68 se doit de présenter une distribution rapide, le radiomarquage ne peut être différé de l'injection seulement de quelques heures, la préparation doit donc être extemporanée (18).

Le type d'émission ainsi que la courte demi-vie de ce radioélément induit une source d'exposition radioactive relativement faible pour le patient. Toutes ces caractéristiques rendent le Ga-68 particulièrement adapté pour un usage en TEP, fournissant une imagerie médicale. Un des autres avantages de l'utilisation du Ga-68 est sa production possible grâce à un générateur disponible en laboratoire.

b. Production Ga-68

Le Ga-68 est produit à partir du Ge-68 par capture électronique selon la figure 5 ci-dessous. La désintégration du Ga-68 conduit ensuite à la formation de Zinc.

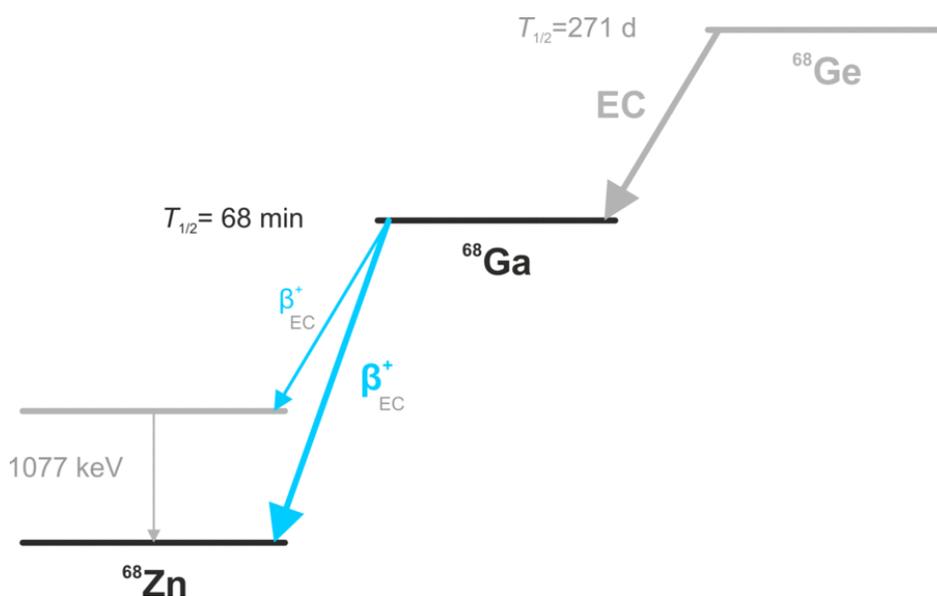


Figure 5 Schéma de désintégration du Ge-68/ Ga-68, Physikalisch-Technische Bundesanstalt (ptb.de)

https://www.ptb.de/cms/en/service-seiten/news/scientific-news.html?tx_news_pi1%5Bnews%5D=7970&tx_news_pi1%5Bcontroller%5D=News&tx_news_pi1%5Baction%5D=detail&tx_news_pi1%5Bday%5D=12&tx_news_pi1%5Bmonth%5D=12&tx_news_pi1%5Byear%5D=2016&cHash=a3af95927d35fab25d6d390873a7bbd9

Le Ga-68 peut être obtenu via un générateur disponible au sein d'un laboratoire qualifié ou d'une radiopharmacie. Ce type de dispositif permet une flexibilité et une autonomie dans la production du Ga-68 ce qui représente un véritable avantage de ce radioélément par rapport à d'autres utilisables en imagerie.

Les premiers générateurs Ge-68/ Ga-68 présentaient le défaut de fournir un éluat de Ga-68 souvent complexé qui nécessitait un traitement contraignant pour être utilisables. Ces anciennes générations de générateurs ont conduit à laisser de côté l'utilisation du Ga-68 en diagnostique, au profit d'autres radioéléments plus facile d'accès comme le Technétium.

Actuellement, les générateurs commercialisés fonctionnent sur la base d'une élution de germanium fixé sur une colonne en matière inorganique (le plus souvent de l'étain ou du titane) par de l'HCl. Ces derniers permettent l'obtention d'un éluat acide de Ga-68 libre avec un bon rendement et une absence d'impuretés. La demi-vie du Ge-68 étant importante, autour de 270 jours, elle permet la conservation du générateur jusqu'à un an (18).

Aujourd'hui en France, il existe différents générateurs Ge-68/ Ga-68 disponibles pour une utilisation du Ga-68 à des fins médicales par la réalisation de TEP en diagnostic ou pour un besoin de suivi (19,20).

c. Applications

Le Ga-68 est un émetteur β^+ utilisé en imagerie TEP, par l'exploitation de ses photons d'annihilation, comme vu dans la partie précédente.

Depuis, la révolution dans le procédé d'élution du Ga-68 et l'apparition de la nouvelle génération de générateur Ge-68/ Ga-68 qui permettent une production aisée et à moindre coût, cet élément est largement utilisé en diagnostic et fait l'objet d'études à des stades d'avancement variés.

On retrouve ainsi des kits destinés à être radiomarqués, notamment dirigés contre le récepteur à la somatostatine et destinés au diagnostic des tumeurs neuroendocrines (TNE). On retrouve l'exemple du SOMAKIT TOC qui dispose d'une AMM pour la réalisation de TEP. Ce médicament est indiqué pour la réalisation de l'examen diagnostique de première intention des TNE gastro entéro hépatiques (21).

Le Ga-68 fait également l'objet de nombreuses études cliniques et précliniques afin de développer de nouveaux outils diagnostics non invasifs de pathologies diverses. Un nanobody dirigé contre le HER2 marqué au Ga-68 est par exemple en cours de développement dans le but de proposer une imagerie TEP du cancer du sein exprimant ce récepteur (22).

ii. Lutétium

a. *Propriétés physico-chimiques*

Le Lu-177 est un émetteur β^- émettant des électrons avec une énergie maximale de 149 keV. Il est également émetteur gamma avec une émission de photons ayant une énergie maximale de 208 keV. Le Lu-177 est ainsi un élément utilisable en radiothérapie mais également en imagerie. Il présente comme le Ga-68 un degré d'oxydation de +III en solution aqueuse ce qui confère aux deux éléments certaines caractéristiques similaires, notamment en termes de chélation. La demi-vie de ce radioélément est de l'ordre de 6,6 jours, soit une décroissance relativement longue en comparaison du Ga-68 (23).

b. *Applications*

L'une des applications cliniques la plus courante du lutétium en radiothérapie vectorisée est celle du traitement des tumeurs neuro endocrines, avec notamment la commercialisation du Lutathera® qui est aujourd'hui le traitement de première intention pour ces tumeurs lorsqu'elles sont non résécables, métastatiques, bien différenciées et qu'elles expriment les récepteurs à la somatostatine (24).

Le lutétium fait également l'objet de nombreuses recherches en ce qui concerne le traitement du cancer de la prostate. La cible choisit est le PSMA, récepteur régulièrement surexprimé par les cellules cancéreuses de la prostate et des métastases (25). Un médicament ciblant le PSMA et marqué au Lu-177, le Lu-PSMA-617 développé par la société AAA, fait l'objet d'une autorisation précoce de mise sur le marché en France depuis le mois de juillet 2022 (26).

iii. Association Ga-68/ Lu-177

L'utilisation du couple Ga-68/Lu-177 fait actuellement l'objet de nombreuses études. On retrouve par exemple l'implication de ce couple de radioéléments dans une prise en charge théranostique du cancer de la prostate ciblant le PSMA (27,28).

Depuis les récentes études cliniques validant l'usage du Lutathera® dans la prise en charge des Tumeurs neuroendocrines exprimant des récepteurs à la somatostatine, de nouvelles études cliniques impliquant le couple théranostique Ga-68/ Lu-177 sont en cours afin d'évaluer l'impact de cette prise en charge sur un nombre variés de cancers exprimant ces récepteurs (29).

E. La cible : la mésothéline

i. Physiologie : Distribution et rôle

La cible choisie dans le cadre de ce projet de développement d'un outil théranostique en oncologie est une glycoprotéine membranaire, la mésothéline. Il s'agit d'un facteur de différenciation des cellules mésothéliales identifié il y a une vingtaine d'années. Cette protéine est physiologiquement présente sur un nombre restreint de cellules, essentiellement des tissus mésothéliaux (30).

Aujourd'hui, aucun rôle physiologique spécifique n'est attribué à la mésothéline. Néanmoins il a été établi que cette protéine ne joue pas de rôle vital dans le développement et la reproduction, après des études d'inactivation du gène codant la mésothéline chez la souris n'entraînant aucune différence phénotypique (31).

ii. Pathologie : Distribution et rôle

| Tumor Type | No. of Patients With MSLN Expression-Positive Disease (%) |
|---------------------------|---|
| Mesothelioma | 290 of 352 (82) |
| Epithelioid | 248 of 261 (95) |
| Sarcomatoid | 0 of 23 (0) |
| Pancreatic adenocarcinoma | 303 of 357 (85) |
| Epithelial ovarian cancer | 346 of 494 (70) |
| High-grade serous | 248 of 332 (75) |
| Endometrioid | 36 of 52 (69) |
| Mucinous | 2 of 19 (11) |
| Clear cell | 11 of 21 (52) |
| NSCLC | 1,157 of 2,036 (57) |
| Adenocarcinoma | 1,082 of 1,686 (64) |
| Squamous | 40 of 188 (21) |
| SCLC | 0 of 55 (0) |
| Esophageal cancer | 25 of 88 (28) |
| Gastric cancer | 312 of 666 (47) |
| Biliary cancer | |
| Extrahepatic | 93 of 98 (95) |
| Intrahepatic | 1 of 10 (10) |
| Other or unspecified | 36 of 85 (42) |
| Colorectal cancer | 27 of 90 (30) |
| Cervical cancer | 1 of 4 (25) |
| Endometrial cancer | 34 of 58 (59) |
| Breast cancer | |
| Triple negative | 33 of 50 (66) |
| Other | 1 of 61 (1.6) |
| Unspecified | 11 of 118 (9) |

Figure 6 Expression de la mésothéline dans différents types de cancer

Hassan R, Thomas A, Alewine C, Le DT, Jaffee EM, Pastan I. Mesothelin Immunotherapy for Cancer: Ready for Prime Time?

Comme on peut le voir sur la figure 6, issue de l'article de Hassan et al. (32), la mésothéline est une protéine exprimée en proportion variable dans différents types de cancers. On retrouve notamment sa présence dans 66% des cancers du sein triple négatif ayant aujourd'hui un faible pronostic de survie étant dépourvus de traitement spécifique, ciblé et efficace. On retrouve de manière générale, une surexpression plus importante dans les tumeurs dérivées de tissus mésothéliaux, comme les cancers épithéliaux des ovaires ou encore le mésothéliome.

A l'inverse de son rôle physiologique, différentes études montrent l'implication de la mésothéline dans les mécanismes physiopathologiques tumoraux. Cette glycoprotéine a en effet des implications anti-apoptotiques et contribue à la prolifération cellulaire, deux mécanismes participant au développement tumoral (33). Le phénomène métastatique est encouragé par la protéine qui joue un rôle dans le phénomène d'adhésion tumorale, cette observation est corrélée avec une forte expression de la mésothéline dans les métastases des tumeurs primaires exprimant la protéine (34). La mésothéline a également une implication dans l'augmentation de la chimiorésistance des cellules (35). De fait, une forte expression de cette protéine est associée à un pronostic de survie défavorable chez les sujets atteints (36).

La faible expression physiologique de cette protéine, ainsi que ses implications physiopathologiques et sa forte expression dans un nombre important de tumeurs solides en font aujourd'hui une cible de choix pour le développement de nouvelles biothérapies en oncologie. Ainsi, de nombreuses études ciblent aujourd'hui cette protéine (37–39).

F. Le vecteur : les nanobodies

i. Généralités

Le vecteur ciblant spécifiquement la mésothéline qui a été développé ici est un nanobody, aussi appelé VHH ou anticorps à domaine unique. Comme on peut le voir sur la figure 7 ci-dessous les nanobodies sont des protéines issues de l'isolement de la partie variable de la chaîne lourde d'immunoglobulines de camélidés. Ces animaux produisant entre autres des IgG uniquement composées de chaînes lourdes (40).

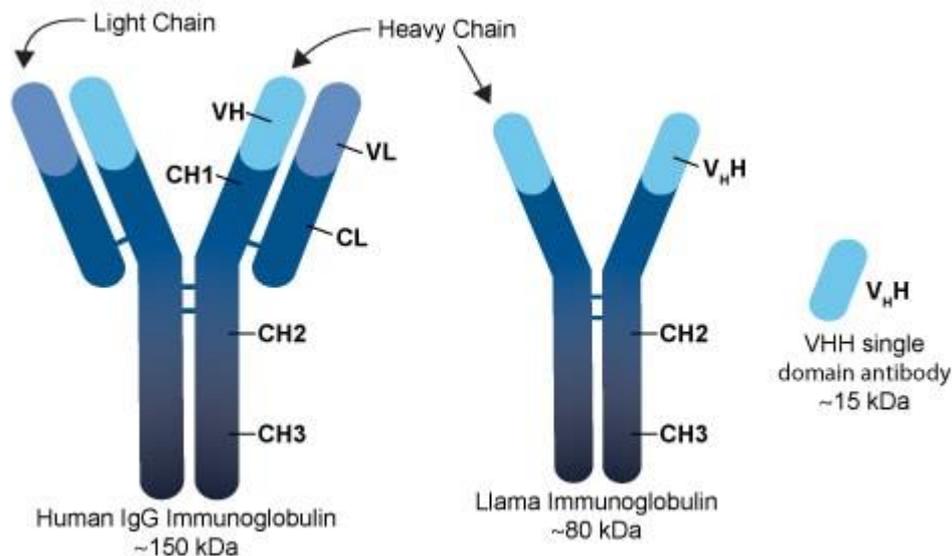


Figure 7 Origine des nanobodies, Llama Antibodies (VHHs) Neutralize Coronaviruses (novusbio.com)

<https://www.novusbio.com/antibody-news/tiny-antibodies-vhhs-from-llama-neutralize-respiratory-coronaviruses>

Les nanobodies présentent différents avantages en comparaison des anticorps monoclonaux utilisés actuellement en biothérapie. Tout d'abord la petite taille de ces molécules permet une meilleure pénétration tissulaire ainsi que la reconnaissance de cibles « enfouies ». Les nanobodies présentent également une rapidité de distribution et une spécificité importante. La clairance rapide de ces peptides de petites tailles par élimination rénale permet de réduire l'exposition radioactive du patient. Ces protéines ont également une solubilité et une stabilité importante (41). La facilité de production et de clonage de ces protéines en font également un vecteur de choix pour les biothérapies en oncologie (42).

Les avantages des nanobodies sont cependant à nuancer par la rétention importante dans le rein, pouvant nuire à la qualité de l'imagerie, ou entraîner des lésions tissulaires dans les cas d'usage en radiothérapie interne vectorisée. De plus, du fait de la petite taille de ces protéines, les modifications apportées à la structure, par exemple la fixation d'un chélatant, peuvent interférer avec les fonctions biologiques du peptide (43).

ii. Applications

Depuis leur découverte, les nanobodies font l'objet de nombreuses études en biotechnologies et plus particulièrement en oncologie. Les nanobodies sont par exemple impliqués dans le développement d'agents théranostiques des cancers du sein exprimant HER2. Ce nanobody fait l'objet d'études précliniques et cliniques impliquant des radioéléments variés, comme le Ga-68, le Lu-177 ou Tc-99m (44).

D'autres études impliquant les nanobodies se font sans besoin de radiomarquage. Actuellement des thérapies impliquant des anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR sont développés comme chimiothérapie. Certaines études précliniques se penchent aujourd'hui sur le développement de nanobodies avec une fonction d'inhibition de l'EGFR dans le but notamment d'atteindre des épitopes non accessibles par les anticorps monoclonaux actuellement disponibles (45).

G. Design du radiomarquage

Dans le cadre du radiomarquage d'un vecteur par un radionucléide, différentes options sont envisageables en fonction de la structure et des caractéristiques physico-chimiques de ces deux éléments.

La première option est la fixation directe de l'élément sur le radiotracer. On peut citer l'exemple du technétium, directement liés aux groupements basiques des chaînes latérales des acides aminés (46).

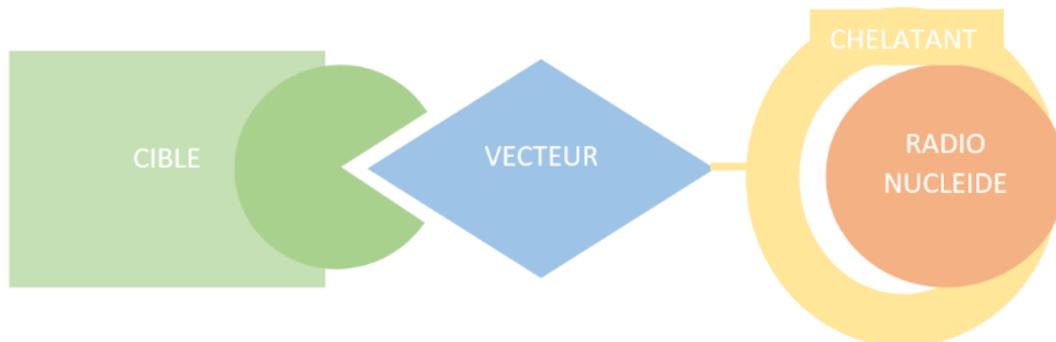


Figure 8 Schéma général d'un vecteur conjugué et radiomarqué

La deuxième méthode de radiomarquage d'un vecteur est représentée par la figure 8 ci-dessus. Dans ce cas, le radionucléide n'est pas directement fixé sur le vecteur, un intermédiaire est nécessaire, on parle de ligand bifonctionnel. Ces molécules intermédiaires ont en effet besoin d'un premier site de fixation compatible avec un ensemble d'éléments du vecteur mais également d'un second site permettant la réaction avec du radionucléide. C'est cette approche qui va être développée dans le cadre de cette thèse.

Un radiomarquage au Tc-99m a déjà été réalisé sur le nanobody anti-mésothéline. Ce dernier utilisait le Tag poly-histidine de la molécule comme site spécifique du radiomarquage via un ligand bifonctionnel tricarbonyle (Kit commercial PSI). Cependant la présence de la queue poly-histidine sur la molécule, est à l'origine d'une rétention rénale importante. Le retrait de ces histidines permettrait de réduire la rétention rénale mais nécessite de faire appel à de nouvelles modalités de fixation d'un radionucléide sur le vecteur adapté au radioélément souhaité (47).

L'étape de fixation du chélatant sur le vecteur est appelée conjugaison, l'optimisation de cette opération est nécessaire en fonction des caractéristiques des molécules afin d'obtenir le meilleur taux de conjugaison correspondant au plus grand nombre de chélatant liés à un vecteur.

Deux catégories principales de chélatants peuvent être établies en lien avec leurs structures. D'un côté les chélatants linéaires, parmi lesquels on retrouve HBED ou H2dedpa, qui ont l'avantage de présenter une cinétique de complexation rapide, pouvant donc être réalisé dans la plupart des cas à température ambiante. D'autre part les chélatants cycliques qui présentent globalement une meilleure stabilité de complexation ce qui explique leur utilisation plus répandue. Deux chélatants macrocycliques ont été ciblés ici, DOTA et NOTA.

i. DOTA

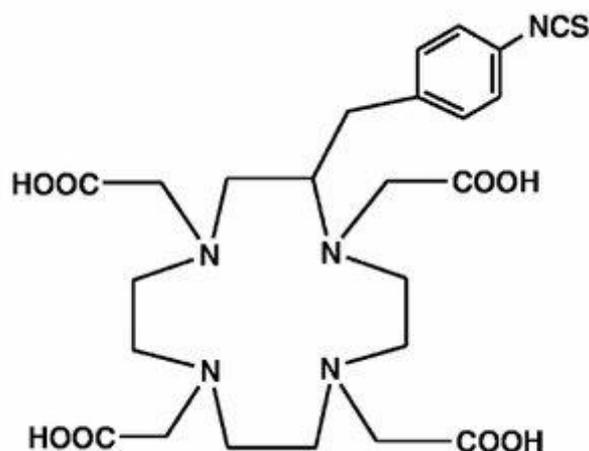


Figure 9 Structure chimique p-SCN-Bn-DOTA

Le DOTA (acide 1, 4, 7, 10-tétraazacyclododécane-1, 4, 7, 10-tétraacétique) présente une bonne affinité de complexation avec le Ga-68 mais une cinétique relativement lente. Dans le cadre de cette étude, un dérivé p-SCN-Bn-DOTA représenté sur la figure 9 ci-dessus est utilisé afin de faciliter la réaction de fixation du chélatant sur le nanobody. Pour accélérer la cinétique de la réaction, le marquage nécessite un chauffage ce qui représente une contrainte, la protéine à marquer devant être thermorésistante. L'avantage de ce chélatant est qu'il peut être utilisé à la fois pour le marquage au Ga-68 mais aussi au Lu-177, ce qui permettrait à l'avenir le développement d'une molécule unique pour le théranostique.

ii. NOTA

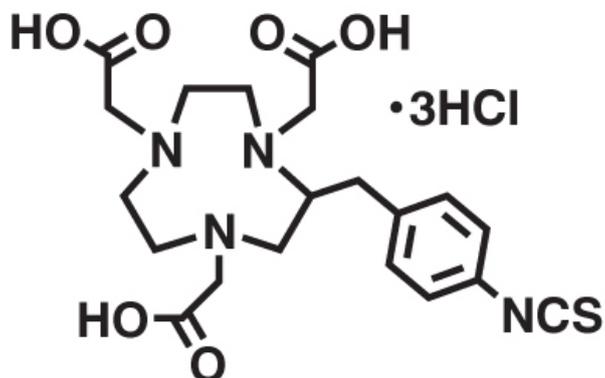


Figure 10 Structure chimique p-SCN-Bn-NOTA

Le deuxième chélatant testé pour la conjugaison est le NOTA. Comme pour DOTA, un dérivé p-SCN-Bn-NOTA, représenté en figure 10 ci-dessus est utilisé dans le cadre des manipulations. Sa structure est plus adaptée au Ga-68 car la taille du cycle formé par les azotes est plus petite et correspond mieux au radioélément. Ce dérivé permet la formation des 6 coordinations nécessaire à la chélation du Ga-68. La cinétique de marquage du NOTA avec le Ga-68 étant très rapide il est possible de s'affranchir du chauffage pour l'étape de radiomarquage, limitant pour le premier chélatant. Cependant cette grande affinité pour les métaux représente aussi un problème car les contaminants potentiellement présents en solution peuvent se fixer aisément au NOTA et ainsi empêcher la fixation du radioélément. Le deuxième point négatif de cette molécule est qu'il n'est pas possible de la marquer avec le Lu-177 qui nécessite 8 coordinations pour sa chélation. Ainsi à long terme, le développement d'un autre chélatant (par exemple DTPA) serait indispensable pour le marquage au Lu-177. Les nanobodies marqués avec les deux radioéléments ne seraient en conséquence pas exactement identiques.

III.

Matériels & Méthodes.

A. Analyses chromatographiques

Avant toute opération sur le vecteur, il convient de le caractériser pour trouver les conditions non dénaturantes applicables pour l'ensemble des étapes. Il est également nécessaire de mettre au point les analyses permettant de suivre les différentes opérations que le nanobody va subir.

L'une des méthodes classiquement utilisées pour la caractérisation et la purification des protéines est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). On distingue trois types principaux d'HPLC selon la caractéristique utilisée pour la séparation des composés présents dans l'échantillon à analyser : la méthode d'exclusion par la taille (SE-HPLC), l'échange d'ions (IEX-HPLC) qui peut être séparée en échange d'anions (AEX-HPLC) et de cations (CEX-HPLC), ainsi que la méthode en phase inverse (RP-HPLC) (48). Chacune de ces méthodes reprend un principe similaire de la circulation d'une phase mobile, ou éluant, à haute pression, dans laquelle sera injectée l'échantillon en solution, au travers d'une phase solide encore appelée phase stationnaire. En sortie de colonne la détection de l'éluat peut être assurée par différents types de détecteurs, le plus souvent un détecteur UV, mais également de la spectroscopie de masse ou encore un détecteur de rayonnements radioactifs qui sera par exemple utilisé dans le cas des analyses de radiomarquage.

Afin d'obtenir des données fiables avec les méthodes ultérieurement développées en HPLC, un spectre UV a été réalisé pour apprécier le λ_{\max} du nanobody anti-mésothéline. Lors de cette opération, le détecteur UV a mesuré l'absorbance sur une gamme de longueur d'onde allant de 240 nm à 310 nm pendant toute la durée de l'analyse. Le λ_{\max} retenu correspond à la longueur d'onde lié à l'absorbance maximale au pic de rétention du nanobody.

III. Matériels & Méthodes.

Dans le cadre de cette étude, deux méthodes d'HPLC ont été développées. Pour les purifications du nanobody post-conjugaison, une première méthode de SE-HPLC en mode semi-préparatif a été mise en place en utilisant une colonne Superdex 200 (10/300 GL) et un tampon d'acétate d'ammonium 0,1M avec un débit de 0,75 mL/min en conditions isocratiques. En appliquant cette méthode, le temps de rétention des molécules est fonction de leur taille. Les petites molécules vont présenter un temps plus long car elles seront davantage retenues par les pores de la phase stationnaire. En effet, plus la taille d'une protéine est petite, plus son temps de trajet au sein de la phase stationnaire sera long car les pores traversés nombreux (49). Ainsi, le vecteur étant une molécule de taille relativement importante il sera élué en premier, suivi du chélatant libre présentant un poids moindre en comparaison. L'éluat correspondant au pic de rétention est alors collecté et contient le vecteur conjugué dans une solution d'acétate d'ammonium disponible pour l'étape ultérieure de radiomarquage.

Concernant les analyses de radiomarquage, une méthode RP-HPLC en mode analytique, plus rapide que la précédente a été développée dans le but d'analyser les taux de marquage du nanobody. La rapidité de l'analyse est nécessaire à cause de la courte demi-vie du Ga-68, plus l'analyse rend un résultat rapide, moins la perte d'activité est importante au cours de cette étape.

Cette méthode appelée phase inverse comporte une phase stationnaire apolaire, souvent une colonne greffée de chaînes aliphatiques plus ou moins longue et une phase mobile composée d'un gradient de solvant organique croissant. Dans cette méthode analytique c'est la différence de polarité entre le Ga-68 libre et le nanobody conjugué et radiomarqué qui permet la séparation des deux composés à l'aide d'un gradient de solvant organique croissant. Pour ces analyses, une colonne Symmetry C4 (150 mm/4,6 mm/5 µm) a été utilisée avec les solvants A (pour la phase aqueuse) : H₂O/TFA0.1% et B (pour la phase

III. Matériels & Méthodes.

organique) : acétonitrile/TFA 0.1% et un débit de 1mL/min. Les gradients utilisés sont illustrés sur la figure 11 ci-dessous.

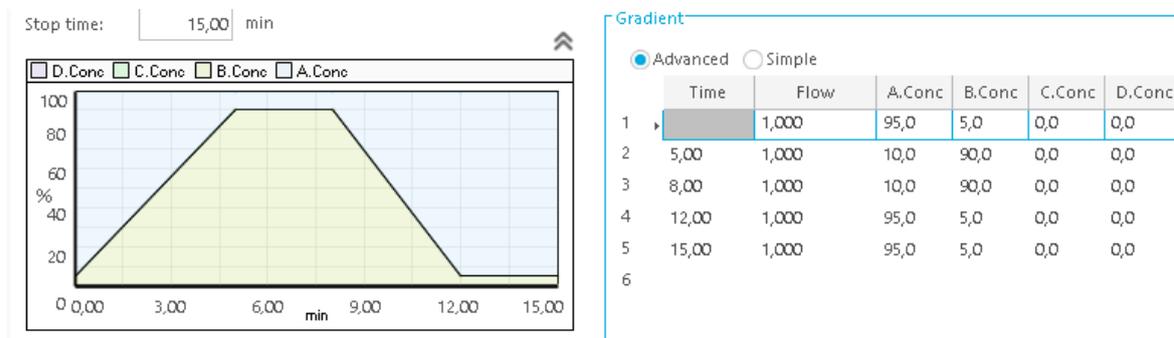


Figure 11 Gradients de solvants utilisés pour la méthode RP-HPLC

B. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une technique utilisée dans le but de caractériser les structures secondaire et tertiaire des protéines. Elle sert notamment à étudier l'effet de l'environnement de la protéine comme le pH, le solvant ou encore la température sur ces structures qui sont en lien étroit avec l'activité biologique de la molécule (50).

Le principe de cette mesure spectroscopique se base sur la différence d'absorption des lumières polarisées circulairement droite et gauche des protéines. Une mesure de l'ellipticité, reflétant la polarisation d'une onde est réalisée en fonction de sa longueur d'onde. Le spectre alors tracé renseigne sur la structure secondaire de la protéine étudiée ainsi que sur l'environnement des acides aminés. On retrouve sur la page suivante, en figure 12 des exemples de spectres de dichroïsme circulaire pour des protéines avec des structures secondaires contenant principalement des hélices alpha (en rouge), des feuillets beta (en vert) ainsi que des structures désorganisées (en bleu). Cette technique est applicable aux

III. Matériels & Méthodes.

molécules chirales. Dans le cadre des protéines, c'est la liaison peptidique qui joue le rôle de chromophore. Chaque structure secondaire possède un spectre qui lui est propre avec des pics d'ellipticité positif et négatifs qui lui sont propres. Pour le cas des hélices alpha on note en pics négatifs pour une longueur d'onde de 220 nm (51).

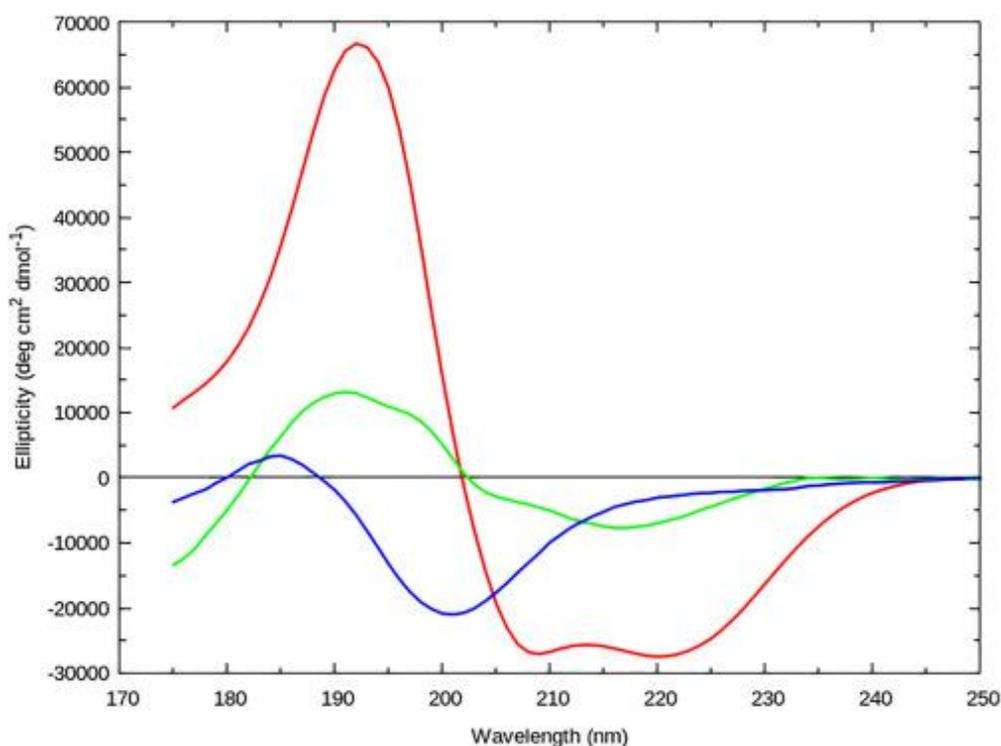


Figure 12 Spectres de trois différentes structures secondaires caractéristiques obtenus en dichroïsme circulaire, *Electronic Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins: Chem (cell.com)*

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451929419303171>

Une analyse de dichroïsme circulaire a ainsi été menée pour observer l'impact des variations de température sur la structure du vecteur. Différents spectres ont été réalisés pour des température allant de 25°C à 80°C. La comparaison normalisée de ces spectres renseignera ainsi sur la modification de la structure secondaire de la molécule qui pourrait impliquée une modification de ses propriétés biologiques. Durant la procédure de radiomarquage, il est parfois nécessaire de chauffer les protéines, il est donc important de se renseigner sur les conditions supportées par la molécule.

C. Conjugaison/ Purification/ Analyses

L'une des étapes du développement de cet outil thérapeutique est la fixation du chélatant sur le vecteur, aussi appelée étape de conjugaison. Afin de l'optimiser, différentes conditions (P1 à P5) ont été testées avec les dérivés de NOTA et de DOTA. Cette étape doit permettre la fixation des chélatants sur le nanobody de manière efficace, reproductible et stable afin d'assurer par la suite un bon radiomarquage de la protéine.

La conjugaison est réalisée entre les chélatants fonctionnalisés et la chaîne latérale des lysines présentes dans le nanobody. La structure du vecteur de référence comprend 4 lysines, on peut donc théoriquement attendre un mélange de nanobodies conjugués avec entre 1 et 4 chélatants fixés en nombre et sur des positions aléatoires. Ainsi, dans un second temps la structure du nanobody anti-mésothéline de référence (A1-His) a été modifiée afin de ne laisser plus qu'une lysine disponible pour la conjugaison. Cette opération est réalisée dans le but d'obtenir une molécule unique post-conjugaison et non un mélange hétérogène de vecteurs marqués. Les mutants ainsi produits seront nommés A1K1-His, A1K2-His, A1K3-His et A1K4-His en fonction de la position de la lysine restante dans la structure. L'optimisation des conditions de conjugaison sera opérée sur A1-His puis les conditions sélectionnées seront appliquées aux différents mutants par la suite. Selon les données issues des différentes étapes de conjugaison, de radiomarquage et également de biodistribution, un seul de ces mutants sera retenu pour la poursuite du développement du radiotraceur.

III. Matériels & Méthodes.

L'optimisation de la conjugaison a été réalisée sur le nanobody de référence A1-His. Chaque condition de conjugaison est ainsi testée en utilisant 500µg de nanobody A1-His à 1,5 mg/mL conservé dans du Tris à pH 7. Le tampon Tris contient une fonction NH₂ ce qui le rend inadapté à la réaction de conjugaison. Dans un premier temps le tampon du nanobody est remplacé par du carbonate de sodium, un mélange de NaHCO₃ et Na₂CO₃ à 0.05M à pH 8-8,5 en utilisant une colonne de dessalage microspin. Les nanobodies sont ensuite mis au contact du chélatant activé (DOTA ou NOTA) à une concentration de 3 mg/mL dans du bicarbonate de sodium à pH 8-8,5 sous agitation à 300 rpm/min. La réaction est arrêtée à l'issue du temps imparti par une diminution du pH (autour de 7) à l'aide d'une solution d'HCl à 0,1M.

Les nanobodies conjugués de chacune des conditions sont purifiés par SE-HPLC, dans le but d'éliminer les chélatants en excès présents lors de l'étape de conjugaison. Les éluats récoltés dans un tampon acétate d'ammonium à 0,1M, pH6-6.5 sont dosés par méthode spectroscopique puis envoyés en analyse de masse afin d'estimer les taux de conjugaison. L'analyse de masse est réalisée par MALDI-TOF-MS. Cette méthode permet d'obtenir la masse des protéines en fonction de leur vitesse de déplacement qui varie selon leur taille sous l'effet d'un courant électrique (52).

Des essais de radiomarquage dans des conditions non optimisées ont été réalisés pour chacune des conditions afin d'avoir un aperçu de la qualité de la conjugaison. Les critères de sélection des meilleures conditions ainsi que leur méthode d'observation sont résumés dans le tableau 1 en page suivante.

III. Matériels & Méthodes.

| Critère évalué | Mesure effectuée |
|------------------------------|--|
| Rendement de la purification | Dosage de l'échantillon |
| Pureté post-conjugaison | Spectre chromatographique de la purification |
| Taux de conjugaison | Analyse de masse |
| Qualité du radiomarquage | RP-HPLC |

Tableau 1 Evaluation des critères de conjugaison

Une fois les conditions optimales déterminées, elles seront appliquées par la suite pendant l'ensemble du projet. Les protéines une fois conjuguées sont aliquotées après dosage par 100µg et conservées à - 80°C, afin d'être utilisées par la suite pour l'optimisation du radiomarquage.

i. Optimisation des conditions de conjugaison A1-His avec DOTA

Concernant le chélatant dérivé de DOTA les conditions testées sont décrites ci-dessous. Pour chaque essai, 0,5 mg de A1-His à 1,5 mg/mL dans un tampon carbonate de sodium ont été incubé à 25°C avec :

- Un excès de 20M de chélatant, pH 8, 3H (**P1**).
- Un excès de 20M de chélatant, pH 8, 1H30, répété 2 fois (**P2**).
- Un excès de 50M de chélatant, pH 8, 3H (**P3**).
- Un excès de 20M de chélatant, pH 9, 3H (**P4**).
- Un excès de 50M de chélatant, pH 9, 3H (**P5**).

III. Matériels & Méthodes.

ii. Optimisation des conditions de conjugaison A1-His avec NOTA

Les conditions P1, P2 et P5 ont également été essayées pour la conjugaison du vecteur avec le dérivé fonctionnalisé de NOTA. Les essais de marquage ainsi que l'analyse de masse sur P1 et P2 montrant une contamination sur le nanobody conjugué ont fait arrêter les essais avec ce chélatant. Un dernier essai a été réalisée avec la condition P5 sur une nouvelle production de nanobody.

iii. Stabilité A1-His conjugué

La stabilité du nanobody conjugué est également vérifiée après conservation à -80°C. Après 1 puis 2 mois de congélation un aliquote est décongelé pour subir une nouvelle analyse de masse et un essai de radiomarquage. Ces tests sont également réalisés à 1 et 2 ans, après correction de concentration.

iv. Conjugaison des dérivés de A1-His au DOTA et suivi de stabilité

Une fois les conditions optimales de conjugaison trouvées sur le nanobody de référence A1-His pour les deux chélatants (NOTA et DOTA) elles sont appliquées sur l'ensemble des mutants du nanobody. L'objectif étant de sélectionner le mutant avec le meilleur taux de conjugaison. De la même manière le bon déroulement de la conjugaison est apprécié juste après la réalisation de cette étape et un suivi de la stabilité dans le temps est réalisé.

D. Mise au point de radiomarquage de A1-His au Ga-68

Après chaque série de conjugaison, purification et analyses, le radiomarquage est appliqué sur les nanobodies conjugués. Les premiers essais ont été réalisés en conditions non optimisées avec 400 μL de nanobody, dans de l'acétate d'ammonium à 0,1M, correspondant à 100 μg . 400 μL d'éluat de Ga-68 avec une activité proche de 120 MBq y ont été ajoutés pour une durée de 15mn. Pendant cette étape le nanobody conjugué avec DOTA a été chauffé à 60°C. Le radiomarquage du nanobody-NOTA a été réalisé à température ambiante.

Les échantillons radiomarqués sont analysés par RP-HPLC directement après le radiomarquage. Ils sont de nouveau analysés avec la même méthode 2H plus tard afin d'obtenir des données concernant la stabilité du marquage.

A l'issue de ces analyses, une pureté radiochimique (PRC) des marquages peut être définie. Elle correspond au rapport exprimé en pourcentage de l'activité du radionucléide sous la forme attendue, c'est-à-dire fixée au vecteur, sur l'activité totale dans la préparation. La PRC est obtenue en comparant les aires des pics de rétention du Ga-68 libre et celle du nanobody marqué. L'objectif de pureté radiochimique des marquages est fixé ici à 90%, c'est-à-dire un maximum de 10% de Ga-68 libre dans la solution post-marquage.

$$PRC = \frac{A_{nanobody}}{A_{Totale}} \times 100 \geq 90 \%$$

L'optimisation du radiomarquage vise à trouver les paramètres idéaux afin d'atteindre la meilleure PRC : concentration, pH, activité spécifique, température, temps d'incubation et stabilité de la réaction. Dans le cadre de cette thèse l'optimisation du radiomarquage a été effectuée sur le pH, le temps d'incubation et l'activité spécifique (activité par unité de masse de nanobody).

III. Matériels & Méthodes.

i. Optimisation du pH

Une étude d'optimisation du pH de l'étape de radiomarquage a été réalisée sur le A1-His-DOTA. Le nanobody étant conservé à un pH de 6,5, les pH 3, 4 et 5 ont été obtenus en ajustant la solution avec de l'acétate d'ammonium à 1M après l'ajout de 400 μ L de l'éluat de Ga-68 (pH 1-2). Les autres paramètres sont inchangés afin d'observer uniquement l'impact du pH sur la réaction. Les différentes valeurs de pH ont été mesurées à l'aide de papier pH.

ii. Optimisation du temps d'incubation

L'une des optimisations possibles concernant le radiomarquage du nanobody par le Ga-68 concerne le temps d'incubation de l'étape de radiomarquage. En effet, comme exposé en introduction, la demi-vie courte de cet élément implique une contrainte temporelle importante sur la production d'un MRP marqué au Ga-68.

Lors des tests menés jusqu'à présent la durée d'incubation entre le nanobody conjugué et le radionucléide était de 15mn, ce qui représente environ un quart de la demi-vie du Ga-68. Une étude de Breeman et al. (53) s'intéressant à l'optimisation du radiomarquage d'un peptide conjugué par DOTA avec le Ga-68 montre qu'une durée d'incubation de 5min peut être suffisante pour obtenir une pureté radiochimique proche de 100%. Ainsi des durées d'incubation de 5, 10 et 15 minutes ont été testées, en gardant les autres paramètres du radiomarquage inchangés.

III. Matériels & Méthodes.

iii. Augmentation de l'activité spécifique

La troisième optimisation effectuée sur l'étape de radiomarquage du nanobody conjugué dans le cadre de cette thèse est l'augmentation de l'activité spécifique. Cette dernière correspond à l'activité d'une substance par unité de masse. Ainsi, 3 différentes conditions ont été testées. 100µg de nanobody ont été marqués avec 2, 4 et 6 mCi, correspondant à une activité spécifique de 10, 20 et 30 MBq par nmoles de nanobody.

iv. Suivi de stabilité in vitro

Des essais de stabilité in vitro ont été menés sur sang de souris. Pour ce faire, le nanobody radiomarqué est mis en contact avec du sérum de souris à une concentration finale de 37 MBq/mL. La solution est ensuite incubée à 37°C. Des prélèvements sont réalisés à intervalle de temps déterminés afin d'être analysés. Les prélèvements sont alors centrifugés à 4000g pendant 2 min pour séparer les cellules sanguines. Ils sont de nouveau centrifugés à 13000g pendant 3 minutes après l'ajout de TCA10% pour précipiter les protéines de grandes tailles. La partie du sérum sans protéines est alors analysé par radio-HPLC dans les mêmes conditions que lors du radiomarquage.

E. Radiomarquage des dérivés de A1-His

Une fois les conditions optimales de radiomarquage trouvées, elles sont appliquées aux différents mutants précédemment conjugués. Les essais de radiomarquage sur les mutants sont uniquement réalisés pour les nanobodies conjugué avec le dérivé fonctionnalisé de DOTA. L'analyse RP-HPLC est réalisée juste après le radiomarquage (T0) et répétée 2H après afin d'apprécier la stabilité du radiomarquage. Une condition avec un ajout d'acide

III. Matériels & Méthodes.

gentisique dans la solution au moment du radiomarquage est également réalisée pour chacune des conditions dû à un problème initial de stabilité. L'ajout d'un agent antioxydant pourrait en effet aider à une meilleure stabilité du complexe chélatant/ Ga-68.

F. Dosage.

Le dosage des nanobodies représente une donnée importante pour le développement du radiotraceur. La concentration des protéines avant la conjugaison est obtenue grâce à une méthode de quantification en gel SDS-page (54) par l'équipe en charge de la production et de la modification structurale du nanobody. Cette concentration est fluctuante entre les différentes productions mais généralement comprise entre 1 et 2 mg/ mL dans un tampon Tris, pour une meilleure conservation du nanobody.

A l'issue de l'étape de conjugaison et notamment de la purification du vecteur par SE-HPLC, une diminution importante de la concentration des protéines peut être observée. Le dosage de l'éluat à l'issue de la purification représente une donnée clé pour le bon déroulement des étapes suivantes. En effet, le ratio vecteur conjugué/ Ga-68 lors du radiomarquage est un paramètre essentiel pour la bonne chélation du radioélément et l'obtention d'une PRC adéquate. De plus, lors du passage à l'injection du nanobody radiomarqué avec le Lu-177, la dose injectée, corrélée à la quantité de nanobody, est un facteur essentiel de la bonne réussite du traitement en termes d'efficacité et de contrôle des effets indésirables. Ainsi, afin d'effectuer le dosage des nanobodies après conjugaison trois différentes méthodes ont été réalisées.

III. Matériels & Méthodes.

i. Dosage spectroscopique

Dans un premier temps, les dosages ont été réalisés par spectrophotométrie. La longueur d'onde du spectrophotomètre est fixée à 277 nm correspondant à la longueur d'onde maximale d'absorption des acides aminés aromatiques (55). L'absorbance ainsi mesurée est corrélée à la concentration en protéine de l'échantillon via la loi de Beer-Lambert ci-dessous :

$$A = \varepsilon . l . c$$

Avec

- A : l'absorbance
- ε : le coefficient d'absorption molaire (spécifique à la molécule) en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- l : la largeur de la cuve en cm
- c : la concentration molaire de la molécule en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Certains problèmes de stabilité des nanobodies conjugués, aliquotés et conservés à -80°C ont fait supposer un défaut dans le dosage. L'une des explications potentielles est qu'à la longueur d'onde de 280nm, les chélatants préalablement fixés sur le nanobody peuvent interférer avec les mesures, par la modification du coefficient d'absorption molaire. En effet, ces composés présentent une forte absorption pour cette longueur d'onde, la concentration alors obtenue pourrait être surestimée.

Ce raisonnement amène à la nécessité de développer de nouvelles méthodes de quantification de la protéine post-conjugaison afin de s'affranchir du potentiel biais posé par les chélatants. Dans ce but, deux autres méthodes de dosage des protéines ont été appliquées aux nanobodies conjugués.

III. Matériels & Méthodes.

ii. Méthode de Bradford

La méthode de Bradford se base sur les différences d'absorbance des formes cationiques et anionique du bleu de Coomassie. Le bleu de Coomassie est une molécule qui présente différentes formes : les formes libres, verte et rouge, qui absorbent respectivement à 470nm et 650nm et la forme bleue, liée aux protéines qui absorbe autour de 595nm. Ainsi, l'absorbance mesurée à 595nm d'une solution contenant la protéine à doser avec du bleu de Coomassie est le reflet de la concentration protéique de la solution (56).

Le protocole appliqué pour le dosage du nanobody est issu des données du fournisseur du kit de dosage (Bleu de Coomassie et BSA), ThermoFischer Scientific. Une gamme étalon est établie en réalisant des dilutions de BSA allant de 25 µg/mL à 2000 µg/mL dans une solution d'Acétate d'ammonium à 0,1M. 5µL d'étalon ou d'échantillon sont disposés dans les puits d'une plaque 96 puits, auxquels sont rajoutés 250µL de bleu de Coomassie. La plaque est incubée à température ambiante pendant 10mn avant d'être lu dans un lecteur de plaque à une longueur d'onde de 595nm.

La courbe d'étalonnage tracée grâce à la gamme de BSA permet d'obtenir une corrélation entre l'absorbance mesurée et la concentration en protéine dans l'échantillon.

iii. Mesure fluorimétrique.

Enfin, un fluorimètre Qubit 4TM, de la marque ThermoFisher Scientific, a été utilisé pour le dosage des nanobodies post-conjugaison. Les dosages ont été réalisés selon les instructions du fabricant.

IV. Résultats.

A. Analyses chromatographiques

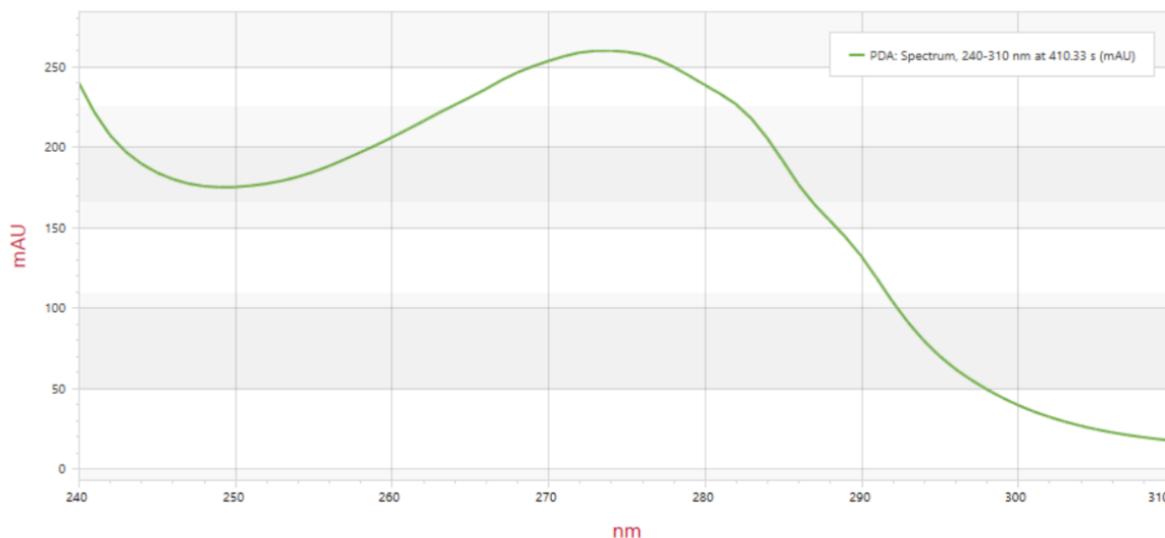


Figure 13 Spectre d'absorption au temps de rétention du nanobody anti-mésothéline en fonction de la longueur d'onde

Le spectre UV du nanobody anti-mésothéline présent en figure 13 ci-dessus montre un λ_{max} de 275 nm. Ces données sont étayées par l'annexe 1 représentant le profil 3D de la molécule qui mesure l'absorbance en fonction du temps et de la longueur d'onde de. Elles sont également complétées par l'annexe 2 représentant les absorbances mesurées pour différentes longueurs d'ondes comprises entre 275 et 280 nm autour du temps de rétention de la molécule. Le λ_{max} de 275 nm sera donc utilisé pour la détection de la molécule lors des analyses chromatographiques tout au long de cette étude.

Les analyses de conjugaison donnent un temps de rétention autour de 23 mn pour le nanobody en SE-HPLC dans des conditions préparatives pour la méthode développée en vue de la purification post-conjugaison. Un exemple de profil de A1-His en SE-HPLC est donné en page suivante sur la figure 14.

IV. Résultats.

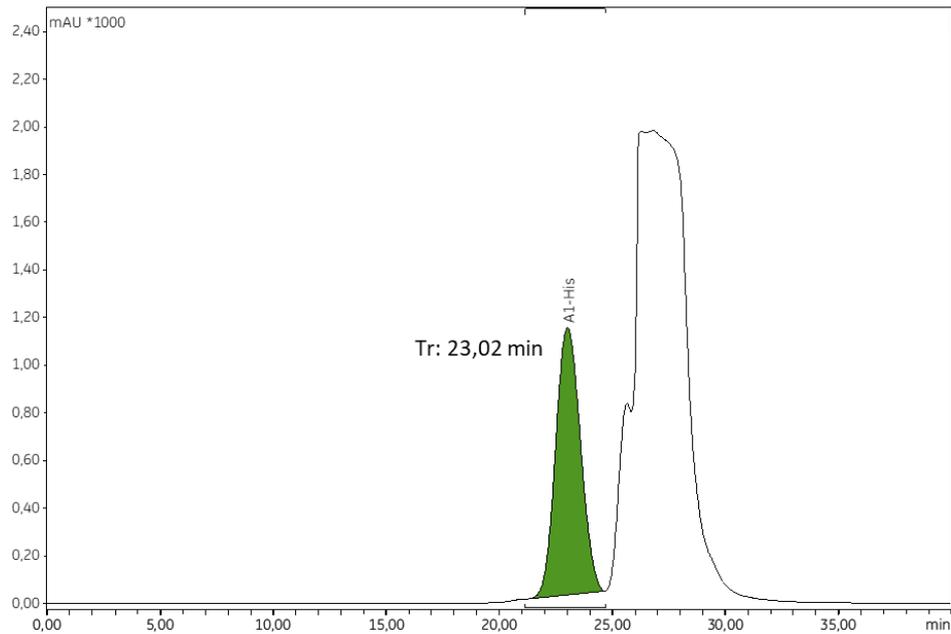


Figure 14 Exemple de profil A1-His en SE-HPLC

On remarque sur le profil ci-dessus un premier pic en vert avec un temps de rétention de 23,02 mn correspondant au nanobody A1-His. Le pic suivant, plus important correspond aux chélatants en excès qui seront éliminés à l'issue de l'étape de purification.

Au cours de ces différentes analyses, une longueur d'onde de 225 nm est utilisée pour la détection des chélatants, elle correspond à l'absorbance du groupement carboxylique et n'est pas spécifique de la protéine. Cette longueur d'onde de détection n'est pas adaptée pour la purification et la détection du nanobody anti-mésothéline, elle aura surtout une visée informative pour apprécier la présence de chélatants libres post-conjugaison.

Le temps de rétention pour la méthode RP-HPLC, utilisée pour les analyses du radiomarquage est de 9 mn.

B. Dichroïsme circulaire

Un échantillon de A1-His avec une concentration de 0,375 mg/mL a été analysé en dichroïsme circulaire. Des profils de spectroscopie de 205 à 260 nm pour des températures allant de 25°C à 80°C ont été obtenus, ils sont présents en figure 15 ci-dessous.

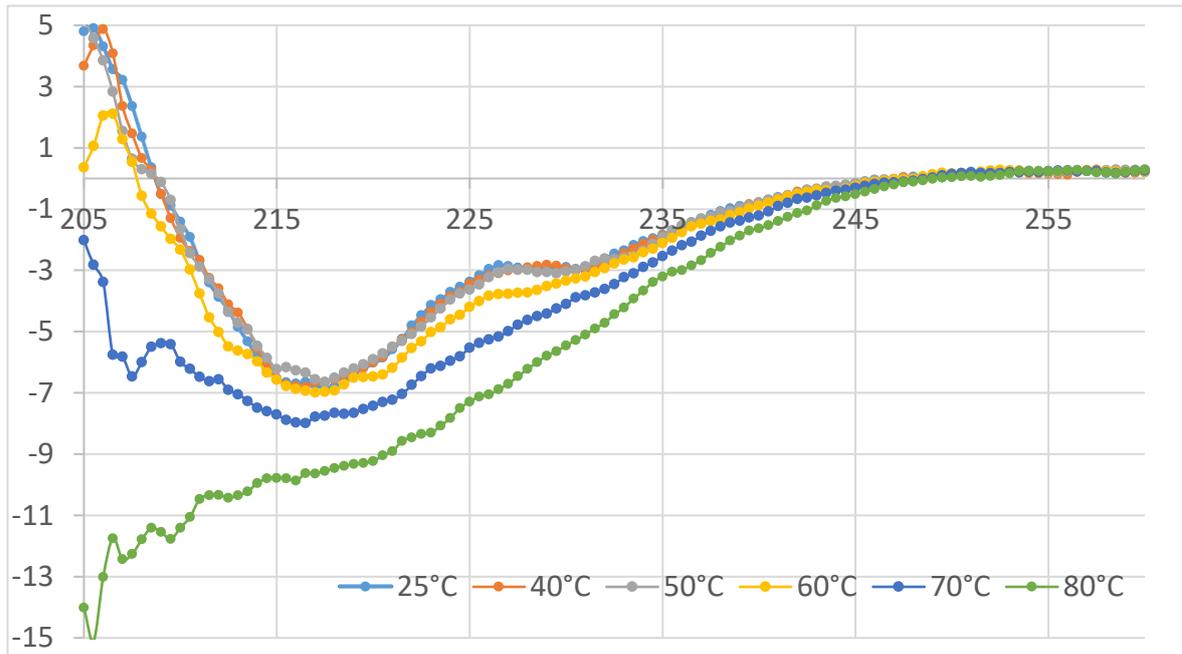


Figure 15 Profils de dichroïsme circulaire de A1-His 205 à 260 nm et de 25°C à 80°C

La figure 16 en page suivante correspond à la normalisation des spectres de dichroïsme circulaire du nanobody anti-mésotbéline. Les données sont issues de la longueur d'onde de 216 nm de ces spectres qui correspond à la longueur la plus représentative des changements de températures. Cette figure représente ainsi la proportion de molécules dénaturées en fonction de l'augmentation de la température du milieu.

IV. Résultats.

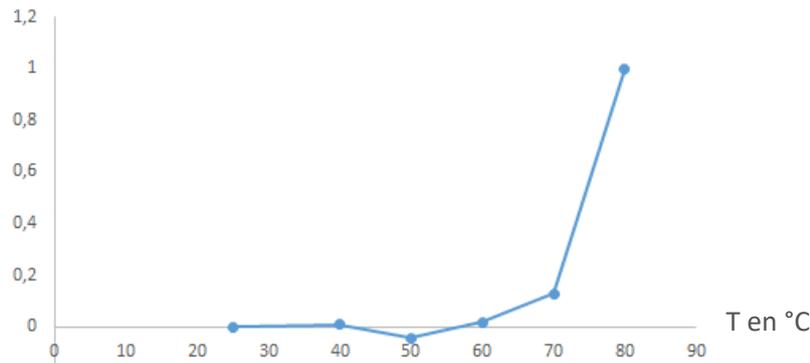


Figure 16 Normalisation des résultats de dichroïsme circulaire pour le nanobody anti-mésothéline à 216nm

D'après ces données, un chauffage au-delà de 60°C endommage la structure secondaire de la molécule, il ne faut donc pas chauffer le nanobody à des températures trop importantes. En effet, après une modification structurale liée à une modification de température une protéine ne retrouve pas nécessairement sa structure d'origine lors du refroidissement. Etant donné que la réaction de conjugaison est liée à la structure du nanobody, il est important de s'assurer que cette dernière ne soit pas modifiée.

Cette de température de chauffage maximale peut représenter un facteur limitant pour le radiomarquage du vecteur conjugué avec DOTA, cette étape ayant une cinétique assez lente, elle nécessite d'être réalisée à des températures élevées.

C. Conjugaison/ Purification/ Analyses

Dans un premier temps, les 5 conditions de conjugaison ont été testées sur différents échantillons de A1-His avec DOTA et NOTA. Une fois les conditions optimales trouvées, elles ont été appliquées à l'ensemble des dérivés de A1-His.

i. Optimisation des conditions de conjugaison A1-His avec DOTA

Les analyses de masse de chacune des conditions permet d'apprécier la qualité de la conjugaison. La masse liée à un signal permet de mesurer le taux de conjugaison, c'est-à-dire le nombre de chélatant fixés sur le nanobody. La comparaison de l'intensité des pics du nanobody non conjugué avec le nanobody conjugué permet d'obtenir le rendement de cette étape. Ces analyses de masse peuvent également permettre de déceler la présence de contaminant, en cas de poids moléculaires anormaux. L'ensemble des spectres issus des analyses de masse ainsi que les profils de purification sont présentés pour chacune des conditions testées sur le nanobody de référence.

Les profils de purification issus de la méthode HPLC, renseigne sur la proportion de A1-His conjugué, ainsi que sa pureté. Idéalement un premier pic représente le nanobody conjugué et un second, d'intensité plus élevé représente les chélatants libres. Le rendement de purification a été estimé en comparant la quantité de nanobody récupéré avec la quantité initialement présente dans le mélange de réaction de conjugaison.

IV. Résultats.

La condition P1 (un excès de 20M de chélatant, pH 8) a donné un bon rendement de purification, une bonne pureté après conjugaison mais présente un faible taux de conjugaison. On remarque sur le profil d'analyse de masse en figure 18 une majorité de nanobody non-conjugué. Les essais de radiomarquage au Ga-68 présentent une faible PRC.

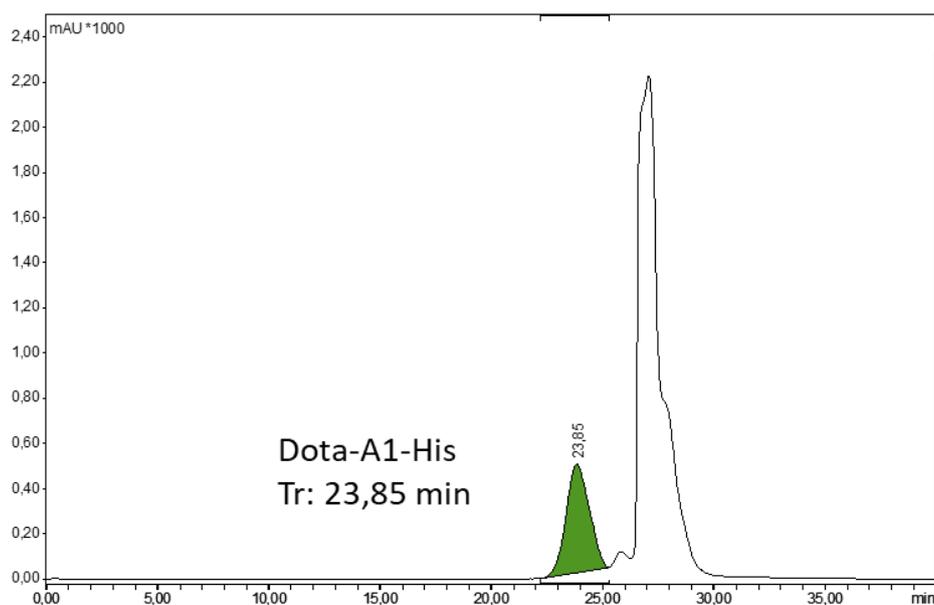


Figure 17 Profil de purification SE-HPLC A1-His-DOTA en condition P1

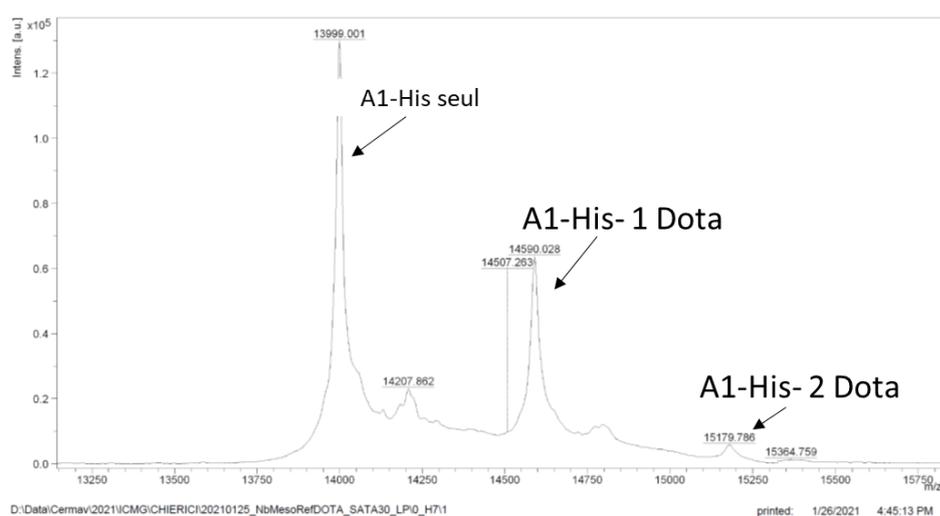


Figure 18 Analyse de masse A1-His-DOTA en condition P1

IV. Résultats.

La condition P2 (un excès de 20M de chélatant, pH 8, 2 fois) a donné un faible rendement de purification et montre l'apparition d'une impureté lors de l'analyse par SE-HPLC, visible en figure 19. Cependant elle présente un meilleur taux de conjugaison que P1 d'après l'analyse de masse. On remarque une majorité de nanobodies mono-conjugué et une faible proportion bi-conjugué et non conjugué. Les essais de radiomarquage par le Ga-68 ont une bonne PRC.

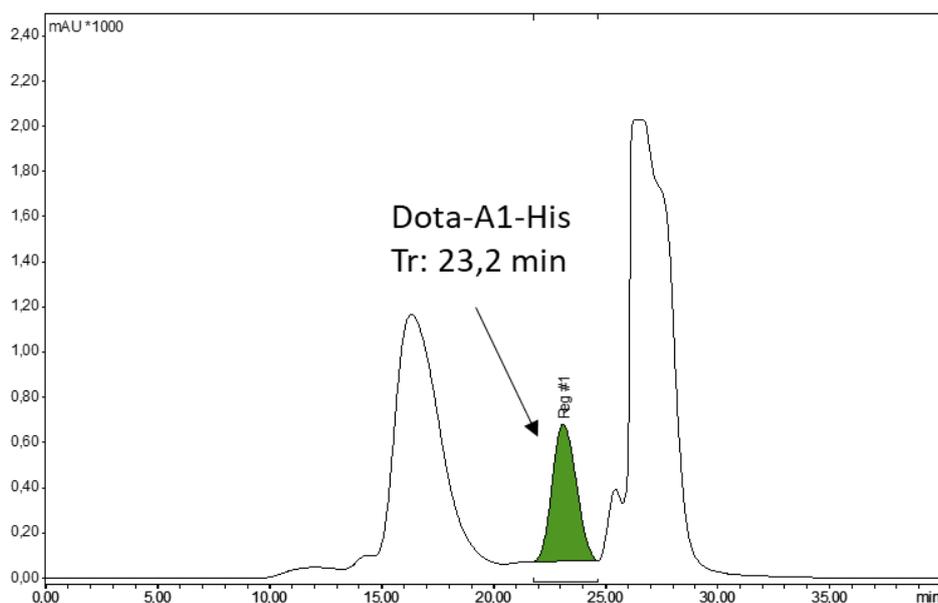


Figure 19 Profil de purification SE-HPLC A1-His-DOTA en condition P2

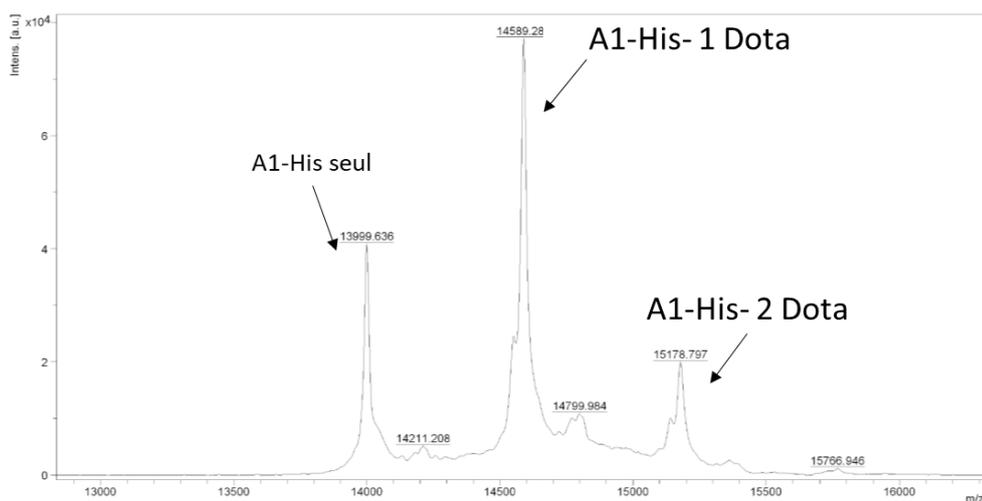


Figure 20 Analyse de Masse A1-His-DOTA en condition P2

IV. Résultats.

La condition P3 (un excès de 50M de chélatant, pH 8) présente un faible rendement de purification et une bonne pureté. Cette condition donne un taux de conjugaison moyen avec un mélange de A1-His mono-conjugué et bi-conjugué. Les essais de radiomarquage au Ga-68 sont bons avec une pureté radiochimique de 80%.

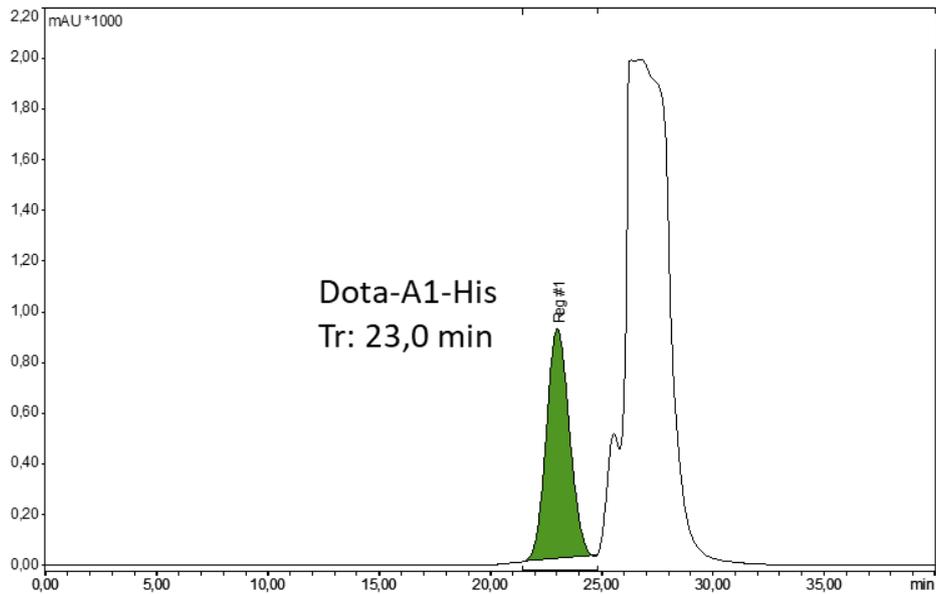


Figure 21 Profil de purification SE-HPLC A1-His-DOTA en condition P3

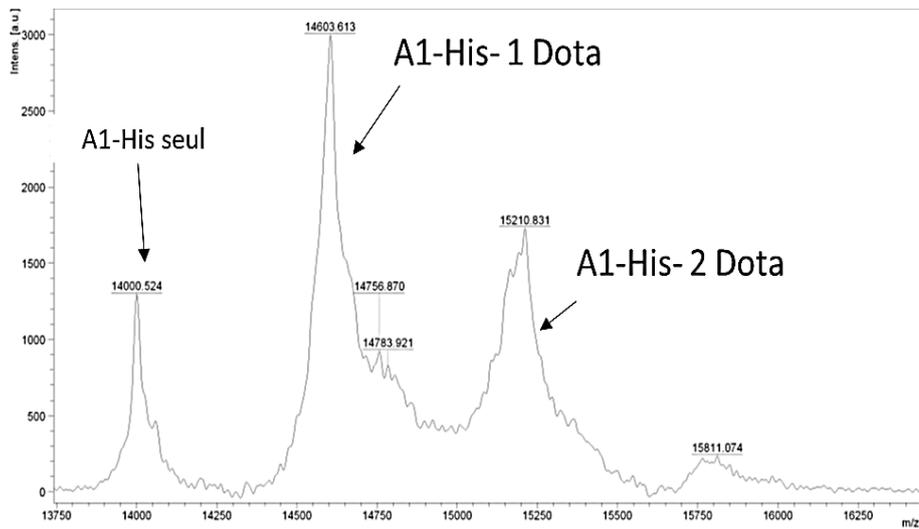


Figure 22 Analyse de masse A1-His-DOTA en condition P3

IV. Résultats.

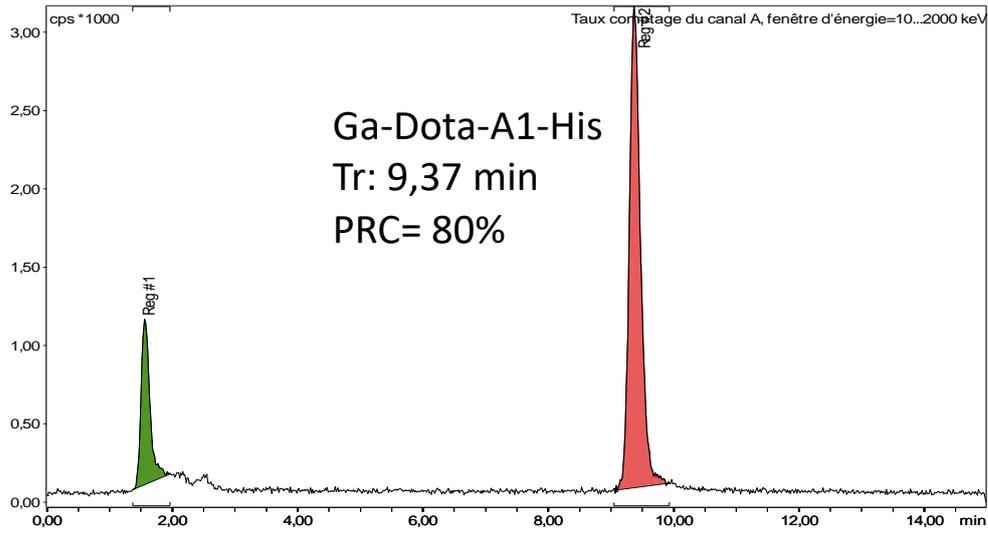


Figure 23 Profil de radiomarquage A1-His-DOTA en condition P3

La condition P4 (un excès de 20M de chélatant, pH 9) a donné un très bon rendement de purification ainsi qu'une bonne pureté post-conjugaison. Le taux de conjugaison ainsi que les essais de radiomarquage sont corrects.

IV. Résultats.

La condition P5 (un excès de 50M de chélatant, pH 9), présente un très bon rendement de purification ainsi qu'une absence d'impuretés. C'est cette dernière condition qui présente le plus haut taux de nanobodies conjugués, avec une quasi-absence de nanobody non-conjugué ainsi qu'une part égale de nanobodies mono et bi-conjugués.

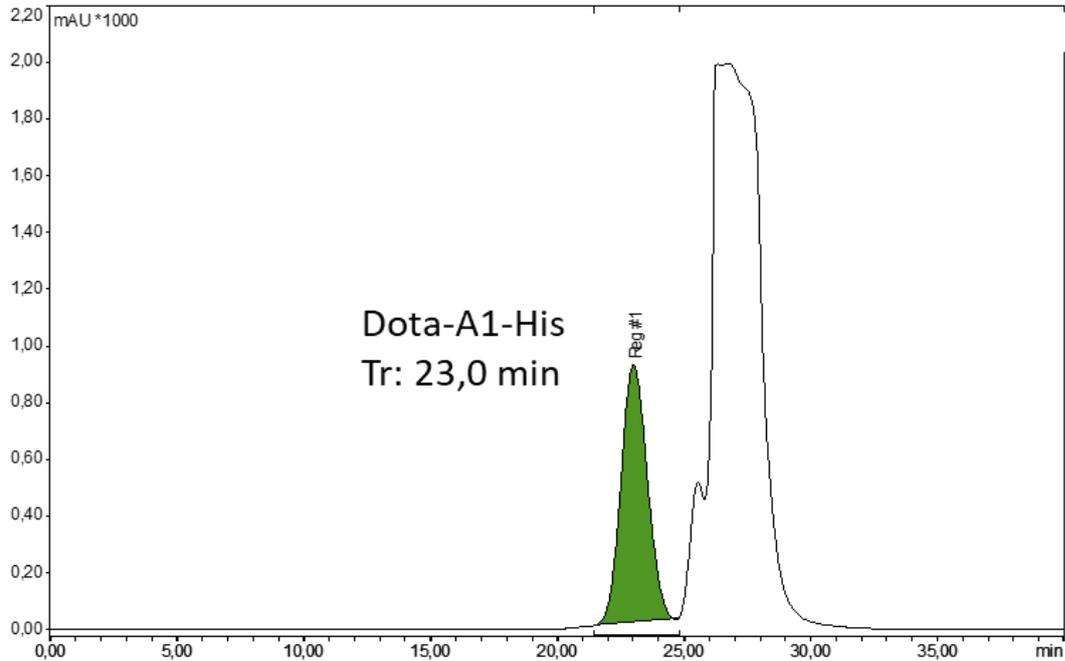


Figure 24 Profil de purification SE-HPLC A1-His-DOTA en condition P5

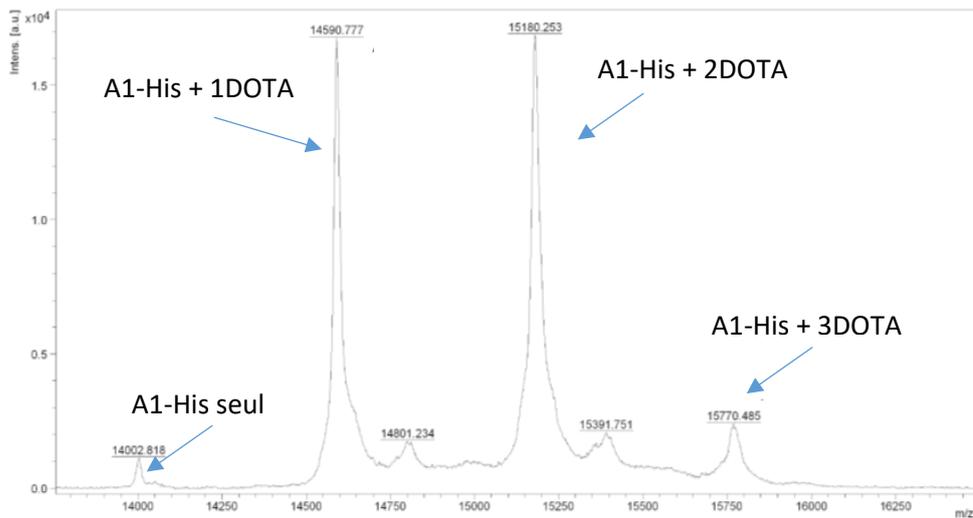


Figure 25 Analyse de masse A1-His-DOTA en condition P5

IV. Résultats.

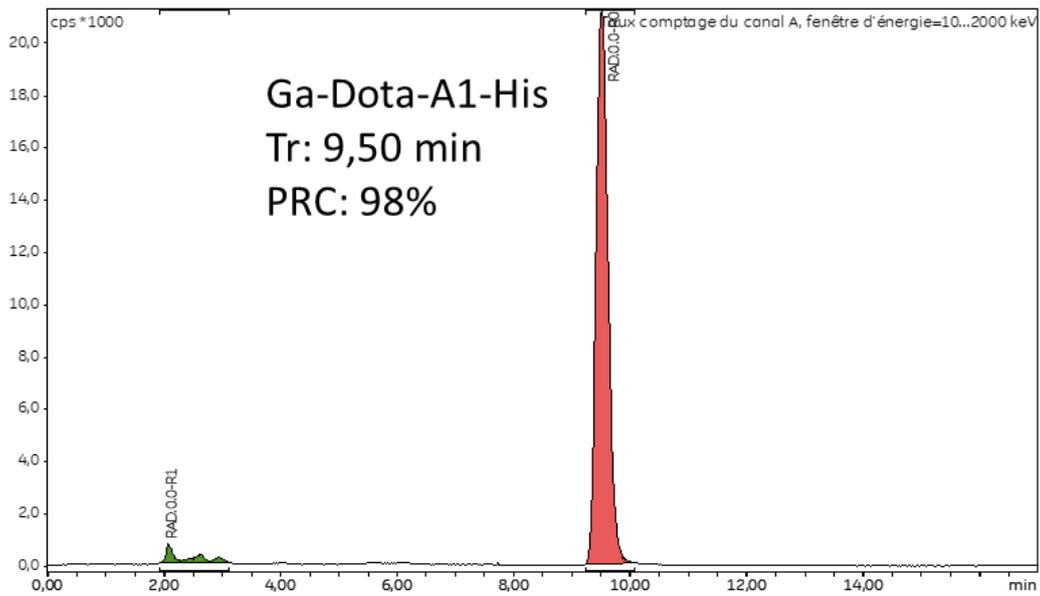


Figure 26 Profil de radiomarquage A1-His-DOTA en condition P5

Un récapitulatif des 5 conditions de conjugaison appliquées sur le nanobody de référence avec DOTA (A1-His-DOTA) est présenté dans le tableau 2 ci-dessous. Les différents paramètres sont appréciés de manière qualitative.

| Condition | Rendement de purification | Pureté du Nano conjugué | Taux de conjugaison | Radiomarquage |
|----------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|---------------|
| P1 (*20M) | ++ | + | - | - |
| P2 (*2x20M) | + | - | ++ | ++ |
| P3 (*50M) | - | + | ++ | + |
| P4 (*20M, pH9) | +++ | + | ++ | + |
| P5 (*50M, pH9) | +++ | +++ | ++++ | +++ |

Tableau 2 récapitulatif des différentes conditions de conjugaison

IV. Résultats.

D'après les résultats obtenus avec les différentes conditions de conjugaison, c'est la condition P5 qui est sélectionnée pour la suite de l'étude. En effet elle présente les meilleurs résultats concernant les 2 points essentiels pour la suite du développement du MRP : le taux de conjugaison et la PRC obtenue après l'étape de radiomarquage. Ainsi, lors des futures productions de nanobodies, la conjugaison sera réalisée avec un excès de 50M de chélatants avec un pH 9 à 25°C pendant 3H. Les échantillons conjugués seront ensuite aliquotés par quantité de 100 µg, selon un volume calculé après dosage spectrophotométrique.

ii. Optimisation des conditions de conjugaison A1-His avec NOTA

Les conditions P1 (excès de 20M de chélatant, pH 8, 25°C, 3H) et P2 (excès de 20M de chélatant, pH 8, 25°C, 1H30, répété 2 fois) ont été appliquées en parallèle sur A1-His avec le dérivé NOTA. Les deux chélatants présentant des caractéristiques physico-chimiques différentes, il convient de vérifier si les mêmes conditions s'appliquent.

Lors de l'application de la condition P1 sur A1-His avec NOTA, une contamination apparaît lors de l'analyse de masse, en figure 27. La masse du contaminant correspond à un atome de cuivre et empêche le bon déroulement de l'étape de radiomarquage. La même problématique apparaît avec l'application de la condition P2. L'hypothèse formulée est que le contaminant provient des étapes de production du nanobody (milieu, matériel...) étant donné que l'ensemble des matières utilisés lors de de conjugaison sont metal-free. Ainsi, les tests sont arrêtés temporairement avec NOTA et seront repris avec une nouvelle production de nanobody, en supposant que la contamination métallique ne soit plus présente.

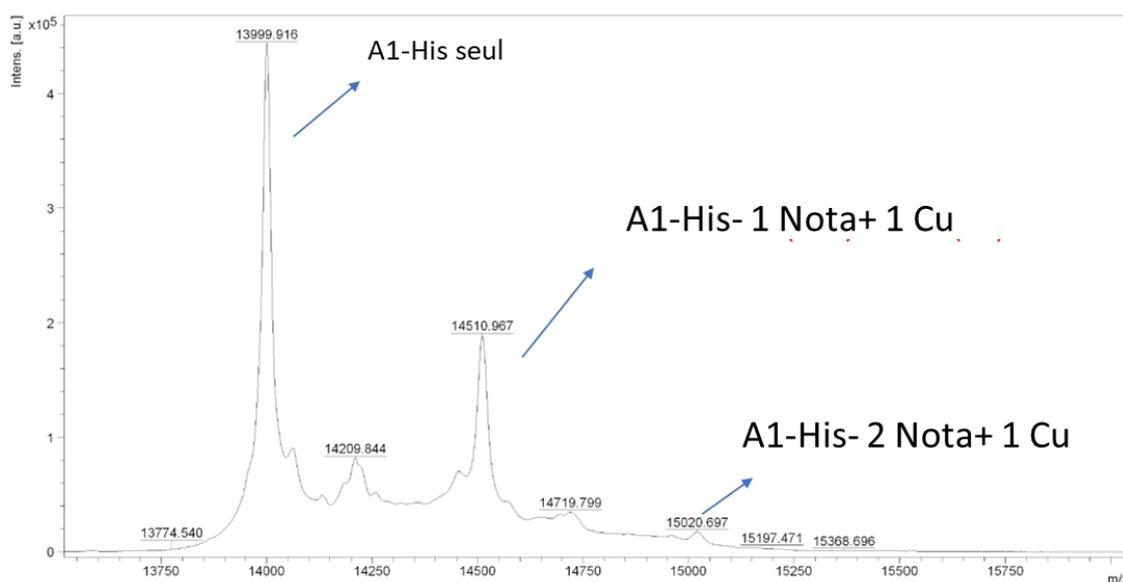


Figure 27 Analyse de masse de A1-His+NOTA en condition P1

IV. Résultats.

Les essais de conjugaison ont repris sur une nouvelle production de nanobody en appliquant la condition P5. Comme pour le conjugué A1-His-DOTA, le nanobody a été conjugué, purifié, dosé, radiomarqué et analysé par masse immédiatement. L'analyse de masse montre un bon taux de conjugaison. Les contaminants métalliques sont toujours présents mais avec un taux inférieur que pour la production précédente.

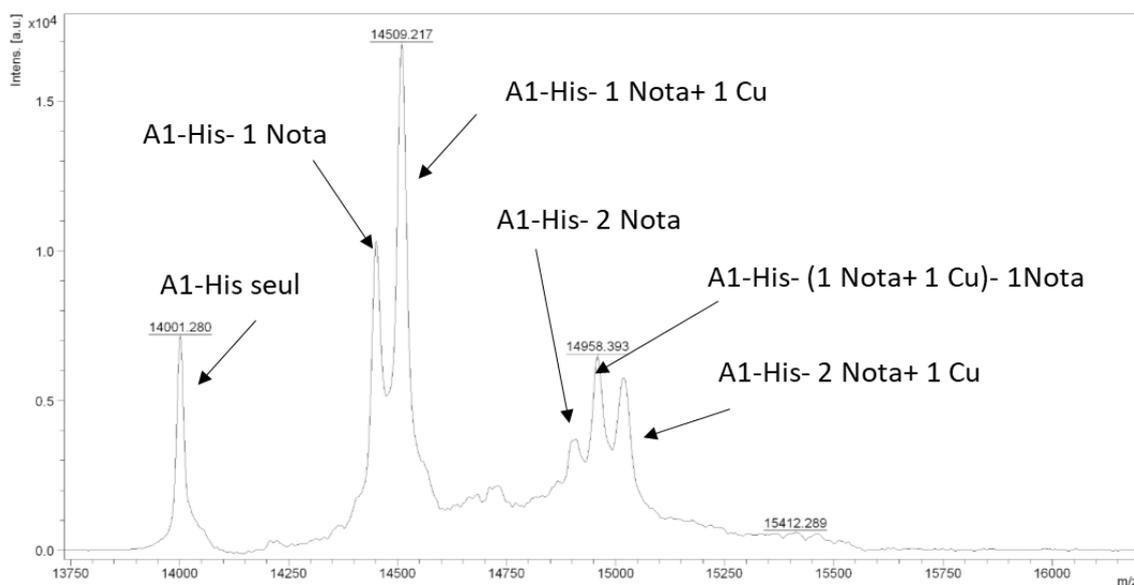


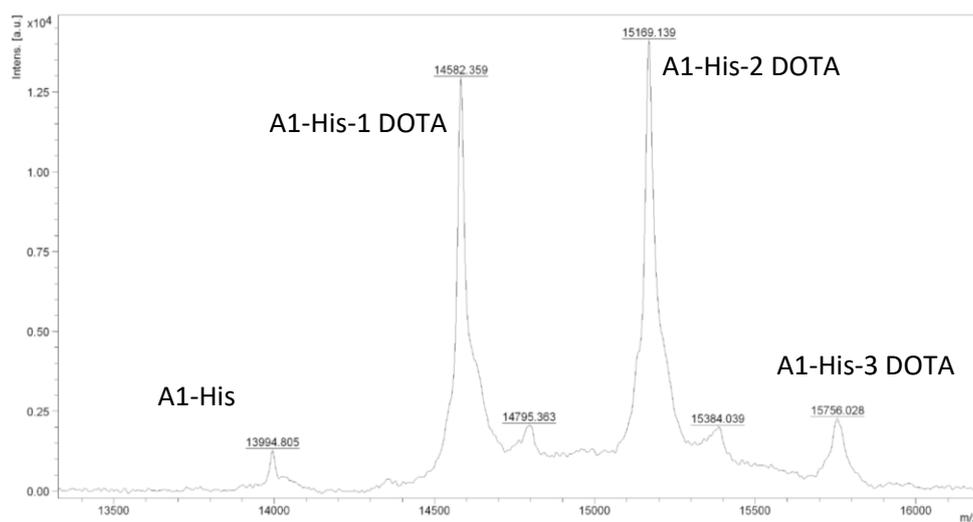
Figure 28 Analyse de masse de A1-His+NOTA en condition P5

La condition P5 (excès de 50M de chélatant, pH 8, 25°C, 3H) est sélectionnée également pour la conjugaison avec NOTA du fait de la plus faible présence de contaminant métallique ainsi que son meilleur taux de conjugaison.

iii. Etude de stabilité des nanobodies conjugués

Lors de l'étape de conjugaison, une quantité importante de nanobody est conjugué avec le chélatant fonctionnalisé. En effet, la conjugaison étant assez longue à réaliser, il est plus pratique de disposer d'un stock de nanobodies conjugués directement utilisables pour les tests de radiomarquage à réaliser. Ainsi, à l'issue de cette étape, la production est aliquotée et conservée à -80°C dans le but d'être utilisée ultérieurement. Pour cette raison, il est important de s'assurer de la bonne stabilité de la conjugaison dans ces conditions. Une analyse de masse ainsi que des tests de radiomarquage sont réalisés jusqu'à 2 ans après la conjugaison afin de s'assurer de la stabilité de la fixation des 2 chélatants DOTA et NOTA.

i. A1-His-DOTA



Comme nous pouvons le voir sur la figure 29 ci-dessus, la stabilité de la conjugaison de A1-His avec DOTA à 1 mois est bonne. Aucune perte de chélatant n'est observée par analyse masse après la conservation à -80°C . Cependant lors du test de radiomarquage une diminution de la PRC entre 50 et 80% est observée dès 2 semaines après la conjugaison.

IV. Résultats.

ii. A1-His-NOTA

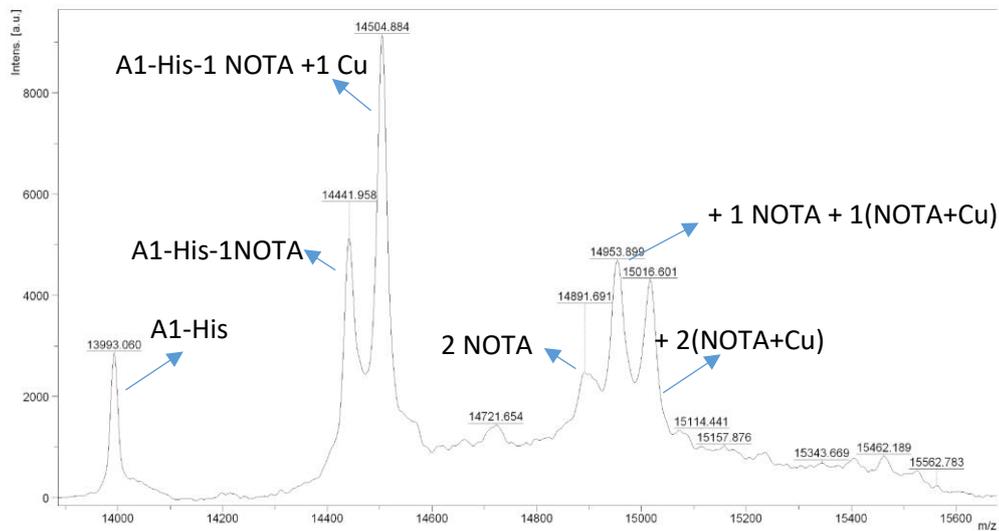


Figure 30 Analyse de masse A1-His+ Nota 1 mois après la conjugaison

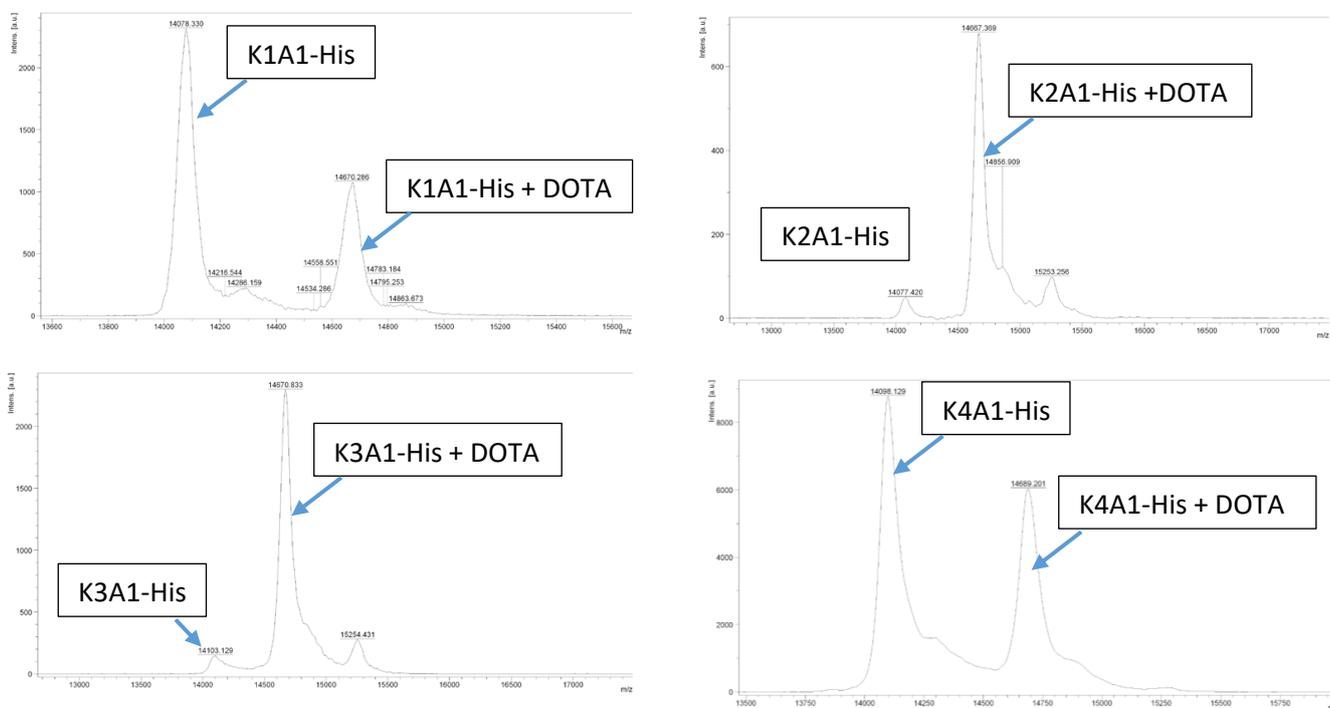
Comme le montre la figure 30 représentant l'analyse de masse de A1-His conjugué avec NOTA après 1 mois de conservation à -80°C , les mêmes problématiques sont observées qu'au moment de la conjugaison. La stabilité du nanobody conjugué est bonne mais les contaminants métalliques sont encore présents sur les chélatants. Ainsi lors des essais de radiomarquage les PRC obtenues sont de l'ordre de 30%. Les puretés radiochimiques sont trop faibles pour considérer le radiomarquage comme étant efficace et utilisable in vivo.

IV. Résultats.

iv. Conjugaison des dérivés de A1-His avec DOTA et suivi de stabilité

Quatre dérivés de A1-His (A1K1-His, A1K2-His, A1K3-His et A1K4-His) ont été développés et produits au LRB pour la suite du projet, afin de produire un MRP unique.

La condition P5 (excès de 50M de chélatant, pH 9, 25°C, 3H) de conjugaison avec DOTA a été appliquée sur ces différents dérivés de A1-His. Dans un premier temps, le dérivé NOTA est laissé de côté au vu des problèmes de contamination métallique induisant des difficultés de radiomarquage. Si les conditions de biodistribution ou d'efficacité thérapeutique le nécessitent, une suite sera donnée au développement de Nota. Des analyses de masse ont été réalisées sur l'ensemble des dérivés. Au moment de la conjugaison (T0) pour vérifier la faisabilité des conjugaisons dans la condition définie et à 1 mois et 2 mois après la conjugaison, afin de s'assurer de la stabilité dans le temps de cette fixation.



IV. Résultats.

| Mutant | Taux de conjugaison à T0 | Evolution à T 2 mois |
|-----------------|---------------------------------|-----------------------------|
| A1K1-His | - | = |
| A1K2-His | ++ | = |
| A1K3-His | ++ | = |
| A1K4-His | / | - |

Tableau 3 Récapitulatif des différents taux de conjugaison des différents dérivés A1-His avec DOTA

Le tableau 3 ci-dessus regroupe une analyse qualitative des taux de conjugaison de l'ensemble des dérivés et leur suivi de stabilité à 2 mois avec la condition P5 pour DOTA. Il apparaît que les mutants A1K2-His et A1K3-His présentent les meilleurs taux de conjugaison, avec une grande majorité de nanobodies ayant fixé un chélatant. Les mutants A1K1-His et A1K4-His présentent quant à eux une majorité de nanobodies non conjugués à l'issue de cette étape. La différence du taux de conjugaison des dérivés peut s'expliquer par la position des lysines dans la structure du nanobody. L'accès aux azotes nécessaires à la fixation des chélatants est plus ou moins aisé pour la conjugaison.

Les observations faites au moment de la conjugaison sont stables dans le temps d'après les analyses de masse à 2 mois, les taux de conjugaison restent similaires. Des études de biodistribution devront confirmer quel dérivé de chélatant a la meilleure spécificité pour la cible.

D. Mise au point de radiomarquage de A1-His-DOTA au Ga-68

Concernant l'étape de radiomarquage, 4 différents paramètres ont été optimisés sur A1-His-DOTA au cours de cette thèse : le pH de la réaction, la durée d'incubation l'activité spécifique ainsi que la concentration en nanobodies. La stabilité du radiomarquage in vitro dans le sang de souris a également été contrôlée. Une fois les conditions optimales déterminées, elles ont été appliquées sur l'ensemble des dérivés de A1-His.

i. Optimisation du pH

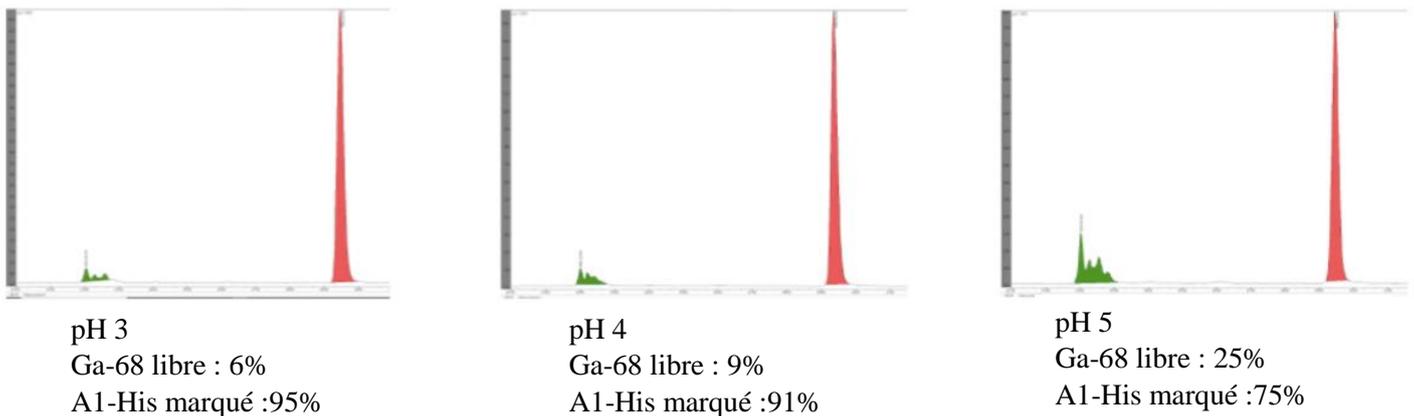


Figure 32 Profils RP-HPLC des marquages à T0 PH3, PH4, PH5

D'après les profils obtenus en figure 32 correspondant aux 3 différents pH utilisés pour l'optimisation du radiomarquage du nanobody conjugué avec DOTA, les puretés radiochimiques sont respectivement de 95% pour le pH 3 et de 91% pour le pH 4, ce qui correspond à l'objectif fixé pour le radiomarquage (PRC > 90%). Concernant le pH 5, le radiomarquage n'est pas conforme avec l'objectif fixé par l'étude avec une PRC de 75%.

IV. Résultats.

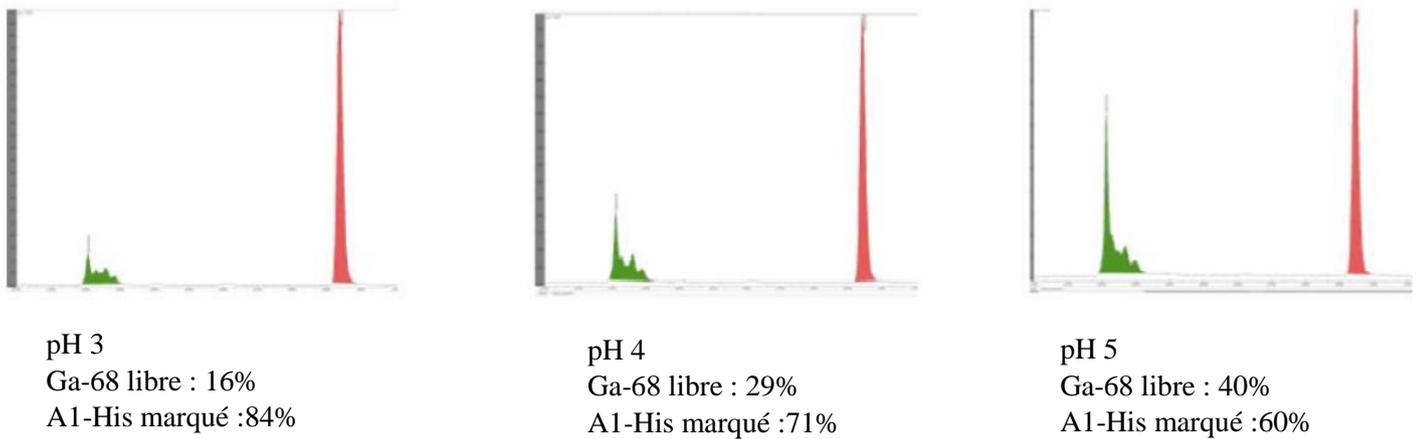


Figure 33 Profils RP-HPLC des marquages à 2H PH3, PH4, PH5

La figure 33 ci-dessus montre les profils de radiomarquages à 2H. On retrouve une diminution des puretés radiochimiques avec le temps, accentuée par l'augmentation du pH lors de la réaction.

Le pH optimal de la réaction se situe donc autour de 3 et sera appliqué pour la suite de l'étude. Le pH sera ainsi contrôlé à l'aide de papier pH pour chaque essai de radiomarquage afin de s'assurer des bonnes conditions de réaction. Il pourra être ajusté au besoin avec l'utilisation d'acétate d'ammonium à 1M afin de neutraliser le pH acide de l'éluat de Ga-68 ajouté au nanobody.

ii. Optimisation de temps d'incubation

Comme le montre la figure 34 ci-dessous, la variation du temps d'incubation impacte significativement la qualité du radiomarquage. Pour l'essai à 5 minutes d'incubation, la PRC au moment du radiomarquage se situe aux alentours de 70% et chute de manière importante 2H après autour de 50%. Pour un temps d'incubation de 10 minutes, les PRC à T0 et à T2H sont équivalentes, légèrement supérieures à 80%. On remarque que le temps d'incubation de 15 minutes présente la meilleure PRC au moment du radiomarquage, légèrement supérieure à 90% et également une bonne stabilité dans le temps avec une PRC > 80% 2H après le marquage. Ainsi, le temps d'incubation reste fixé à 15 minutes pour la suite de l'étude.

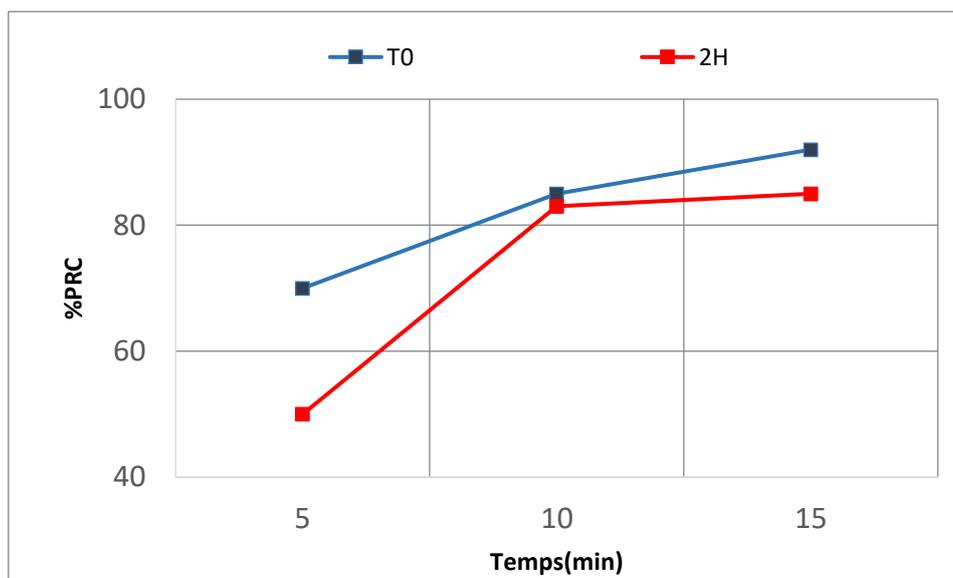


Figure 34 PRC – Optimisation de la durée d'incubation

iii. Augmentation de l'activité spécifique

La figure 35 ci-dessous représente les différentes PRC des radiomarquages avec augmentation croissante de l'activité spécifique. La meilleure PRC à T0 est obtenue pour une activité spécifique de 20 MBq/ nmol. Cependant les problématiques de dosage du nanobody rendent incertaines ces valeurs car elles considèrent une quantité de 100 μ g précise dans les aliquots sur lesquels sont réalisés les radiomarquages.

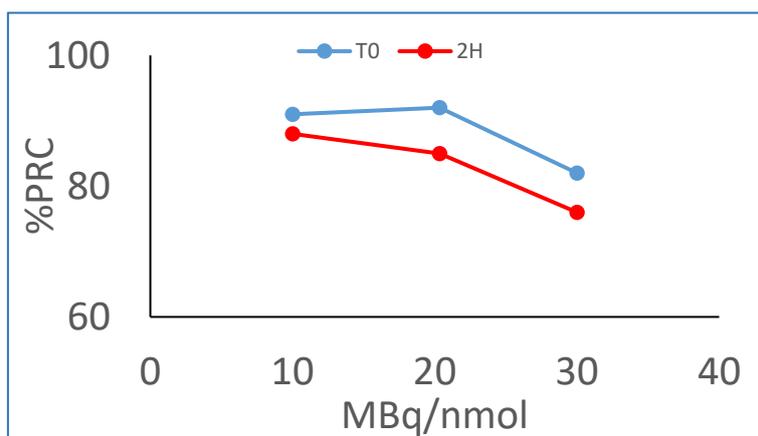


Figure 35 PRC - optimisation de l'activité spécifique (10, 20, 30 MBq/ nmol)

iv. Optimisation de la concentration de réaction

Les essais de radiomarquages sont également réalisés en utilisant respectivement 50 et 100 μ g des échantillons de nanobodies par mL de la réaction. Les résultats sont présents en figure 36 ci-dessous et montrent une meilleure PRC à T0 ainsi qu'une bonne stabilité à 2H avec l'utilisation de 100 μ g de nanobodies.

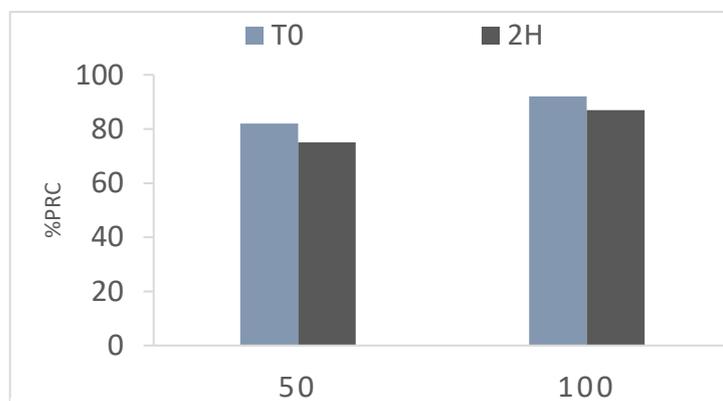


Figure 36 PRC - optimisation de la concentration (50 et 100 μ g)

v. Suivi de stabilité in vitro

a. A1-His-DOTA

Concernant les études de stabilités in vitro de A1-His-DOTA radiomarqué au Ga-68, les analyses chromatographiques montrent une bonne PRC du radiomarquage. La stabilité à 1H montre une diminution de la PRC de plus de 10% cependant la stabilité à 2H reste bonne avec une PRC de 87%.

Des difficultés dans la manipulation rendent ininterprétables les spectres à 30min et 120min. Cette étude est donc à renouveler pour pouvoir fournir des données fiables sur l'ensemble de la période.

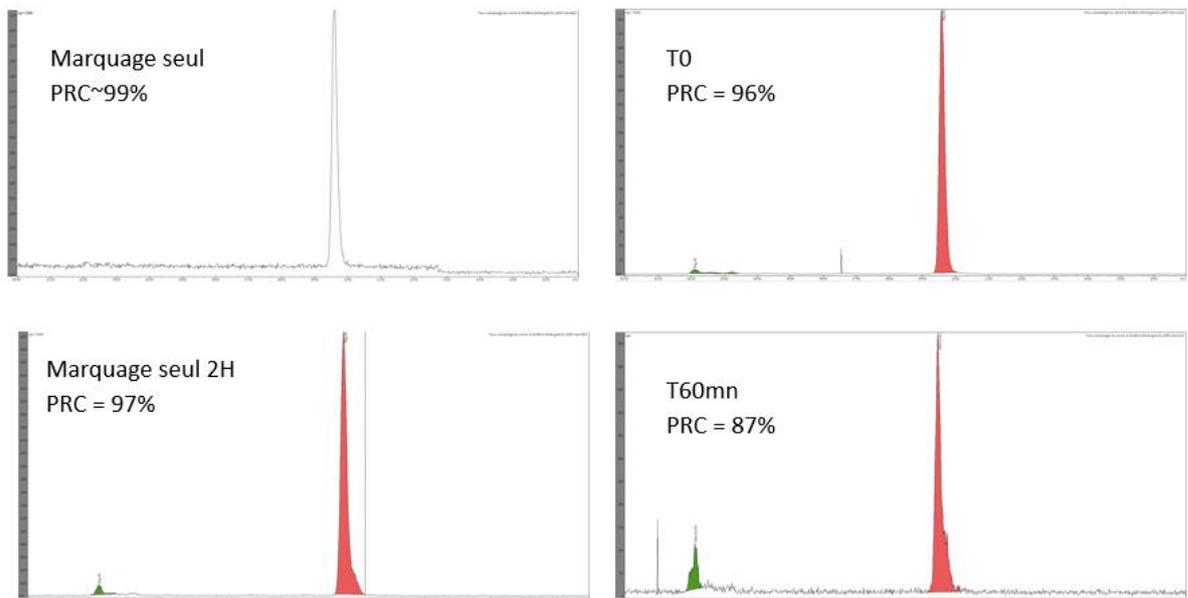


Figure 37 Suivi de stabilité in vitro NMR-DOTA radiomarqué au Ga-68/ Sang de souris

b. A1-His-NOTA

Les études de stabilité in vitro du radiomarquage de A1-His-NOTA montre un phénomène de décomplexation lors de la première demi-heure avec une diminution de la PRC de 10% par rapport au radiomarquage à T0. Cette décomplexation reste cependant stable par la suite, on retrouve une PRC de 88% après 2H de contact entre A1-His-NOTA et le sang de souris.

On peut donc considérer le complexe formé stable au contact du sang de souris. L'ensemble des profils chromatographiques des analyses de T0 à 2H sont regroupés dans la figure 38 ci-dessous.

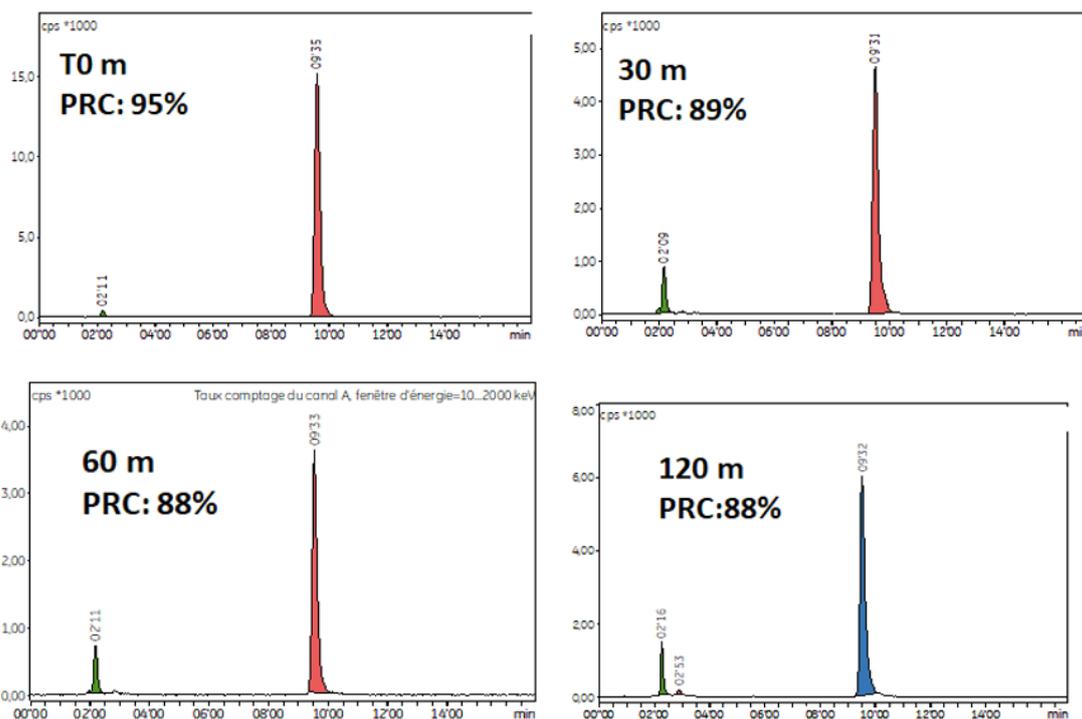


Figure 38 Suivi de stabilité in vitro NMR-NOTA radiomarké au Ga-68/ Sang de souris

E. Radiomarquage des dérivés de A1-His

Des essais de radiomarquage ont été réalisés sur A1-His ainsi que sur l'ensemble des dérivés conjugués avec DOTA. Des problèmes de stabilité dans les marquages initiaux ayant été observés, de l'acide gentisique a été rajouté lors de l'étape de radiomarquage dans certaines conditions afin de mesurer l'impact potentiel de cet anti-oxydant sur la stabilité des complexes formés lors de cette étape. Les résultats des PRC obtenues sont résumés dans le tableau 4 ci-dessous.

| Nanobody | Temps depuis la conjugaison | PRC T0 | PRC T2H | PRC T2H + Acide Gentisique |
|----------|-----------------------------|---|---------|----------------------------|
| A1-His | T 0 | 95 % | 92 % | 92 % |
| | T 1 Semaine | 90 % | 76 % | 90 % |
| | T 1 Mois | > 40 % | / | / |
| A1K1-His | T0 | 95 % | 92 % | 92 % |
| | T 3 semaines | 81 % | 77 % | 79 % |
| | T 2 mois | > 5 % (Manque de nanobody pour faire le marquage) | | |
| A1K2-His | T 0 | 92 % | 90 % | 91 % |
| | T 3 semaines | 79 % | 78 % | 79 % |
| | T 2 mois | 82 % | 76 % | / |
| A1K3-His | T 0 | 86 % | 47 % | 56 % |
| | T 3 semaines | 48 % | 47 % | 45 % |
| | T 2 mois | 48 % | 45 % | / |
| A1K4-His | T0 | 94 % | 89 % | / |
| | T 1 semaine | 95 % | 91 % | 95 % |
| | T 1,5 mois | 80 % | 87 % | / |

Tableau 4 Récapitulatif des radiomarquages et suivi de stabilité A1-His-DOTA et dérivés

IV. Résultats.

On remarque une bonne PRC pour l'ensemble des nanobodies au moment de la conjugaison et au moment du radiomarquage. Concernant le A1K3-His, la PRC est légèrement inférieure à l'objectif fixé.

Les PRC à 2H restent bonnes pour le A1-His ainsi que les A1K1-His, A1K2-His et A1K4-His. La PRC est diminuée pour le A1K3-His à moins de 50% 2H après la mise en contact du Ga-68 avec A1K3-His.

Après décongélation des échantillons on remarque que les marquages sont plus ou moins affectés par la conservation du nanobody. La PRC du A1-His-DOTA est effondrée 1 mois après la conjugaison tout comme celle de A1K3-His. La qualité du radiomarquage des mutants A1K2-His et A1K4-His est moins diminuée par la conservation à -80°C.

On ne remarque aucun impact de l'ajout de l'acide gentisique sur la stabilité du marquage à 2H, les problèmes de stabilité initialement observés ayant été résolus avec l'optimisation des conditions de radiomarquage.

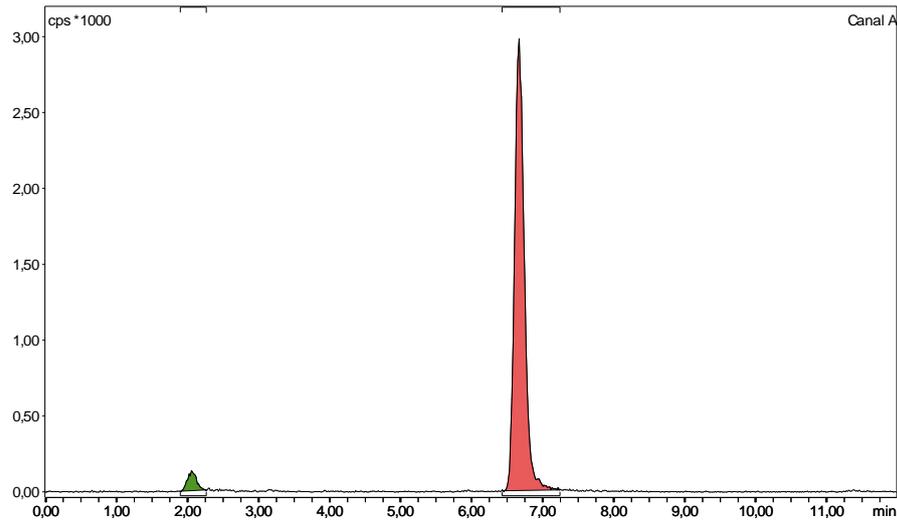
F. Dosage.

Après purification les dosages ont été effectués par une méthode spectroscopique. Les concentrations étaient de l'ordre de 0,1 à 0,2 mg/mL. Après conservation, les essais de radiomarquage étant peu efficaces, un problème de méthode de dosage a été supposé dans un premier temps. En effet, cette fourchette de concentration ne se situe pas exactement dans les tranches de détection de la méthode spectroscopique. Les valeurs de concentration ont cependant été confirmées par l'application de la méthode de Bradford.

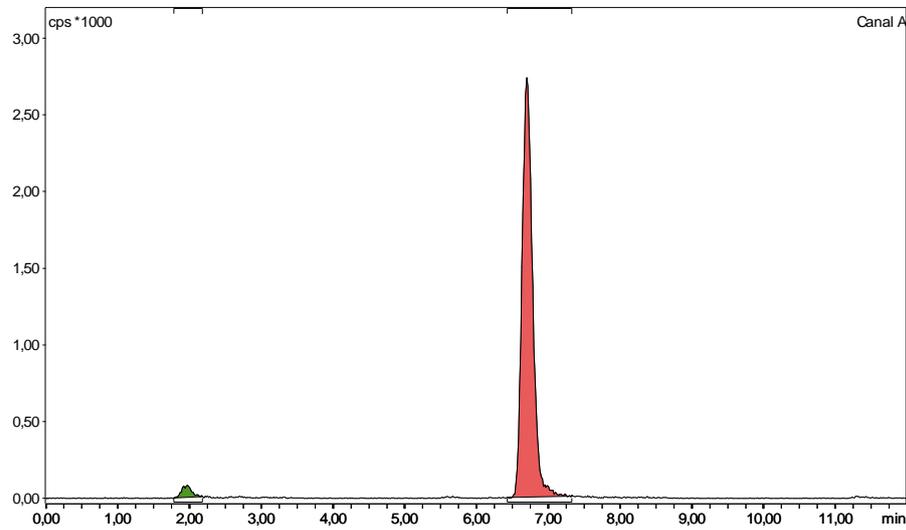
Afin de palier au problème de conservation, les protéines ont été concentrées post conjugaison afin d'obtenir des concentrations comprises entre 0,5 et 1 mg/mL. Ces concentrations se situent dans la zone de détection optimale de la méthode spectroscopique. Lors de l'application des essais de radiomarquage sur les échantillons concentrés, les PRC obtenues sont bien meilleures.

Ainsi le défaut de conservation n'est pas en lien avec la méthode de dosage qui serait faussée mais serait dû à une trop faible concentration en protéines (0,1 à 0,2 mg/mL) qui ne permet pas une conservation optimale. Cette nouvelle étape de concentration post-purification par une Amicon® Ultra 2 mL permet d'obtenir une conservation satisfaisante pour la suite de l'étude. Les profils de radiomarquage de A1-His-DOTA et A1-His-Nota, conservés à 1mg/mL, 2 ans après conjugaison à -80°C sont présentés dans la figure 39. Une PRC de 95% a été observée.

IV. Résultats.



a. PRC: 94%



b. PRC: 95%

Figure 39 a : Ga-DOTA-A1-His et b: Ga-Nota-A1-His 2 ans après la conjugaison conservé à -80 et à 1mg/mL

V.

Discussion et perspectives

A. Interprétation des résultats

i. Méthodes analytiques

Concernant les méthodes analytiques développées tout au long de cette thèse, la mise en place de méthodes HPLC efficaces et reproductibles a été un pilier pour le développement de l'étude. La caractérisation du nanobody seul, conjugué et radiomarqué permet en effet de suivre les différentes étapes qu'il va subir pour l'élaboration d'un outil théranostique radiomarqué. Ces méthodes permettent également la purification du composé à l'issue de l'étape de conjugaison, nécessaire pour se débarrasser des chélatants libres et assurer un marquage efficace.

L'élaboration d'une méthode de dosage fiable et reproductible représente également un enjeu clé du bon déroulement de la suite du développement de cet outil théranostique. En effet, la concentration en nanobody est importante pour deux principales raisons. D'une part pour la conservation des échantillons conjugués et leur usage pour l'optimisation du radiomarquage. Le ratio nanobody conjugué/ Ga-68 est une des données essentielles du bon déroulement de cette étape. Les inexactitudes de dosage pourraient être à l'origine des défauts de marquage de A1-His-DOTA après conservation. D'autre part, lors du radiomarquage au Lu-177, la quantité de nanobody injectée sera en lien direct avec l'efficacité thérapeutique. La dose doit ainsi être parfaitement connue et maîtrisée afin de mener une radiothérapie interne vectorisée.

ii. Conjugaison

a. Sélection du chélatant

Le choix du chélatant est une décision importante dans le développement d'un MRP. Comme nous avons pu le voir au cours de cette thèse, le chélatant influence grandement les étapes de conjugaison et de radiomarquage. De plus, comme le montre l'étude de Strand et al. (57), l'utilisation des chélatants macrocycliques peut également jouer un rôle dans la biodistribution de certains vecteurs. Les nanobodies étant des protéines de petite taille, l'ajout d'un chélatant peut impacter leur structure moléculaire et ainsi leurs fonctions biologiques selon la nature et la position du chélatant. Le choix du chélatant portant jusqu'alors sur des paramètres purement physico-chimiques pourra être reconsidérer en comparant les données des nanobodies radiomarqués avec NOTA et DOTA pour le choix final du chélatant utilisé pour le développement du MRP théranostique.

Les essais de conjugaison du nanobody avec les chélatants ont permis la sélection de DOTA pour la suite de l'étude. Lors des essais de conjugaison, l'apparition d'une contamination métallique sur certains nanobodies conjugués rend l'utilisation de NOTA difficile. En effet, comme le montre les résultats d'analyse de masse, un atome de cuivre semble chélaté par le dérivé de NOTA. L'origine de ce contaminant est à ce jour non élucidée, la piste la plus probable serait un apport de l'élément dans le milieu lors des étapes de production et de purification de la protéine. La cinétique de chélation rapide du NOTA, qui représente un avantage lors de l'étape du radiomarquage devient alors un inconvénient, NOTA ayant la capacité de chélater les ions métalliques présents en solution. Ceci pose un

problème lors des étapes de radiomarquage par le Ga-68, les chélatants n'étant plus disponible pour accueillir le radioélément.

De plus, NOTA présente l'inconvénient de ne pas pouvoir chélater le Lu-177. Ainsi il serait nécessaire d'utiliser deux chélatants différents, un pour chacun des radioéléments. La multiplication des étapes de conjugaison pour le développement ultérieur d'un MRP à visée théranostique rend son utilisation plus compliquée en comparaison de DOTA capable de chélater les deux radioéléments du couple théranostique.

Les résultats de dichroïsme circulaire montrant la bonne résistance de A1-His et de ses dérivés à des températures avoisinant les 60°C, le marquage à haute température de DOTA est réalisable, l'usage de ce dernier est donc privilégié pour la suite du développement du MRP au vu des caractéristiques négatives de l'utilisation de NOTA. Ces choix seront néanmoins à reconsidérer à la suite des différentes modifications structurales apportées ultérieurement à A1-His ainsi que les résultats de biodistribution in vivo.

b. Choix des conditions de conjugaison

Durant les travaux réalisés au cours de cette thèse, l'étape de conjugaison a été optimisée. Le critère le plus important au cours de ces essais a été le taux de conjugaison. En effet, les tests sont réalisés sur A1-His, qui comporte 4 lysines, acide aminé de fixation de NOTA et de DOTA. Cependant le MRP final comportera une unique lysine, donc un seul site de fixation des chélatants sur la protéine. La réduction des sites de fixation sur le nanobody est réalisée dans le but d'obtenir un unique MRP à l'issue de cette étape et non un mélange hétérogène de nanobody conjugué et radiomarqué.

V. Discussion et Perspectives.

Ainsi, les liaisons entre chélatants et nanobody étant réduites, il est important de choisir des conditions permettant un taux de conjugaison optimal. C'est pourquoi la condition P5 mettant en contact le nanobody avec un excès de 50 molaires de chélatants pendant une durée de 3H a été retenue pour la suite de l'étude. L'application de ces conditions de conjugaison a également été vérifiée, elles sont approuvées comme étant efficaces et reproductibles sur l'ensemble des dérivés et pourront être utilisées sur l'ensemble des productions de nanobodies à venir pour la suite de l'étude. Ces conditions sont applicables pour les 2 chélatants envisagés dans le cadre du développement de ce MRP théranostique.

c. Stabilité de conjugaison

Dans le cadre de cette étude il était également primordial de vérifier la stabilité de la conjugaison des chélatants sur le nanobody. En effet, cette étape étant relativement longue, il apparaît plus pratique de produire et conserver des quantités importantes de nanobodies conjugués. Des études de masse à intervalle régulier jusqu'à 2 ans après la conjugaison indique que la stabilité de la conjugaison est bonne dans le temps.

Cependant, lors des essais de radiomarquages sur les nanobodies conservés une diminution importante de la PRC est observée. Ces marquages ont permis d'ouvrir un questionnement sur le dosage de la protéine. En effet, cette étape conditionne le volume stocké dans les aliquots de conservation et donc la quantité de protéine mise en contact lors de l'étape de radiomarquage. La première méthode utilisée (spectroscopique) serait à l'origine d'une surestimation de la dose de protéine à l'issue de la purification post-conjugaison. Les chélatants possédant une absorption importante, proche de la valeur de mesure utilisée, lors présence aurait tendance à fausser les résultats.

V. Discussion et Perspectives.

Cette problématique a permis aux travaux de cette thèse de s'intéresser à différentes méthodes de dosage des protéines. La méthode de Bradford a donc été appliquée, donnant des résultats satisfaisants en lien avec les rendements théoriquement attendus. Après différents tests de radiomarquage sur les nanobodies conservés, il apparaît que l'ajout d'une étape de concentration apporte des PRC correctes.

iii. Radiomarquage

Concernant l'étape de radiomarquage, l'optimisation donne des résultats prometteurs. Le pH, le temps d'incubation, l'activité spécifique optimale et la concentration de réaction ont été déterminés. Concernant la stabilité dans le temps elle semble impactée sur A1K3-His par la PRC à T0 de marquage, en effet les diminutions des puretés radiochimiques à travers le temps sont plus importantes pour les mutants qui ont de plus faible PRC à T0.

Pour les dérivés présentant de faibles PRC, l'ajout d'étapes de purification post-marquage pour augmenter les puretés au-dessus des 90% cibles pourraient être envisagés.

Une optimisation de l'activité volumique a également été conduite à travers un test d'ajustement de la concentration. Cette dernière étant assez faible dans les premiers essais, autour de 80 $\mu\text{Ci}/100\mu\text{L}$. Une faible activité volumique peut représenter un facteur limitant pour la suite de l'étude, le volume injectable à la souris étant limité (maximum 150 μL) mais devant contenir une activité suffisante pour l'obtention d'une image nette. Afin de répondre à cette problématique, les échantillons de nanobody ont été concentrés à l'aide d'une colonne Nano SEP 10 kDa. Les échantillons sont centrifugés 3 minutes à 5 000 rpm afin d'obtenir une solution 2 fois plus concentrée. Le pH est ajusté lors du radiomarquage par 40 μL d'acétate d'ammonium afin d'atteindre le pH 3 optimal après l'ajout de Ga-68. Les autres paramètres sont maintenus identiques.

B. Perspectives et évolutions à long terme

Différentes perspectives s'offrent à ce projet de développement d'un outil théranostique des tumeurs solides qui ne fait que débiter. Tout d'abord au niveau du radiomarquage mais également concernant la structure du nanobody qui va subir différentes modifications structurales afin de lui permettre notamment de diminuer sa rétention rénale.

i. Optimisation et automatisation du radiomarquage au Ga-68

Un des objectifs à long terme du développement de ce radiomarquage est l'automatisation du procédé par un automate de synthèse. Comme le montre l'étude de Meisenheimer et al. (58) l'automatisation présente certains avantages. D'abord une diminution de l'exposition radioactive pour les manipulateurs qui sont amenés à recevoir une dose d'irradiation importante durant leur carrière. Ensuite cette étude montre une diminution du temps moyen de l'opération de radiomarquage ainsi qu'une augmentation de la pureté radiochimique lorsqu'elle est automatisée.

Afin de réaliser l'automatisation du radiomarquage, un module de synthèse radioactive est disponible au laboratoire. Ce module comporte différentes possibilités d'injection de produit, de temps d'incubation de température de chauffage. Une adaptation des conditions de marquage ainsi que l'élaboration d'un programme sera nécessaire pour pouvoir réaliser le radiomarquage de manière automatique.

V. Discussion et Perspectives.

ii. Développement du radiomarquage au Lutétium

La mise au point d'un radiomarquage fiable et reproductible du nanobody par le Ga-68 permettra la réalisation d'imagerie dans la prise en charge de différents types de cancers. Afin de développer un outil théranostique complet, il convient de réaliser les mêmes étapes d'optimisation avec le radiomarquage par le Lu-177, émetteur β^- . Comme expliqué en introduction ces deux radioéléments présentent des propriétés physico-chimiques différentes qui n'impliquent pas les mêmes conditions de réactions.

iii. Modifications structurales du vecteur

Lors des travaux précédemment réalisés sur ce nanobody radiomarké au technétium, une importante rétention rénale était observée (47). Cette dernière peut être à l'origine d'image moins précise, et peut mener à un défaut de détection des tumeurs proche de la région rénale. Lors du passage au marquage par un émetteur beta- cette rétention pourrait également faire l'objet d'une néphrotoxicité importante.

A cause de ces nombreuses fonctions positives, le tag-poly-histidine présent sur le nanobody A1-His présente en effet une forte rétention rénale. Ce tag, nécessaire à la purification lors de la production de la protéine est également le siège de la fixation du technétium. Ainsi, différentes approches sont proposées selon la littérature afin de réduire l'impact de ce groupement. La co-administration de gelofusine (et/ ou de lysine) permet de limiter cet effet de rétention rénale par inhibition du récepteur à l'origine la réabsorption des protéines (59). Une autre option afin de s'affranchir des charges positives de cette fonction

V. Discussion et Perspectives.

est simplement de la supprimer. Cette approche va être abordée dans la suite du développement du MRP.

Une autre solution afin de réduire les effets indésirables rénaux est d'introduire une séquence de clivage dans la structure de la protéine afin de séparer le radioélément du nanobody qui ne présente intrinsèquement aucune toxicité. La séparation intervient sous l'effet d'enzymes présentes au niveau des tubules rénaux afin de faciliter l'élimination rapide de la source de radioactivité (60).

Les différentes modifications structurales du vecteur demanderont la confirmation que les conditions définies lors de l'optimisation de la conjugaison ainsi que du radiomarquage sont toujours adéquates. Les études de biodistribution ainsi que les données obtenues à l'issue de ces 2 étapes permettront la sélection du vecteur le plus prometteur pour le développement d'un MRP.

V. Discussion et Perspectives.

THÈSE SOUTENUE PAR : GUENARD Thibault

TITRE :

Développement d'un radiotraceur à visée théranostique des tumeurs solides : conjugaison et radiomarquage au Gallium-68 d'un nanobody.

Les travaux exposés dans cette thèse regroupent les étapes préliminaires du développement d'un outil théranostique des tumeurs solides en radiopharmacie. La caractérisation du radiotraceur par l'élaboration de méthodes chromatographiques ainsi que des analyses en dichroïsme circulaire ont représenté un socle de connaissance essentiel sur le nanobody afin de procéder à la suite de l'étude. D'un point de vue analytique, différentes méthodes de dosage des protéines ont été élaborées afin de pouvoir quantifier au mieux une protéine conjuguée dans l'objectif d'un radiomarquage. La mise au point de l'étape de conjugaison du radiotraceur par le chélatant bifonctionnel a également été réalisée, permettant la sélection de DOTA au profit de NOTA. L'optimisation des conditions de cette étape a été effectuée sur le nanobody de référence mais également sur quatre nanobodies ayant subi des modifications structurales. Différents points concernant le radiomarquage de la protéine chélatée ont été abordés permettant d'atteindre des puretés radiochimiques utilisables in vivo pour procéder aux études de biodistribution nécessaires pour la suite du développement de ce médicament radiopharmaceutique. Beaucoup de travail reste encore à accomplir pour l'élaboration complète d'un MRP à visée théranostique à partir de ce nanobody dirigé contre la mésothéline.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 27/04/23

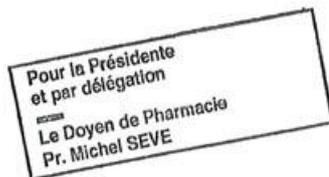
**LE DOYEN DE LA
FACULTÉ DE PHARMACIE**



Pr Michel SÈVE

LE DIRECTEUR / LA DIRECTRICE DE THÈSE

LE TUTEUR / LA TUTRICE UNIVERSITAIRE



VI. Bibliographie.

1. Sgouros G, Roeske JC, McDevitt MR, Palm S, Allen BJ, Fisher DR, et al. MIRD Pamphlet No. 22 (Abridged): Radiobiology and Dosimetry of α -Particle Emitters for Targeted Radionuclide Therapy. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. févr 2010;51(2):311-28.
2. Tronchin S, Forster J, Hickson K, Bezak E. Dosimetry in targeted alpha therapy. A systematic review: current findings and what is needed. *Phys Med Biol*. 22 mars 2022;67.
3. de Kruijff RM, Wolterbeek HT, Denkova AG. A Critical Review of Alpha Radionuclide Therapy—How to Deal with Recoiling Daughters? *Pharmaceuticals*. 10 juin 2015;8(2):321-36.
4. Guerra Liberal FDC, O'Sullivan JM, McMahon SJ, Prise KM. Targeted Alpha Therapy: Current Clinical Applications. *Cancer Biother Radiopharm*. 1 août 2020;35(6):404-17.
5. Castell F, Cook GJR. Quantitative techniques in ^{18}F PET scanning in oncology. *Br J Cancer*. 20 mai 2008;98(10):1597-601.
6. Poudyal B, Shrestha P, Chowdhury YS. Thallium-201 [Internet]. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2022 [cité 25 nov 2022]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560586/>
7. Ménager J, Gorin JB, Fichou N, Gouard S, Morgenstern A, Bruchertseifer F, et al. Radio-immunothérapie alpha: Principes et intérêts en immunité antitumorale. *médecine/sciences*. avr 2016;32(4):362-9.
8. xofigo-epar-medicine-overview_en.pdf [Internet]. [cité 25 nov 2022]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/xofigo-epar-medicine-overview_en.pdf
9. Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory [Internet]. [cité 17 déc 2022]. Disponible sur: <https://gco.iarc.fr/>
10. Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol*. 10 déc 2018;54(2):407-19.
11. Hafeez U, Parakh S, Gan HK, Scott AM. Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules*. 16 oct 2020;25(20):4764.
12. Baum RP, Kulkarni HR. THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labeled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience. *Theranostics*. 7 mai 2012;2(5):437-47.
13. Christine M. Haute Autorité de santé. 2014;71.
14. Naskar N, Lahiri S. Theranostic Terbium Radioisotopes: Challenges in Production for Clinical Application. *Front Med*. 31 mai 2021;8:675014.
15. Lindner T, Altmann A, Krämer S, Kleist C, Loktev A, Kratochwil C, et al. Design and Development of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Labeled FAPI Tracers for SPECT Imaging and ^{188}Re Therapy. *J Nucl Med*. oct 2020;61(10):1507-13.

VI. Bibliographie.

16. Calderon LE, Black CA, Rollins JD, Overbay B, Shiferawe S, Elliott A, et al. Synthesis of Radiolabeled Technetium- and Rhenium-Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (99mTc/Re-Acdien-LHRH) Conjugates for Targeted Detection of Breast Cancer Cells Overexpressing the LHRH Receptor. *ACS Omega*. 8 janv 2021;6(3):1846-56.
17. Choudhury PS, Gupta M. Differentiated thyroid cancer theranostics: radioiodine and beyond. *Br J Radiol*. nov 2018;91(1091):20180136.
18. Fani M, André JP, Maecke HR. 68Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol Imaging*. 2008;3(2):53-63.
19. CT-16562_GALLIAPHARM_PIS_INS_Avis1_CT16562.pdf [Internet]. [cité 22 nov 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-16562_GALLIAPHARM_PIS_INS_Avis1_CT16562.pdf
20. Générateur Galli Eo [Internet]. [cité 22 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.ire.eu/nos-activites/ire-elit/galli-eo>
21. CT-16063_SOMAKIT_TOC_PIC_INS_Avis1_CT16063.pdf [Internet]. [cité 19 nov 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-16063_SOMAKIT_TOC_PIC_INS_Avis1_CT16063.pdf
22. Keyaerts M, Xavier C, Heemskerck 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. *J Nucl Med*. 1 janv 2016;57(1):27-33.
23. Vogel WV, van der Marck SC, Versleijen MWJ. Challenges and future options for the production of lutetium-177. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021;48(8):2329-35.
24. CT-16606_LUTATHERA_PIC_INS_Avis3_CT16606.pdf [Internet]. [cité 27 nov 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-16606_LUTATHERA_PIC_INS_Avis3_CT16606.pdf
25. Fendler WP, Rahbar K, Herrmann K, Kratochwil C, Eiber M. ¹⁷⁷Lu-PSMA Radioligand Therapy for Prostate Cancer. *J Nucl Med*. août 2017;58(8):1196-200.
26. decision_n2022.0249dcsem_du_13_juillet_2022_du_college_de_la_haute_autorite_de_s_ante_portant_autorisation_daccés_precoce_de_.pdf [Internet]. [cité 27 nov 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2022-08/decision_n2022.0249dcsem_du_13_juillet_2022_du_college_de_la_haute_autorite_de_s_ante_portant_autorisation_daccés_precoce_de_.pdf
27. Lenzo NP, Meyrick D, Turner JH. Review of Gallium-68 PSMA PET/CT Imaging in the Management of Prostate Cancer. *Diagnostics*. 11 févr 2018;8(1):16.
28. Schottelius M, Wurzer A, Wissmiller K, Beck R, Koch M, Gorpas D, et al. Synthesis and Preclinical Characterization of the PSMA-Targeted Hybrid Tracer PSMA-I&F for Nuclear and Fluorescence Imaging of Prostate Cancer. *J Nucl Med*. janv 2019;60(1):71-8.
29. Turner JH. Recent advances in theranostics and challenges for the future. *Br J Radiol*. nov 2018;91(1091):20170893.

VI. Bibliographie.

30. Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 janv 1996;93(1):136-40.
31. Bera TK, Pastan I. Mesothelin Is Not Required for Normal Mouse Development or Reproduction. *Mol Cell Biol*. avr 2000;20(8):2902-6.
32. Hassan R, Thomas A, Alewine C, Le DT, Jaffee EM, Pastan I. Mesothelin Immunotherapy for Cancer: Ready for Prime Time? *J Clin Oncol*. 1 déc 2016;34(34):4171-9.
33. Bharadwaj U, Li M, Chen C, Yao Q. Mesothelin-Induced Pancreatic Cancer Cell Proliferation Involves Alteration of Cyclin E via Activation of Stat3. *Mol Cancer Res MCR*. nov 2008;6(11):1755-65.
34. Golfier S, Kopitz C, Kahnert A, Heisler I, Schatz CA, Stelte-Ludwig B, et al. Anetumab Ravtansine: A Novel Mesothelin-Targeting Antibody–Drug Conjugate Cures Tumors with Heterogeneous Target Expression Favored by Bystander Effect. *Mol Cancer Ther*. 1 juin 2014;13(6):1537-48.
35. Tang Z, Qian M, Ho M. The role of mesothelin in tumor progression and targeted therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 1 févr 2013;13(2):276-80.
36. Cheng WF, Huang CY, Chang MC, Hu YH, Chiang YC, Chen YL, et al. High mesothelin correlates with chemoresistance and poor survival in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer*. 7 avr 2009;100(7):1144-53.
37. N S, R H, Db A, Kj W, S Y, Lj T, et al. Pretargeted radioimmunotherapy of mesothelin-expressing cancer using a tetravalent single-chain Fv-streptavidin fusion protein. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med [Internet]*. juill 2005 [cité 2 nov 2022];46(7). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16000290/>
38. Breidenbach M, Rein DT, Everts M, Glasgow JN, Wang M, Passineau MJ, et al. Mesothelin-mediated targeting of adenoviral vectors for ovarian cancer gene therapy. *Gene Ther*. janv 2005;12(2):187-93.
39. Armstrong DK, Laheru D, Ma WW, Cohen SJ, Phillips M, Brahmer J, et al. A phase 1 study of MORAb-009, a monoclonal antibody against mesothelin in pancreatic cancer, mesothelioma and ovarian adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 20 juin 2007;25(18_suppl):14041-14041.
40. Kijanka M, Dorresteijn B, Oliveira S, van Bergen en Henegouwen PM. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomed*. 1 janv 2015;10(1):161-74.
41. Chakravarty R, Goel S, Cai W. Nanobody: The “Magic Bullet” for Molecular Imaging? *Theranostics*. 29 janv 2014;4(4):386-98.
42. Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett*. 1997;414(3):521-6.
43. Kijanka M, Warnders FJ, Khattabi M, Hooge M, Dam G, Ntziachristos V, et al. Rapid optical imaging of human breast tumour xenografts using anti-HER2 VHHs site-directly conjugated to IRDye 800CW for image-guided surgery. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 19 juin 2013;40.

VI. Bibliographie.

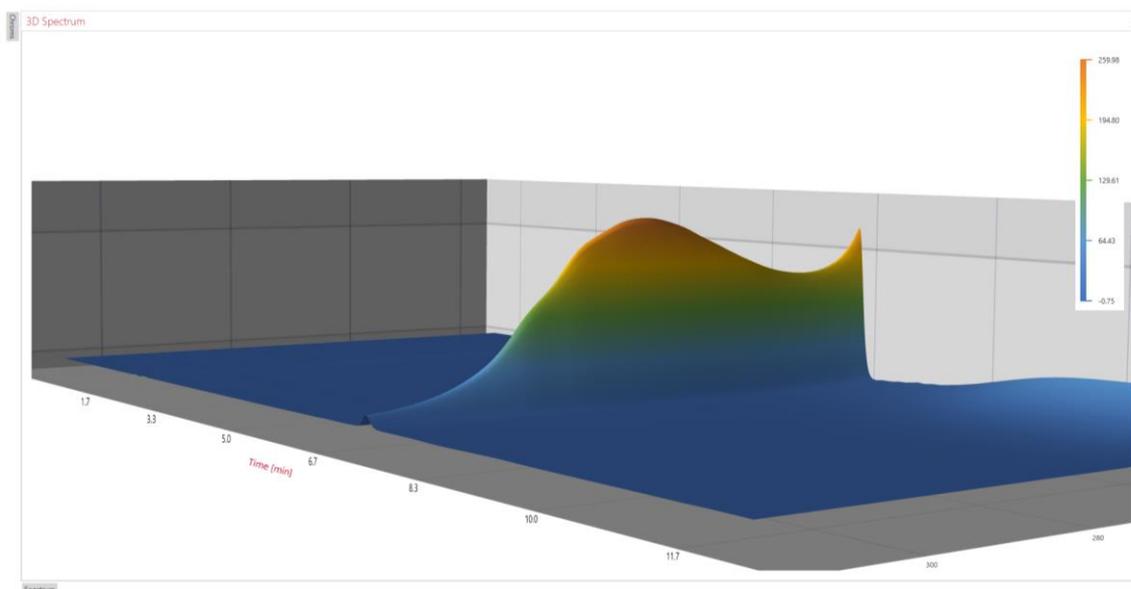
44. Hrynchak I, Santos L, Falcão A, Gomes CM, Abrunhosa AJ. Nanobody-Based Theranostic Agents for HER2-Positive Breast Cancer: Radiolabeling Strategies. *Int J Mol Sci.* 4 oct 2021;22(19):10745.
45. Schmitz KR, Bagchi A, Roovers RC, van Bergen en Henegouwen PMP, Ferguson KM. Structural evaluation of EGFR inhibition mechanisms for nanobodies/VHH domains. *Struct Lond Engl* 1993. 2 juill 2013;21(7):1214-24.
46. Ahmadi M. NOUVEAUX RADIOTRACEURS PEPTIDIQUES POUR L'IMAGERIE NUCLEAIRE Radiomarquage, évaluations physico-chimiques et pharmacologiques. :239.
47. Montemagno C. Développement de radiotraceurs pour l'imagerie phénotypique des cancers du sein métastatiques. :292.
48. Mant CT, Chen Y, Yan Z, Popa TV, Kovacs JM, Mills JB, et al. HPLC Analysis and Purification of Peptides. :53.
49. Sidhom K, Obi PO, Saleem A. A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *Int J Mol Sci.* 4 sept 2020;21(18):6466.
50. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc.* déc 2006;1(6):2876-90.
51. Rogers DM, Jasim SB, Dyer NT, Auvray F, Réfrégiers M, Hirst JD. Electronic Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins. *Chem.* nov 2019;5(11):2751-74.
52. Carbonnelle É, Nassif X. Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *médecine/sciences.* oct 2011;27(10):882-8.
53. Breeman W, de Jong M, Blois E, Bernard B, Konijnenberg M, Krenning E. Radiolabelling DOTA-peptides with Ga-68. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 1 mai 2005;32:478-85.
54. Alonso Villela SM, Kraïem H, Bouhaouala-Zahar B, Bideaux C, Aceves Lara CA, Fillaudeau L. A protocol for recombinant protein quantification by densitometry. *MicrobiologyOpen.* 7 avr 2020;9(6):e1027.
55. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci Publ Protein Soc.* nov 1995;4(11):2411-23.
56. Kruger NJ. The Bradford Method for Protein Quantitation. In: *Protein Protocols Handbook, The* [Internet]. New Jersey: Humana Press; 2002 [cité 30 oct 2022]. p. 15-22. Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-169-8:15>
57. Strand J, Honarvar H, Perols A, Orlova A, Selvaraju RK, Karlström AE, et al. Influence of Macrocyclic Chelators on the Targeting Properties of ⁶⁸Ga-Labeled Synthetic Affibody Molecules: Comparison with ¹¹¹In-Labeled Counterparts. *PLoS ONE.* 1 août 2013;8(8):e70028.
58. Meisenheimer M, Kürpig S, Essler M, Eppard E. Manual vs automated ⁶⁸Ga-radiolabelling—A comparison of optimized processes. *J Label Compd Radiopharm.* 2020;63(4):162-73.

VI. Bibliographie.

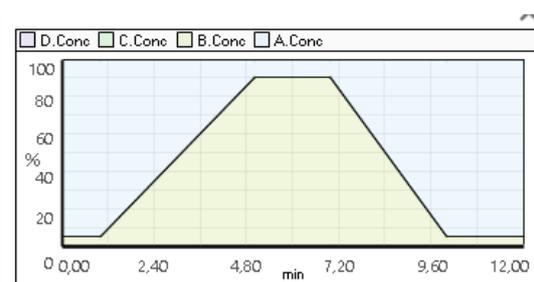
59. Localization, mechanism and reduction of renal retention of technetium-99m labeled epidermal growth factor receptor-specific nanobody in mice. [cité 21 mars 2023]; Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmml.408>
60. Reducing the renal retention of low- to moderate-molecular-weight radiopharmaceuticals | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 21 mars 2023]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1367593121000934?token=CE4A5B162B4DAAC4BB85EB277FE25AA11F3F7BE46198A489CA62A6F33A9532A4C0275F1E991C3156C74D2D094A7E090F&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230321183837>

VII. Annexes.

Annexe 1 : Profil 3D de l'absorption du nanobody A1-His avec RP-HPLC et



Annexe 2 : gradient des solvants sur 12min

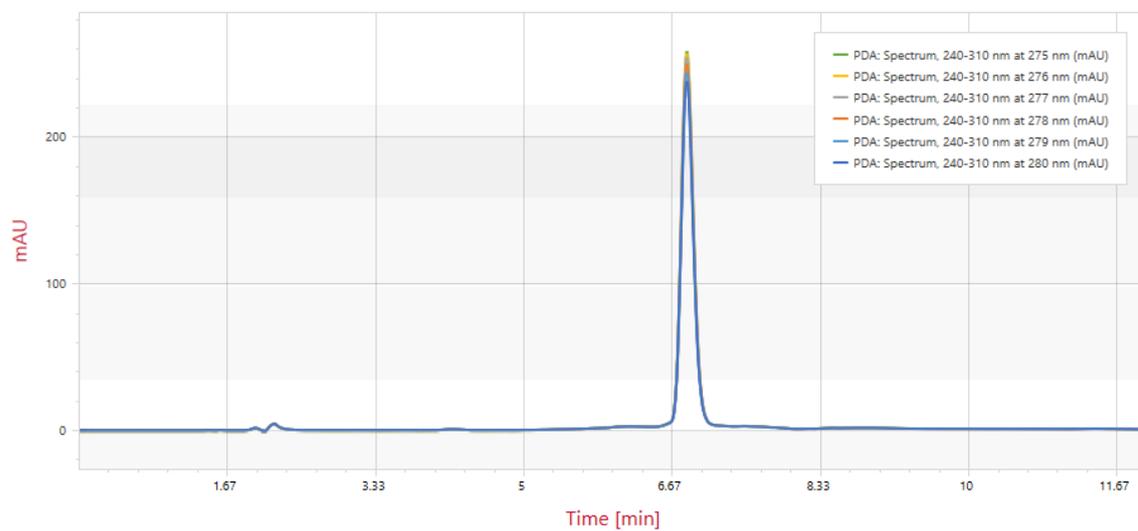


Advanced Simple

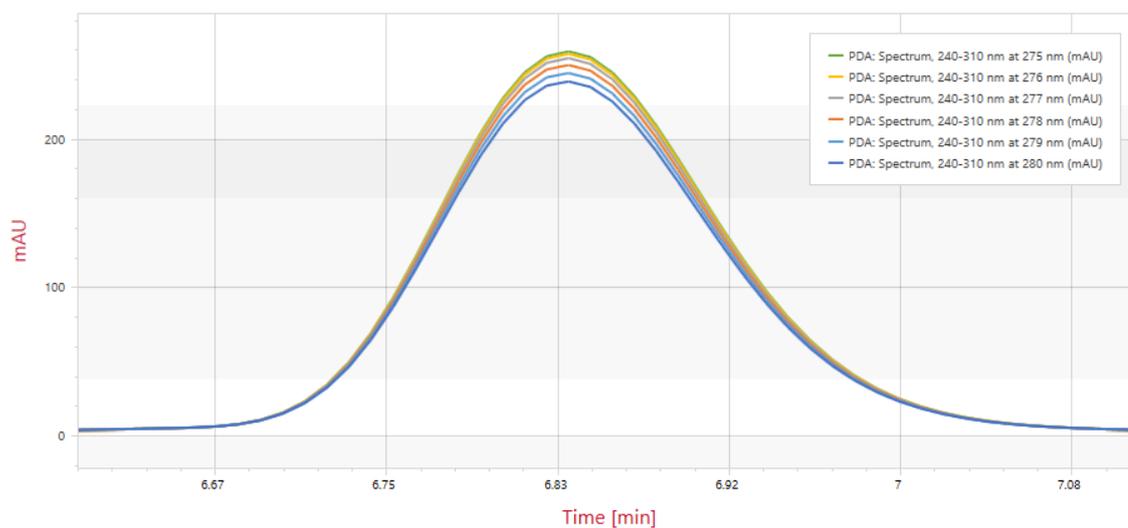
| | Time | Flow | A.Conc | B.Conc | C.Conc | D.Conc | B.Curve |
|---|-------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|
| 1 | | 1,000 | 95,0 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0 |
| 2 | 1,00 | 1,000 | 95,0 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0 |
| 3 | 5,00 | 1,000 | 10,0 | 90,0 | 0,0 | 0,0 | 0 |
| 4 | 7,00 | 1,000 | 10,0 | 90,0 | 0,0 | 0,0 | 0 |
| 5 | 10,00 | 1,000 | 95,0 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0 |
| 6 | 12,00 | 1,000 | 95,0 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0 |
| 7 | | | | | | | |

Annexe 3 : spectre d'absorption du nanobody A1-His à proximité du λ_{max} (a)
Zoom sur 6.83 min (b)

a



b





Serment de Galien



« En présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) 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.

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

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

M. Thibault GUENARD

Développement d'un radiotracteur à visée théranostique des tumeurs solides : conjugaison et radiomarquage au Gallium-68 d'un nanobody.

Mots clés : Radiomarquage, nanobody, théranostique, Gallium, DOTA, NOTA, HPLC

Résumé : Le théranostique est aujourd'hui une des options de traitements des pathologies cancéreuses, s'inscrivant dans le développement de la médecine personnalisée. Cette thèse s'intéresse ainsi au développement préliminaire d'un outil théranostique des tumeurs solides en radiopharmacie basé sur l'utilisation d'un nanobody radiomarqué au Gallium-67 et au Lutétium-177. Les étapes détaillées reprennent la caractérisation d'un nanobody, en passant par la mise en place d'analyses HPLC, de dichroïsme circulaire ainsi que différentes méthodes de dosages applicables aux protéines. Dans un second, la présentation de l'optimisation des étapes de conjugaison par un chélatant bifonctionnel (DOTA et NOTA) est détaillée afin de sélectionner le chélatant adapté. Enfin l'optimisation du radiomarquage du nanobody chélaté est également détaillée en considérant différents aspects physico-chimiques de la réaction.

Spécialité : Recherche