

Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Charlotte FONTAN**

**le** lundi 23 septembre 2013

**Titre :**

Imagerie du lymphome chez le petit animal :  
Mise au point de radiotraceurs tumoraux  
et étude de la biodistribution cellulaire

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED GEET : Génie Electrique

**Unité de recherche :**

Unité INSERM U 825 : Imagerie cérébrale et handicaps neurologiques

**Directeur(s) de Thèse :**

Mathieu TAFANI (MCU-PH Toulouse)

**Jury :**

GUILLOTEAU Denis (PU-PH Université de Tours) - Rapporteur  
LE BARS Didier (MCU-PH Université de Lyon) - Rapporteur  
ATTAL Michel (PU-PH Université de Toulouse) - Président de jury  
COURET Isabelle (MCU-PH Université de Montpellier) - Examineur  
PAYOUX Pierre (PU-PH Université de Toulouse) - Examineur

IMAGERIE DU LYMPHOME CHEZ LE PETIT ANIMAL :  
MISE AU POINT DE RADIOTRACEURS TUMORAUX  
ET ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION CELLULAIRE

Charlotte FONTAN

## **REMERCIEMENTS**

Les remerciements de cette thèse s'adressent tout d'abord à tous les membres de ce jury. Au terme de ces années, vous me faites l'honneur de juger ce travail. Pour cela, je vous en suis très reconnaissante.

Monsieur le Professeur M. Attal,

Il était important pour moi que vous présidiez cette thèse car vous avez toujours fait preuve de bienveillance à mon égard et vous avez probablement été le premier à croire en moi.

Cette thèse n'aurait probablement jamais vu le jour sans vous.

Pour tout cela je vous remercie et j'espère que nous pourrons continuer à travailler ensemble.

Messieurs les rapporteurs Professeur D. Guilloteau et Docteur D. Le Bars,

Votre présence dans ce jury est symbolique car vous représentez la voie hospitalo-universitaire vers laquelle je me dirige en vous présentant mon travail. J'espère ne pas vous décevoir.

Madame le Docteur I Couret,

Je te remercie d'être la touche féminine de ce jury.

A tes côtés j'ai pu découvrir l'univers du Zirconium 89. Je te remercie pour le soutien que tu m'as apporté durant ces derniers mois et j'espère que nous pourrons continuer à travailler ensemble sur ce projet novateur.

Monsieur le Professeur Payoux,

Ton investissement et ton dynamisme forcent le respect.

Ta présence dans ce jury est naturelle car sans toi les dernières expérimentations n'auraient pas pu voir le jour. J'espère pouvoir continuer à travailler dans ton entourage.

Monsieur le Docteur Y. Coulais,

Qu'aurais-je fait sans vous ?

Vous êtes un des spécialistes de la chimie du technétium. Pour préparer l'après Yvon Coulais, vous avez partagé vos connaissances avec beaucoup de gentillesse et de bonne humeur. J'espère être digne de vos attentes.

Ce travail vous est dédié.

Monsieur le Docteur JJ Fournié,

Vous avez été présent à mes débuts et grâce à vous j'ai pu acquérir des compétences précieuses en expérimentation préclinique. Pour tout cela je vous en remercie.

Monsieur le Docteur M. Tafani, directeur de thèse,

Depuis le début tu m'as accordé ta confiance. Ce travail n'a pas été facile et tu as été présent dans les moments les plus critiques pour me soutenir. Grâce à toi, j'ai déjà accompli de belles choses professionnelles et j'espère que cela continuera encore longtemps. Je mesure la chance que j'ai de t'avoir comme chef. Tu es un véritable exemple sur bien des points.

Merci pour tout.

Je tiens aussi à remercier l'unité INSERM U 825 - Imagerie cérébrale et handicaps neurologiques pour m'avoir accueillie durant ma thèse, l'UMR 1037 et spécialement Christine Bezombes de l'équipe 9 pour m'avoir aidée sur bien des points et enfin Carine Pestourie du service d'Exploration Non invasive de la plateforme GenoToul pour sa patience à mon égard.

A mes parents,

Ce travail clôture 13 années d'études et je n'y serai jamais arrivée sans vous. Votre soutien a été le plus grand de mes moteurs durant toutes ces années. Depuis tous petits vous nous avez inculqué les véritables valeurs qui font ma force aujourd'hui. Vous m'avez soutenue, épaulée et réconfortée dans les moments où j'en avais le plus besoin.

Sachez simplement que je vous aime plus que tout.

A Julien,

Mon grand frère, mon ange gardien. Tu as toujours un œil protecteur sur ta petite sœur et je mesure la chance que j'ai de t'avoir. Je t'aime.

A David,

Ces derniers mois, tu as probablement plus cru en moi que moi même. Ta patience et tes encouragements m'ont aidée à achever ce travail.

Tu t'es doucement imposé comme une évidence et depuis la vie à tes côtés me rend chaque jour plus rayonnante.

A tous mes amis, ma famille qui m'ont supportée depuis toutes ces années.

A tous mes collègues du CHU et plus particulièrement de la médecine nucléaire et de la radiopharmacie qui m'ont soutenue tout au long de ce travail.

# SOMMAIRE

<b>Remerciements</b>	<b>2</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>7</b>
<b>Liste des figures et des tableaux</b>	<b>10</b>
<b>Introduction</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre 1 : Imagerie chez le petit animal</b>	<b>16</b>
<b>I. Définitions</b>	<b>18</b>
A. <u>Imagerie anatomique</u>	18
B. <u>Imagerie fonctionnelle</u>	18
C. <u>Sensibilité, spécificité et exactitude</u>	18
1) <u>La sensibilité</u>	18
2) <u>La spécificité</u>	19
3) <u>L'exactitude</u>	19
D. <u>Résolution</u>	19
E. <u>Pixel</u>	19
F. <u>Voxel</u>	20
G. <u>Quantitatif, qualitatif</u>	20
H. <u>Région d'intérêt : ROI</u>	20
I. <u>Standard Uptake Value (SUV)</u>	20
<b>II. Les méthodes d'imagerie utilisées chez le petit animal</b>	<b>21</b>
A. <u>Techniques d'imageries réservées au petit animal</u>	22
1) <u>Techniques reposant sur la fluorescence</u>	22
2) <u>La bioluminescence</u>	27
B. <u>Les techniques d'imagerie applicable chez l'homme</u>	29
1) <u>Les techniques d'imagerie anatomiques</u>	30
2) <u>L'imagerie fonctionnelle ou métabolique : Imagerie nucléaire</u>	37
C. <u>Méthodes d'imagerie couplées</u>	41
D. <u>Comparaison des méthodes d'imagerie</u>	41
<b>Chapitre 2 : Technétium 99 métastable</b>	<b>45</b>
<b>I. Les bases physiques de la radioactivité</b>	<b>49</b>
A. <u>Transfert d'Énergie Linéique (TEL)</u>	49
B. <u>Les différents types de rayonnements</u>	50
1) <u>Les rayonnements utilisés en thérapeutique</u>	50
2) <u>Les rayonnements utilisés en imagerie diagnostique</u>	51
C. <u>La période de l'isotope radioactif</u>	52
D. <u>L'énergie du rayonnement</u>	52
E. <u>Le mode de production</u>	53
<b>II. Caractéristiques du Technétium 99 métastable</b>	<b>54</b>
A. <u>Présentation du radioélément</u>	54
1) <u>Classification et propriétés physico chimique</u>	54
2) <u>Obtention de <math>^{99m}\text{Tc}</math></u>	55
<b>III. La chimie du technétium</b>	<b>57</b>
A. <u>Définitions</u>	57
1) <u>Degré d'oxydation</u>	57
2) <u>Complexe</u>	57
3) <u>Nombre de coordination</u>	57
4) <u>Chélate</u>	57
B. <u>Prérequis à la formation des complexes technétiés</u>	58
1) <u>Théorie des acides et des bases de Pearson</u>	58
2) <u>Effet stérique</u>	59
3) <u>Le degré d'oxydation du complexe</u>	60
4) <u>La charge du complexe</u>	60
5) <u>Activité spécifique de l'isotope radioactif</u>	61
C. <u>Synthèse des complexes technétiés</u>	61
D. <u>Les complexes « <math>^{99m}\text{Tc}</math> essential »</u>	63
1) <u>L'état d'oxydation Tc (I)</u>	63

)	<u>L'état d'oxydation Tc (III)</u> .....	64
3)	<u>L'état d'oxydation Tc (V)</u> .....	64
E.	<u>Les complexes technétiés formés grâce à la présence de synthon</u> .....	66
1)	<u>L'état d'oxydation +V</u> .....	67
2)	<u>L'état d'oxydation +I</u> .....	70
	<b>Chapitre 3 : Etude du lymphome chez le petit animal</b> .....	<b>75</b>
I.	<b><u>Mise en place d'un radio traceur spécifique du lymphome</u></b> .....	<b>77</b>
A.	<u>Mise au point du marquage du Rituximab au Technetium 99m</u> .....	78
1)	<u>Matériel et méthode</u> .....	78
B.	<b>RÉSULTATS</b> .....	88
1)	<u>Mise au point de la méthode de marquage</u> .....	88
2)	<u>Etudes in vitro</u> .....	91
3)	<u>Etudes d'imagerie</u> .....	93
II.	<b><u>Marquage des anticorps avec le Zirconium 89</u></b> .....	<b>97</b>
A.	<u>L'isotope radioactif</u> .....	97
1)	<u>Avantages et inconvénients</u> .....	97
2)	<u>Production du Zirconium 89</u> .....	97
B.	<u>Chimie du Zirconium 89</u> .....	98
1)	<u>La déféroxamine</u> .....	98
2)	<u>Changement de milieu</u> .....	99
3)	<u>Modification de l'anticorps</u> .....	99
4)	<u>Radiomarquage avec le Zirconium 89 :</u> .....	102
5)	<u>Contrôles qualités :</u> .....	103
6)	<u>Avantages et inconvénients des méthodes</u> .....	104
7)	<u>Autres méthode de marquage des anticorps</u> .....	105
8)	<u>Utilisation d'antioxydant</u> .....	106
III.	<b><u>Marquage des lymphocytes T gamma delta (LT<math>\gamma\delta</math>)</u></b> .....	<b>107</b>
A.	<u>Le système immunitaire</u> .....	107
1)	<u>Système immunitaire inné</u> .....	107
2)	<u>Système immunitaire adaptatif</u> .....	108
B.	<u>Lymphocytes T<math>\gamma\delta</math>: frontière entre l'immunité innée et immunité adaptative</u> .....	110
1)	<u>Marqueurs de l'immunité innée</u> .....	110
2)	<u>Marqueurs de l'immunité adaptative : TCR<math>\gamma\delta</math></u> .....	110
3)	<u>Phénotype</u> .....	111
4)	<u>Fonctions</u> .....	112
5)	<u>Antigène reconnu</u> .....	112
C.	<u>Intérêt thérapeutique des LT<math>\gamma\delta</math></u> .....	114
1)	<u>Anticorps monoclonaux</u> .....	115
2)	<u>Les cellules du système immunitaire</u> .....	115
D.	<u>Etude de la biodistribution cellulaire des LT<math>\gamma\delta</math></u> .....	118
1)	<u>Matériels et méthodes</u> .....	118
2)	<u>Etude de la biodistribution cellulaire des LT<math>\gamma\delta</math></u> .....	123
	<b>Discussion</b> .....	<b>135</b>
	<b>Conclusion</b> .....	<b>142</b>
	<b>Perspectives</b> .....	<b>143</b>
	<b>Bibliographie</b> .....	<b>146</b>

## **Liste des abréviations**

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

APC : Allophycocyanin

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BCR : B Cell Receptor

BPs : Biphosphonates

BLI : Bioluminescence Imaging

CBR Luc : Click Beetle Red Luciférase

CCD : Charge Coupled Device

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CM : Champ magnétique

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Ag

CPM : Coups Par Minute

CT : Computed Tomography

CTL : Lymphocyte T Cytotoxique

Df : Déféroxamine B

DMSO : Dimethyl sulfoxide

[<sup>18</sup>F]-FDG : 2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucose,

FITC : Fluorescéine

FLuc : Firefly luciferase

FMT : Tomographie de fluorescence moléculaire

FRI : Fluorescence reflectance Imaging

GFP : Green Fluorescent Protein

GMP : Good Manufacturing Practice

HDMAPP : 4-Hydroxy-3-Dimethylallyl Pyrophosphate

HEPES : (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid )

HMPAO : Hexamethylpropyleneamine Oxime

HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

ICAM : Inter-Cellular Adhesion Molecule

IFN: Interferon

Ig : Immunoglobuline

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

IPP : Isopentenyl Pyrophosphate  
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif  
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif  
keV : Kilolectronvolt  
kg : Kilogramme  
KIR : Killer cell Ig-like Receptor  
LBF : Ligand BiFonctionnel  
LSCM : Laser-Scanning Confocal Microscopy,  
LNH : Lymphomes non Hodgkiniens  
LT $\gamma\delta$  : Lymphocytes T gamma delta  
2-ME : 2-Mercaptoéthanol  
MICA/B : MHC Class I-related Chain A ou B  
MBq : Méga Becquerel  
<sup>99</sup>Mo : 99 Molybdène  
MPM : Multiphoton Microscopy  
MRP : Médicament Radiopharmaceutique  
MVA : Mévalonate :  
N-BP : Nitrogène Bps  
PAg : Phosphoantigène  
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells  
PBS : Phosphate Buffered Saline  
PM : Poids Moléculaire  
RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
SCID : Severe Combined Immunodeficient  
SPE : Solid Phase Extraction  
SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography  
TCR : T Cell Receptor  
TDM : Tomodensitométrie  
<sup>99m</sup>Tc : Technetium 99 métastable  
TEL : Transfert d'Énergie Linéique  
TEMh : T Effectory Memory Cells helper  
TEMP : Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP)  
TEP : Tomographie par Emission de Positron  
TEMRA : T Effectory Memory Cells RA

TFP : TetraFluoroPhenol

TNF : Tumor Necrosis Factor

ULBP : UL16-binding protein

## Liste des figures et tableaux

### Figures :

Figure 1 : Techniques d'imageries utilisées en oncologie

Figure 2 : Les différents types de traceurs fluorescents

Figure 3 : Microscopie intravitale dans le myélome multiple

Figure 4 : Visualisation tumorale en FRI

Figure 5 : Imagerie d'hypoxie tumorale en FMT

Figure 6 : Réaction de bioluminescence

Figure 7 : Bioluminescence de souris greffées avec des cellules lymphomateuses transfectées avec de la luciférase

Figure 8 : Radiographie de la main l'épouse de Röntgen (1895)

Figure 9 : Radiographie de la patte droite d'une souris injectée avec des cellules myélomateuses

Figure 10 : Différentes coupe d'une souris en CT

Figure 11 : Tumeur hyperéchogène

Figure 12 : Echodoppler du canal artériel chez un rat

Figure 13 : Visualisation d'une tumeur chez la souris grâce à anticorps couplé aux nanorods en optoacoustique

Figure 14 : IRM de rat porteur d'un gliome

Figure 15 : Visualisation d'une tumeur chez une souris en scintigraphie planaire

Figure 16 : Ventriculographie en SPECT chez la souris

Figure 17 : TEP au [<sup>18</sup>F]FDG chez une souris porteuse d'un lymphome

Figure 18 : Métastases osseuse détectées en SPECT/CT chez la souris

Figure 19 : Souris en  $\mu$ PET/CT

Figure 20 : Premier dispositif de H.Becquerel

Figure 21 : Première image obtenue par H. Becquerel après exposition solaire

Figure 22 : Image développée par H. Becquerel après être restée dans l'obscurité

Figure 23 : Diagramme potentiel/pH du technétium dans l'eau à 25°C

Figure 24 : Schéma de désintégration du <sup>99</sup>Mo

Figure 25 : Schéma du générateur de technétium 99 métastable

Figure 26 : Les principaux cœurs technétiés et les principaux états d'oxydation du cœur métallique

Figure 27 : Complexe technétié au degré d'oxydation +I : Cardiolite®

Figure 28 : Ligand à cœur de technétium  $[TcO]^{3+}$  : complexe HMPAO

Figure 29 : Ligand à cœur  $[TcO_2]^+$ . Ligand phosphine Tetrofosmin (Myoview®)

Figure 30 : Schéma d'un chélate bifonctionnel

Figure 31 : Structure de  $[TcO(MAG_3H)]-$ -(Mertiatide)

Figure 32 : Structure du complexe  $^{99m}Tc$ -HYNIC- biomolécule (BM)

Figure 33 : Génération du cœur technétié tricarbonyle à partir du boranocarbonate

Figure 34 : Réaction de l'histidine avec le cœur technétié tricarbonyle

Figure 35 : Rendement de marquage lors de la complexation de différents acides aminés avec le cœur technétié tricarbonyle

Figure 36 : Structure du Rituximab

Figure 37 : Gamma caméra Biospace  $\gamma$ -IMAGER

Figure 38 : Principe de fonctionnement d'une  $\gamma$  caméra

Figure 39 : Gamma caméra nanoSPECT/CT

Figure 40 : Evaluation de la PRC du  $[^{99m}Tc(CO)_3]$ -Rituximab

Figure 41 : Evaluation de l'influence de la solution milieu du Rituximab sur le marquage

Figure 42 : Evaluation du pH de l'isolink sur le marquage du Rituximab

Figure 43 : Stabilité du  $[^{99m}Tc(CO)_3]$ -Rituximab dans le plasma à 20h

Figure 44 : Immunoréactivité du  $[^{99m}Tc(CO)_3]$ -Rituximab sur les cellules DAUDI

Figure 45 : Essai de binding du  $[^{99m}Tc(CO)_3]$ -Rituximab sur les cellules DAUDI

Figure 46 : Visualisation d'un lymphome humain DAUDI xéno greffé chez la souris SCID Beige 5h après l'injection

Figure 47 : Visualisation d'un lymphome humain DAUDI xéno greffé chez la souris SCID Beige 24h après l'injection

Figure 48 : Méthode de marquage d'un anticorps avec le Zirconium 89 par le *N-sucD*

Figure 49 : Méthode de marquage d'un anticorps avec le Zirconium 89 par le Df-Bz-NCS

Figure 50 : Evaluation de la pureté radiochimique (PRC) du  $^{89}Zr$  *N-sucDf*-Cetuxime

Figure 51 : Immunoréactivité du  $^{89}Zr$  *N-sucDf*-Cetuximab sur la lignée cellulaire A 431

Figure 52 : Evaluation du nombre de TFP-N-sucDf-Fe conjugués au Cetuximab

Figure 53 : Réponse immunitaire innée et adaptative

Figure 54 : Maturation des  $LT\gamma\delta$

Figure 55 : Synthèse des phosphoantigènes

Figure 56 : Mécanisme d'activation des  $LT\gamma\delta$  par les biphosphonates

Figure 57 : Biodistribution chez une souris SCID Beige du pertechnétate de sodium en utilisant 2  $\gamma$  caméras

Figure 58: Distribution chez la souris SCID Beige du  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO trente minutes après injection intraveineuse de 37 MBq

Figure 59 : Biodistribution chez la souris SCID Beige de 10 millions de  $\text{LT}\gamma\delta$  marqués avec de  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO

Figure 60 : Comparaison de la biodistribution chez la souris SCID Beige du pertechnétate de sodium, du  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO et des  $\text{LT}\gamma\delta$  marqués au  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO

Figure 61 : Etude de la biodistribution chez la souris SCID Beige des  $\text{LT}\gamma\delta$  pendant 48h

Figure 62 : Biodistribution chez la souris SCID Beige des  $\text{LT}\gamma\delta$  marqués

Figure 63 : Etude de la biodistribution tumorale des  $\text{LT}\gamma\delta$  marqués avec du  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO chez la souris SCID Beige xenogreffée d'un lymphome

Figure 64 : Cinétique de distribution des  $\text{LT}\gamma\delta$  marqués chez la souris SCID Beige xénogreffée d'un lymphome RAJI

Figure 65 : Etude de la biodistribution tumorale des  $\text{LT}\gamma\delta$  marqués avec 8 MBq d'oxinate d'indium 111 chez la souris SCID Beige xenogreffée d'un lymphome

Figure 66 : Comparaison de la biodistribution tumorale des  $\text{LT}\gamma\delta$  marqués avec la caméra  $\gamma$ -imager Biospace et la nano SPECT/CT Biospace

### **Tableaux :**

Tableau 1 : Comparaison des différentes techniques d'imagerie présentes chez le petit animal

Tableau 2 : Présentation des différentes techniques d'imagerie utilisées en oncologie chez le petit animal

Tableau 3 : Comparaison clinique et préclinique de l'imagerie TEP et TEMP

Tableau 4 : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Rituximab chez les souris SCID-Beige xénogreffées avec un lymphome humain RAJI

Tableau 5 : Amélioration de la technique de marquage des polynucléaires au  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO

Tableau 6 : Amélioration de la technique de marquage des plaquettes à l'oxinate d'indium 111

Tableau 7 : Biodistribution de  $\text{LT}\gamma\delta$  48h après l'injection rétroorbitale de 8 MBq de cellules marquées à l'oxinate d'indium 111

# INTRODUCTION GENERALE

Aujourd'hui, le cancer représente la 3<sup>ème</sup> cause mondiale de décès après les pathologies cardiovasculaires et les maladies infectieuses. Chaque année, il y a environ 12,7 millions de nouveaux cas diagnostiqués et 7,6 millions de décès (chiffre 2008). Parmi les pathologies tumorales les plus fréquemment rencontrées, on retrouve le cancer du poumon (1,61 million), du sein (1,38 million) et les cancers colorectaux (1,23 million) [1]. La compréhension des mécanismes cellulaires responsables de la cancérogénèse est un enjeu fondamental dans la découverte de nouvelles molécules et une prise en charge adaptée et individuelle de chaque patient. En effet, les traitements actuels bien que de plus en plus efficaces ne permettent pas encore de cibler spécifiquement la cellule cancéreuse ce qui entraîne de nombreux effets indésirables.

La recherche de traitements plus actifs, plus spécifiques des tumeurs et moins toxiques sur les cellules normales est un objectif commun aux chercheurs, industriels et cliniciens.

Le développement d'une molécule potentiellement active passe par 4 phases : la phase d'identification, la phase d'essai pré-clinique réalisée *in vitro* sur des lignées cellulaires et chez le petit animal, la phase clinique chez l'homme sain et malade et la phase de commercialisation. A toutes les étapes, l'évaluation de l'efficacité de la molécule d'intérêt se fait par les méthodes d'imagerie [2]. En effet, on les retrouve dans l'identification d'une cible au travers des méthodes de screening ou encore dans l'étude de la biodistribution de la molécule et de son éventuel effet thérapeutique *in vivo* chez le petit animal. Ainsi, la place de l'imagerie en oncologie est aujourd'hui indéniable comme l'atteste les critères RECIST pour les tumeurs solides [3] ou CHESON pour les lymphomes [4].

C'est dans ce dernier cas que l'apport de l'imagerie et plus particulièrement de la Tomographie par Emission de Positron (TEP) avec le <sup>18</sup>F-Fluorodéoxyglucose [<sup>18</sup>F]FDG est le plus flagrant [5]. En effet, l'évaluation du métabolisme de la tumeur à différentes étapes du parcours médical du patient s'est avérée être un facteur pronostic important. La prise en charge des patients a donc été améliorée [6].

Malgré les avantages apportés par l'imagerie métabolique au [<sup>18</sup>F]FDG, cette molécule reflète uniquement la consommation glucidique des cellules et n'est donc

pas spécifique du processus tumoral. Son utilisation n'est pas adaptée dans le cas des tumeurs à faible taux de renouvellement comme les lymphomes indolents. De plus, la dosimétrie du patient après un ou plusieurs examens TEP est plus importante que lors d'une scintigraphie de Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP ou SPECT) au technétium 99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ).

Dans le domaine de l'oncologie, les recherches effectuées actuellement en imagerie fonctionnelle ont pour but de cibler spécifiquement les cellules tumorales pour étudier leur comportement.

L'étude du lymphome nous a paru intéressante car cette maladie est en augmentation croissante. En effet, 360.000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année dans le monde et ils sont la cause de 200.000 décès. A l'échelle française, ils représentent le cancer hématologique le plus répandu avec 14.000 nouveaux cas par an soit 2 fois plus que les leucémies. Bien que l'incidence de la maladie de Hodgkin ait un peu diminué ces dernières années, les lymphomes non Hodgkiniens (LNH) sont en constante augmentation avec une hausse de 5% par an sur les 20 dernières années. Ceci les place au 3<sup>ème</sup> rang des cancers chez l'enfant, au 6<sup>ème</sup> rang des cancers de l'adulte et représente la 9<sup>ème</sup> cause de décès en France (5000 personnes) [7].

Si on s'intéresse à l'aspect cellulaire des lymphomes, il s'agit dans la plupart des cas de lymphocytes B qui expriment à leur surface des molécules comme le CD 20 cible du Rituximab, anticorps monoclonal associé à de nombreuses chimiothérapies dans le traitement des lymphomes.

Le travail de cette thèse a donc consisté à montrer l'intérêt de l'imagerie métabolique suivant 2 approches : une plutôt orientée diagnostic avec la mise au point d'un traceur spécifique de lymphome en utilisant le rituximab. Il s'agit d'un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le CD 20 des lymphocytes B retrouvés à la surface de plus de 80% des cellules lymphomateuses. Nous l'avons marqué de manière originale avec le principal isotope radioactif utilisé en diagnostic  $\gamma$ , le technétium 99 métastable sans étape de réduction spécifique de l'anticorps. En théorie, l'utilisation d'un radio traceur spécifique de tumeur pourrait permettre de visualiser avec une grande spécificité une tumeur qu'elle soit active ou indolente et de suivre son évolution au fur et à mesure des traitements. De plus, grâce à leur chimie assez proche, il est parfois possible de remplacer un radioisotope

diagnostique comme le  $^{99m}\text{Tc}$  par un isotope utilisé en thérapeutique comme le rhénium.

L'autre approche de l'imagerie fonctionnelle abordée dans ce travail est plutôt thérapeutique car elle permettrait de prédire l'efficacité d'un traitement par des cellules aux propriétés antitumorales. Pour cela, nous avons marqué à l'aide d'un médicament radiopharmaceutique (MRP) des lymphocytes  $T\gamma\delta$  qui sont des cellules présentant des fonctions de surveillance antitumorales intéressantes. Nous avons étudié leur biodistribution physiologique chez le petit animal sain, puis nous avons réalisé les mêmes expériences chez le petit animal greffé d'un lymphome humain pour évaluer, s'il existe, le recrutement tumoral.

Dans ce manuscrit nous retrouverons dans un premier temps les différentes techniques d'imagerie disponibles chez le petit animal dans le domaine de l'oncologie. Dans une deuxième partie nous nous intéresserons à l'isotope radioactif de référence en diagnostic gamma, le technétium 99 métastable et nous détaillerons sa chimie. Enfin dans une dernière partie, nous montrerons 2 approches de l'activité radiopharmaceutique au travers, d'une part, de la mise au point radiotraceur diagnostique spécifique des lymphomes CD 20+, et d'autre part d'une approche plus thérapeutique avec le marquage de lymphocytes  $T\gamma\delta$  humains antitumoraux et l'étude de leur distribution chez le petit animal sain et malade. Enfin, nous concluons par les perspectives engendrées par ce travail.

## Chapitre 1 :

### **IMAGERIE CHEZ LE PETIT ANIMAL**

Aujourd'hui, pour établir le diagnostic d'un cancer, le clinicien va avoir besoin de 4 types d'examens. Le premier est clinique avec la recherche de signes ou de symptômes évocateurs, le second est biologique puis anatomopathologique pour rechercher au niveau cellulaire ou tissulaire des signatures caractéristiques du phénomène de cancérisation et enfin les examens d'imagerie médicale pour évaluer l'extension de la maladie. En plus d'apporter une aide au moment du diagnostic, l'imagerie permet aussi suivre l'efficacité des traitements et de surveiller les patients à la fin des traitements.

Pendant de nombreuses années, l'utilisation des modèles animaux se limitait à évaluer la toxicité de nouvelles molécules testées ou à étudier le génome. Depuis une trentaine d'années, les découvertes et surtout les avancées technologiques ont permis d'appliquer les méthodes d'imagerie dédiées à l'homme au petit animal permettant ainsi de mieux étudier les phénomènes biologiques responsables de la cancérisation, d'analyser la biodistribution d'une molécule thérapeutique et d'évaluer son efficacité dans le temps chez un animal malade. Les différentes techniques d'imagerie présentes maintenant chez le petit animal peuvent se classer suivant le type d'énergie utilisé, suivant la résolution des appareils ou suivant le type d'informations recherchées (anatomique ou fonctionnelle). Nous allons donc nous intéresser aux différentes modalités d'imagerie présentes en oncologie chez le petit animal mais avant cela il va falloir définir plusieurs termes importants pour bien comprendre l'imagerie [2, 8, 9].

## **I. Définitions**

### **A. Imagerie anatomique**

Appelée aussi imagerie structurale, elle cherche à identifier, localiser et mesurer les différentes parties de l'anatomie. On retrouve la radiographie 2D, le scanner (CT), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'échographie qui seront décrits plus bas.

### **B. Imagerie fonctionnelle**

Aussi appelée imagerie métabolique, elle consiste à évaluer le fonctionnement d'un organe. On retrouve la TEMP, la TEP, l'IRM utilisées en routine clinique. La fluorescence (FMT et FRI), la bioluminescence (BLI), la microscopie confocale (LSCM) et la microscopie multiphotons (MPM) seront décrites plus bas.

### **C. Sensibilité, spécificité et exactitude**

Pour pouvoir définir ces 3 termes, nous allons nous placer dans le cas où un clinicien interprète une image où 2 réponses sont possibles : la réponse positive (présence d'une masse tumorale) et la réponse négative (absence de masse tumorale). L'analyse de ces réponses va se faire en triant les réponses négatives et positives en fonction de la vraie réponse. Il y a donc 4 cas possibles :

- les images positives et identifiées comme telles par le clinicien : ce sont les vrais positifs (VP).
- les images négatives et identifiées comme telles : ce sont les vrais négatifs (VN).
- les images positives classées comme négatives : ce sont les faux négatifs (FN).
- les images négatives classées comme positives : ce sont les faux positifs (FP).

A partir de cela on peut donc définir :

#### **1) La sensibilité :**

Il s'agit du pourcentage de cas positifs correctement identifiés :  $Se = VP/(VP+FN)$ .

## 2) La spécificité :

Il s'agit du pourcentage de cas négatifs correctement identifiés :  $Sp = VN/(VN+FP)$

## 3) L'exactitude :

Il s'agit du pourcentage de cas, positifs ou négatifs, correctement identifiés.

$$Ex = (VN+VP)/(VN+VP+FP+FN)$$

Pour évaluer la présence ou l'absence de tumeur, le clinicien suit un seuil de décision élaboré à partir des « gold standard ». Au dessus de ce seuil, il qualifie les images de positives, et en dessous, il les considère comme négatives.

Pour une réponse optimale, il faut que les taux de faux négatifs et de faux positifs soient faibles. Mais ils dépendent du seuil choisi et varient dans le même sens.

Ainsi, si les recommandations fixent un seuil « alarmiste », plus de cas positifs seront détectés, augmentant ainsi la sensibilité du test. Le taux de détection augmentera car plus d'anomalies seront correctement détectées. L'inconvénient étant que le taux de faux positifs augmentera également vu que plus de cas normaux, proches de la limite, seront considérés comme anormaux.

Inversement, si le clinicien fixe un seuil plus « prudent », il augmente la spécificité à cause d'un taux de faux positif qui diminue (moins de cas normaux seront considérés comme positifs), par contre le taux de détection baissera également (moins de cas anormaux seront pris en compte).

Pour le clinicien, le choix du seuil dépend de ce qu'il veut obtenir, et de la balance entre le risque que représente un faux positif et celui d'une faible détection.

## D. Résolution

La résolution spatiale est la plus petite distance réelle entre deux points adjacents que le système d'imagerie peut séparer. Elle mesure donc la finesse des détails d'une image, pour une dimension donnée. Elle s'exprime en unité de longueur.

## E. Pixel :

Le pixel, est l'unité de base permettant de mesurer la définition d'une image numérique matricielle

## **F. Voxel**

Le voxel (contraction de « volumetric element ») est un pixel en 3D. Il consiste à stocker une information colorimétrique avec ses coordonnées spatiales (x,y,z) de positionnement ainsi que, facultativement, une taille relative à l'unité utilisée ou d'autres informations telles qu'une matière. En imagerie médicale, il est utilisé pour la représentation d'espaces 3D, par traitement numérique de coupes 2D issues des machines d'investigation (scanner, IRM ...).

## **G. Quantitatif, qualitatif**

Si on s'intéresse à la TEP au [<sup>18</sup>F]FDG :

Une interprétation qualitative consiste à détecter et à localiser des tumeurs à partir des images obtenues.

Une interprétation quantitative calculant un indice de captation du glucose comme le rapport entre la concentration radioactive mesurée dans une tumeur et la dose injectée au patient par unité de masse.

## **H. Région d'intérêt : ROI**

Il s'agit d'une zone ou région d'une image, délimitée par un contour, sur lequel un paramètre particulier est évalué.

## **I. Standard Uptake Value (SUV)**

Il s'agit d'une méthode d'analyse semi quantitative utilisée en TEP. Elle permet de suivre l'évolution d'une tumeur au fur et à mesure d'un traitement. Il s'agit d'un rapport entre la concentration dans le tissu d'intérêt à un moment t (Ct) sur la dose injectée par kilogramme de poids du patient.

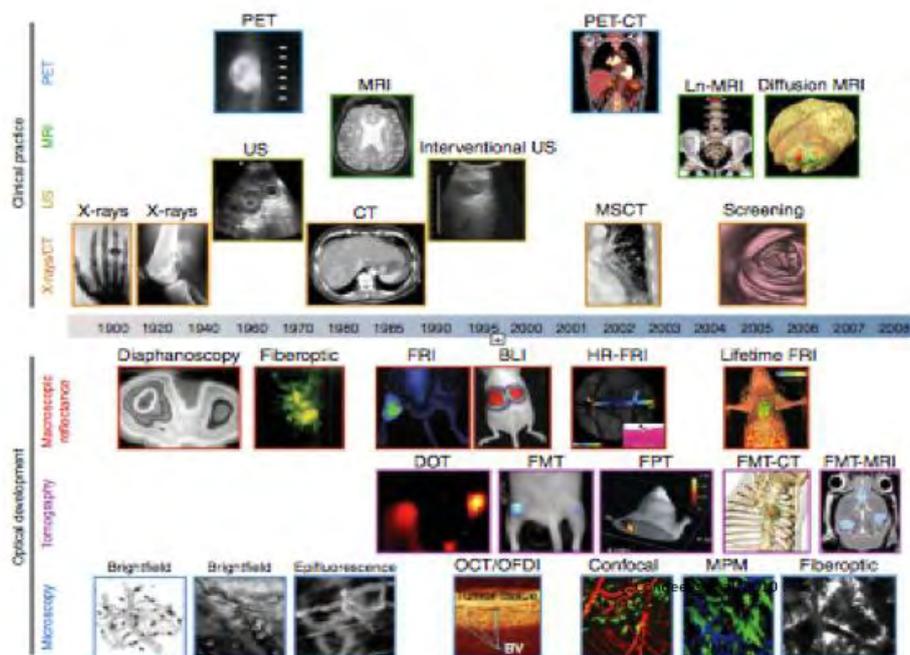
$$\text{SUV} = \text{Ct} / [\text{dose injectée (MBq)} / \text{poids du patient (kg)}]$$

## II. Les méthodes d'imagerie utilisées chez le petit animal

Sur ces 30 dernières années, les progrès technologiques et l'approfondissement des connaissances sur le fonctionnement et le développement des cellules cancéreuses ont multiplié les méthodes d'imagerie visant à étudier ces phénomènes. Plusieurs classifications sont possibles : les méthodes utilisant les rayonnements ionisants (TEMP, TEP, radiographie, scanner) et celles n'en utilisant pas (IRM, échographie, fluorescence), les méthodes d'imagerie macroscopiques et les méthodes d'imagerie microscopiques ou les méthodes permettant l'analyse anatomique (radiographie, scanner, IRM, échographie) et celles permettant une analyse métabolique (TEP, TEMP, fluorescence, bioluminescence, fibre optique, microscopie confocale).

Nous voyons que le nombre de méthodes d'imagerie conçues pour le petit animal ne cesse d'augmenter. En effet, elles présentent de nombreux avantages comme le caractère non invasif et la réalisation d'études longitudinales qui permettent d'évaluer l'efficacité antitumorale d'une molécule au cours du temps sur un même groupe d'animaux.

Nous allons donc énumérer les différentes techniques d'imagerie du petit animal en fonction de leur transposabilité possible ou pas chez l'homme (Figure 1).



**Figure 1 :** Techniques d'imageries utilisées en oncologie

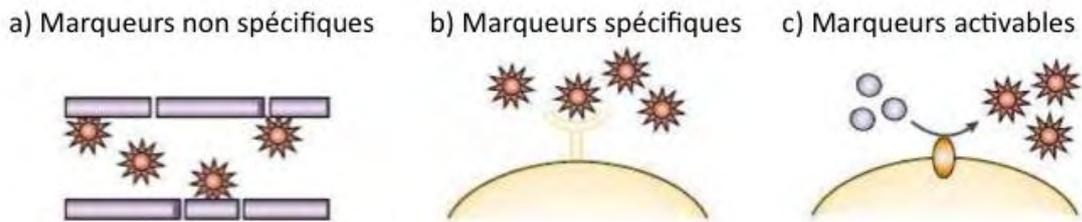
## A. Techniques d'imageries réservées au petit animal [8]

Les avancées de la technologie ont permis d'adapter au petit animal des méthodes de visualisation longtemps réservées à l'étude cellulaire. Il s'agit de techniques d'imagerie optique émergentes reposant sur la luminescence. Ce dernier terme désigne l'émission d'un rayonnement électromagnétique visible, UV ou infrarouge après absorption d'une énergie excitatrice. Si la source excitatrice est une lumière on parlera de photoluminescence (fluorescence), s'il s'agit d'une réaction enzymatique, c'est de la bioluminescence.

### 1) Techniques reposant sur la fluorescence :

Le principe repose sur la fluorescence d'une molécule d'intérêt. Une lumière monochromatique excitatrice d'une longueur d'onde donnée éclaire un échantillon marqué avec un fluorophore qui absorbe spécifiquement cette lumière. Après cette étape, le fluorophore émet à son tour une lumière monochromatique dont la longueur d'onde est supérieure à celle responsable de l'excitation. Les fluorochromes les plus connus sont la GFP (longueur d'onde d'excitation : 488 nm, longueur d'onde d'émission 507 nm : vert), le FITC (longueur d'onde d'excitation : 540 nm, longueur d'onde d'émission 580 nm : vert) ou la rhodamine (longueur d'onde d'excitation : 490 nm, longueur d'onde d'émission 525 nm : jaune, orange).

Dans les études *in vivo*, on utilise maintenant le rouge et le proche infrarouge (700-900 nm) car ils correspondent à la fenêtre physiologique c'est à dire aux longueurs d'onde les moins absorbées par les molécules biologiques comme l'hémoglobine ou la mélanine. Cela permet donc de limiter l'auto-absorption et d'analyser des tissus plus profonds. Les fluorochromes utilisés peuvent être l'Allophycocyanin (APC) longueur d'onde d'excitation : 650 nm, longueur d'onde d'émission 660 nm : rouge). Les marqueurs fluorescents utilisés peuvent être des marqueurs non spécifiques de grosses tailles qui resteront dans le secteur vasculaire pour l'étudier ou au contraire on peut retrouver des marqueurs spécifiques comme des protéines, des anticorps ou enfin des molécules activables qui émettront leur fluorescence après une réaction enzymatique (Figure 2). On peut aussi transfecter les cellules avec un fluorochrome.



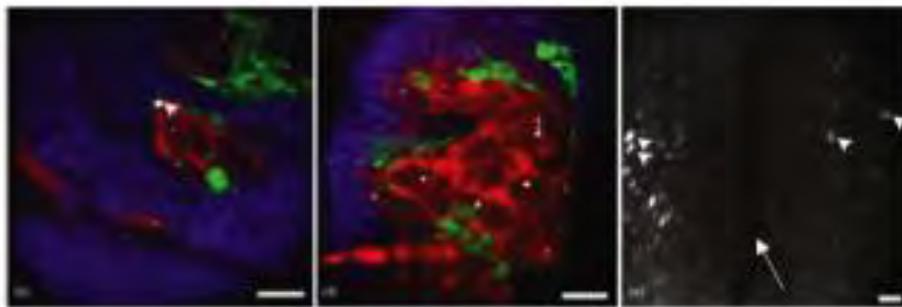
**Figure 2 :** Les différents types de traceurs fluorescents

### **(a) Microscopie intravitale [10, 11]**

Il s'agit d'une technique utilisée pour une visualisation directe d'événements *in situ* dans l'animal vivant. On peut ainsi observer distinctement des cellules, des tissus ou des organismes.

#### Principe :

L'échantillon est éclairé par un laser fin concentré sur le spécimen à analyser par une lentille. Un pinhole (diaphragme très fin) est placé devant le détecteur, dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif. L'image est formée par les photons provenant du plan focal et traversant le pinhole. La lumière laser (monochromatique) balaie la surface point par point limitant alors l'émission de lumière floue due à la fluorescence des plans adjacents au plan focal analysé (non pris en compte par le pinhole). Un balayage complet de la préparation permet d'obtenir une coupe nette ne correspondant qu'au plan focal étudié. Des améliorations de ces microscopes confocaux sont obligatoires pour une utilisation chez le vivant. En effet, cette technique ne permet qu'une analyse superficielle des tissus avec une profondeur maximum d'exploration de l'ordre de 90  $\mu\text{m}$  à haute résolution. De plus, même si le champ d'analyse est limité, le faisceau laser intense traverse quand même toute l'épaisseur du système analysé provoquant un photo-blanchiment (extinction de la fluorescence initiale suite à une irradiation intense ou prolongée) ainsi qu'une phototoxicité pour le tissu limitant le temps d'analyse. Pour une utilisation chez le petit animal il a donc fallu développer de nouveaux modes de microscopie confocale, la microscopie confocale rapide et la microscopie multiphoton (Figure 3).



JM Runnel 2011

**Figure 3** : Microscopie intravitale dans le myélome multiple

**(b) La microscopie confocale rapide**

Le microscope est composé de plusieurs pinholes confocaux disposés en spirales. Le tissu à analyser est alors excité simultanément par de nombreux rayons permettant alors d'obtenir une image plus rapidement.

**(c) La microscopie multiphoton**

Le principe repose sur l'absorption quasi-simultanée de 2 ou plusieurs photons par le fluorochrome. Cette excitation a lieu au niveau du plan focal du faisceau laser qui est l'endroit où la densité de photons est la plus importante. Les lasers utilisés ont en général une longueur d'onde dans l'infrarouge. La probabilité d'excitation par 2 photons étant plus importante au niveau du point focal de l'objectif, les tissus adjacents n'étant pas présents dans le champs étudié ne sont pas modifiés (pas de toxicité et pas de photo-blanchiment). De plus, cette technique est sujette à moins d'absorption (car utilisation de laser infrarouge) et de diffusion ce qui permet une pénétration plus profonde augmentant ainsi le champs d'analyse [12].

L'avantage de la microscopie est qu'elle possède une grande résolution de l'ordre du micromètre. Ceci permet donc l'analyse d'une seule cellule ce qui va pouvoir aider à la compréhension de la genèse des métastases en suivant la progression d'une seule cellule tumorale dans ce processus ou d'étudier le microenvironnement tumoral.

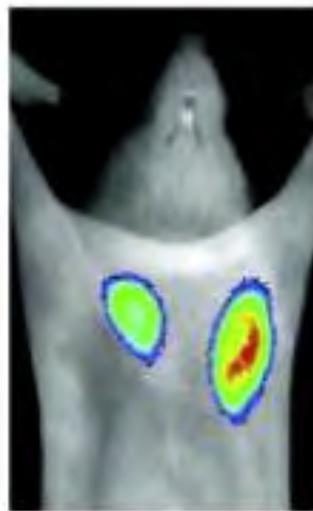
Les inconvénients sont surtout liés à la profondeur d'analyse qui ne peut dépasser 800  $\mu\text{m}$ . Ceci implique donc une analyse des tissus superficiels ou des greffes sous cutanées. Pour étudier en profondeur un tissu, il faut inciser l'animal, dégager

l'organe à étudier en prenant garde à ne pas le détériorer. Pour mettre en place une étude dans le temps, il faut créer une chambre dorsale et y injecter la tumeur à étudier.

**(d) Imagerie de fluorescence par réflexion (FRI) et transillumination**

Principe

La source de lumière et la caméra récoltant la lumière émise par le fluorochrome sont situées du même côté de l'animal. Les photons étant capables de diffuser dans les tissus, la lumière qui atteint la surface peut se propager sur quelques millimètres et peut exciter les fluorochromes situés sous la surface (Figure 4).



**Figure 4 :** Visualisation tumorale en FRI

Les avantages de cette méthode sont sa facilité de mise en œuvre, son faible coût et l'analyse simultanée et rapide de plusieurs animaux. Des organes isolés peuvent également être imagés. Elle permet d'obtenir des informations présentes en surface (tumeur xénogreffée). Elle peut être utile en peropératoire : aide à la résection des métastases, localisation des ganglions sentinelles, meilleurs définitions des marges.

Les inconvénients sont nombreux. Tout d'abord, elle ne permet pas une analyse spatiale en profondeur. En effet, même si l'intensité de la fluorescence détectée est proportionnelle à la concentration en fluorochrome présent dans une tumeur, il faut tenir compte de la profondeur de la tumeur, de ses propriétés optiques et des tissus environnants. Ainsi, avec la FRI, deux tumeurs ayant la même concentration en fluorochrome n'auront donc pas la même intensité de fluorescence si elles sont à des

profondeurs différentes, si elles ont des vascularisations différentes (plus ou moins d'hémoglobine) ou si elles sont dans deux tissus différents [13]. L'analyse n'est donc possible que sur une profondeur maximum de 5 mm. De plus, la résolution est de 1 mm et c'est une méthode en 2 dimensions qui n'est pas quantitative. Pour résoudre ces problèmes, la technique de la transillumination a été mise en place.

### **(e) Transillumination**

#### Principe

Cette fois ci la lumière excitatrice traverse le tissu de part en part : la source lumineuse et le détecteur sont donc disposés de chaque côté du tissu. Ainsi, le détecteur recueille à la fois la fluorescence émise par le tissu excité et la lumière source transmise. Cette dernière permet de mesurer l'atténuation de la lumière dans le tissu.

Les avantages : elle limite l'autofluorescence car la surface où le signal est détecté n'est pas éclairée par la lumière excitatrice. De plus, il est possible d'obtenir des images de foyers plus profonds en traversant l'intégralité du volume d'intérêt.

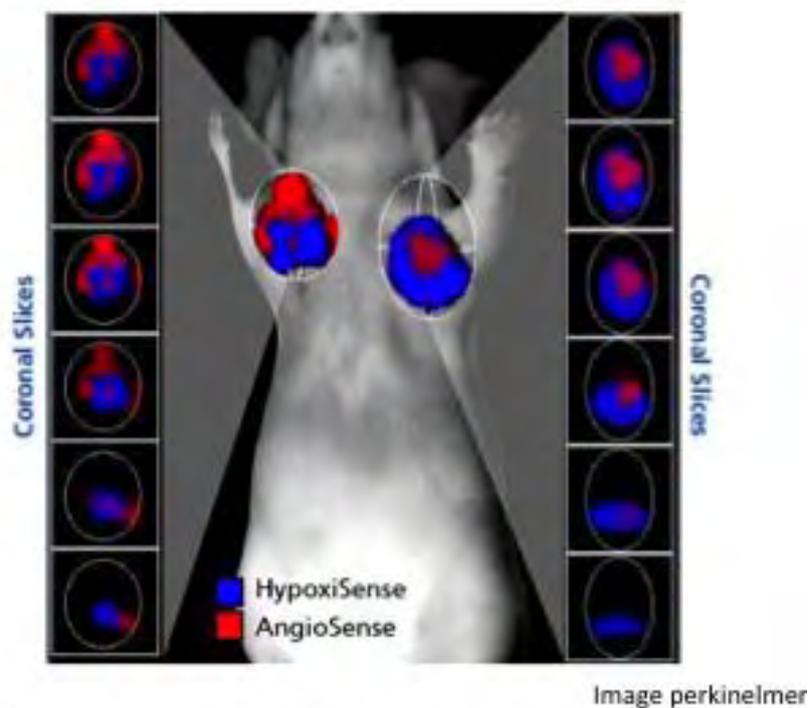
Les inconvénients : il s'agit d'une imagerie planaire.

Plus couteuse, elle est moins utilisée que la FRI pour obtenir une image en 2 dimensions mais on la retrouve dans les systèmes récents de tomographie moléculaire de fluorescence.

### **(f) Tomographie de fluorescence moléculaire (FMT)**

Elle permet de rendre quantifiable l'imagerie par fluorescence. Elle est conçue pour détecter une activation de la fluorescence dans le proche infrarouge au niveau de tissus profonds. Le système repose sur l'emploi de sondes moléculaires fluorescentes ciblées ou de sondes moléculaires hautement sensibles à fluorescence activable. De telles sondes ajoutent une spécificité moléculaire et produisent un contraste de fluorescence marqué, ce qui favorise une détection précoce et une évaluation de cibles moléculaires sur des tissus cancéreux, *in vivo*. Le nouveau système d'imagerie tomographique autorise une localisation tridimensionnelle dans des tissus profonds et une quantification des sondes moléculaires de l'ordre de la picomole. Il s'agit d'une reconstruction volumique de la lumière émise par des sondes fluorescentes dans le corps de l'animal. C'est une approche de

déconvolution (améliore la résolution et le bruit des images) qui intègre le caractère diffus de la propagation des photons dans les milieux troubles [14] (Figure 5).



**Figure 5 :** Imagerie d'hypoxie tumorale en FMT (bleu)

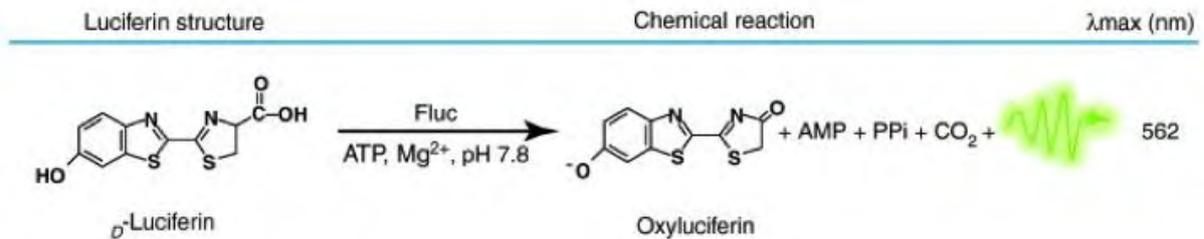
Les avantages de cette méthode d'imagerie sont la non invasivité, l'aspect tridimensionnel qui améliore la sensibilité, l'analyse des tissus profonds (2 à 3 cm) et la quantification de la sonde dans le tissu d'intérêt.

Les inconvénients sont la diminution de la résolution (de l'ordre du mm), le temps d'acquisition qui est augmenté engendrant ainsi des problèmes d'anesthésie et le maintien de la température corporelle des animaux. Il y a aussi l'hétérogénéité des tissus constituant l'animal qui sont à prendre en compte du fait d'une influence sur la propagation des photons lumineux.

## 2) La bioluminescence [15, 16]

Il s'agit de l'émission de lumière suite à des réactions enzymatiques présentes chez certains organismes vivants (bactéries, champignons, vers, mollusques, insectes). Le système bioluminescent le plus connu est présent chez les lucioles (*Photynus pyralis*). Comme il s'agit d'une réaction enzymatique, il faut un substrat (la luciférine) et une enzyme (la luciférase). La réaction de production de lumière se déroule en 2 étapes. La première réaction est l'activation de la luciférine par la luciférase en

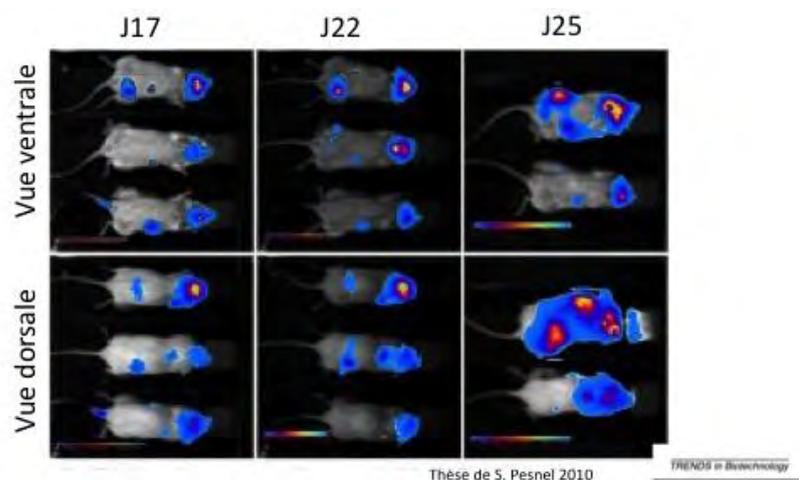
présence d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). Il y a formation d'un complexe intermédiaire, la luciféryl adénylate liée à l'enzyme. Puis dans un deuxième temps, la luciféryl adénylate formée est ensuite oxydée par l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) et donne l'oxyluciférine. Cette molécule, dans un état électronique excité, retourne à l'état stable avec émission de lumière et formation de CO<sub>2</sub> et d'AMP (Figure 6).



**Figure 6 :** Réaction de bioluminescence

Pour une application en cancérologie chez le petit animal, il faut dans un premier temps transfecter les cellules cancéreuses avec le gène luciférase (en général un plasmide). Après greffe de ces cellules transfectées, l'observation se fait grâce à la réaction avec de la luciférine, substrat qu'il faut injecter juste avant les acquisitions car il est vite métabolisé. Le signal est maximum 20 minutes après l'injection de luciférine.

En cancérologie, la bioluminescence est très utilisée par les industriels dans le développement de molécules anticancéreuses car elle permet de réaliser des études longitudinales sur un grand nombre d'animaux. En effet il est possible de suivre la réponse thérapeutique d'une population d'animaux sur une période donnée (Figure 7).



**Figure 7 :** Bioluminescence de souris greffées avec des cellules lymphomateuses transfectées avec de la luciférase

Les avantages de cette méthode sont sa sensibilité, sa facilité de mise en œuvre et son coût. De plus il est possible de passer les animaux en série et de les étudier sur

plusieurs semaines. Chaque animal est donc son propre témoin éliminant ainsi les problèmes de variabilité interindividuelle.

Aussi, l'utilisation de luciférase qui émettent un signal dans des longueurs d'onde supérieures à 600nm (rouge) sont moins atténués par les tissu environnants et permettent donc une étude plus précise et plus en profondeur (de l'ordre du cm). Pour l'étude *in vivo*, les luciférase utilisées sont Firefly luciferase (FLuc) ou click beetle red luciférase (CBR Luc)

Les inconvénients de cette méthode sont dues à la consommation de molécules endogènes dont la concentration peut être modifiée dans l'environnement de la cellule tumorale. On retrouve : l'ATP, l'O<sub>2</sub> ou la luciférine. Donc si une de ces molécules est en quantité insuffisante, l'émission lumineuse n'est pas représentative de l'activité luciférase. Ainsi, lorsque les tumeurs grossissent, très rapidement leur zone centrale devient hypoxique. Ceci n'a pas de conséquences sur leur croissance dans la mesure où elles sont capables de passer d'un métabolisme aérobie (utilisant de l'O<sub>2</sub>) à un métabolisme anaérobie. Dans ce cas, les cellules tumorales n'utilisent plus d'O<sub>2</sub> et la synthèse d'ATP est réduite diminuant ainsi l'émission de bioluminescence [17]. Il y alors une absence de corrélation entre la lumière émise et le volume tumoral.

Une autre limite à cette technique concerne la quantification. L'intensité du signal détecté est plus faible que l'intensité du signal émis à cause des interactions des photons lumineux avec les tissus traversés. Ainsi si on compare la brillance de 2 foyers tumoraux situés à des profondeurs différentes, le foyer localisé en surface sera plus brillant et plus ponctuel qu'un foyer équivalent situé en profondeur.

Avec cette technique, Il est possible de réaliser une quantification relative qui permet de suivre dans le temps l'évolution de foyers tumoraux alors qu'une quantification absolue est impossible à mettre en œuvre. Cependant, seule cette quantification permet d'accéder à une mesure réelle du phénomène biologique étudié c'est-à-dire le nombre de copies du gène luciférase ou le nombre de cellules correspondantes.

De plus, la résolution spatiale est de l'ordre du mm voire du cm.

## **B. Les techniques d'imagerie applicable chez l'homme**

Ce sont des méthodes d'abord utilisées chez l'homme qui ont été par la suite

transposées au petit animal. L'intérêt principal de disposer des mêmes techniques d'imagerie est que l'élaboration de traceurs chez le petit animal pourra être directement applicable chez l'homme. Ces méthodes peuvent se diviser en 2 catégories, celles utilisées pour réaliser des images anatomiques et celles qui fournissent des informations métaboliques. La frontière entre les 2 devient de plus en plus mince car des techniques d'imagerie hybrides associant des données morphologiques et fonctionnelles sont apparues.

## 1) Les techniques d'imagerie anatomiques

### (a) La radiographie

#### Principe

Son principe a été découvert en 1895 par Röntgen (Figure 8). Elle repose sur l'utilisation de rayonnements ionisants, les rayons X ayant une énergie supérieure à celle utilisée en fluorescence ou luminescence. Ces rayons traversent le corps humain. Leur absorption est fonction de la densité des tissus. Plus le tissu est dense plus le rayon est absorbé. Ainsi, les os très denses apparaîtront en clair, tandis que les organes aériques tels que les poumons seront visibles de manière plus sombre. L'image obtenue se fait grâce à un film photographique (actuellement des détecteurs adaptés permettent numériser cette image). Le corps à analyser est placé entre la source de rayons X et le film qui enregistre les rayons plus au moins absorbés par l'animal. Il est possible d'opacifier certaines structures creuses (appareil digestif, articulation, etc.) en injectant un produit de contraste opaque aux rayons X. La visualisation d'une masse tumorale est donc possible surtout au niveau des zones aériques comme les poumons ou lorsque il existe des lésions lytiques (métastases osseuses) (Figure 9).



**Figure 8** : Radiographie de la main de l'épouse de Röntgenen (1895)



**Figure 9** : Radiographie de la patte droite d'une souris injectée avec des cellules myélomateuses

Les avantages de cette technique chez le petit animal sont le coût et la simplicité de mise en œuvre. Elle permet une observation rapide sans limite de profondeur.

Les inconvénients rencontrés sont l'irradiation et les images en 2 dimensions (analyse par projection). En effet, le faisceau de rayons X projette sur une plaque radiographique les ombres des organes traversés en les confondant. De plus, les zones entourées par des tissus plus denses (comme les os) ne sont pas visibles. Elles ne permettent donc pas de situer précisément la tumeur. Il s'agit d'une imagerie non quantitative.

### **(b) Le scanner (CT) ou tomодensitométrie (TDM)**

#### **Principe**

Le principe est le même que la radiographie sauf que les images obtenues sont en 3 dimensions. Un tube émetteur de rayons X tourne à grande vitesse autour de l'animal et prend une succession d'images du corps à 360°. Des capteurs situés à l'opposé de la source de rayons X mesurent l'absorption des différents tissus. En effet, il effectue un plan de coupe et réalise de multiples projections sous différents angles afin de connaître le coefficient d'atténuation en chaque point du plan et de pouvoir reconstruire un volume. On peut ainsi visualiser une modification de volume ou une anomalie de structure comme c'est le cas dans les tissus tumoraux. Comme pour la radiographie, un produit de contraste à base d'iode, opaque aux rayons X, peut être nécessaire pour étudier certains organes (Figure 10)

Les avantages de cette technique sont le coût, la facilité d'utilisation et la grande sensibilité. La profondeur d'étude est sans limite et elle permet de réaliser des images en 3 dimensions rendant la quantification possible. Cette technique a une très bonne résolution de l'ordre de 50  $\mu\text{m}$ . L'acquisition se fait en quelques minutes. Tous ces avantages font du scanner la technique d'imagerie anatomique de choix dans les machines couplées.

L'inconvénient majeur est l'irradiation qu'elle engendre surtout si les mesures sont répétées comme c'est souvent le cas dans le suivi de la réponse à un traitement. Il peut aussi y avoir un faible contraste pour les tissus mous. Enfin, les images ne donnant que des informations anatomiques, il est parfois difficile de différencier une tumeur d'un tissu fibrotique.

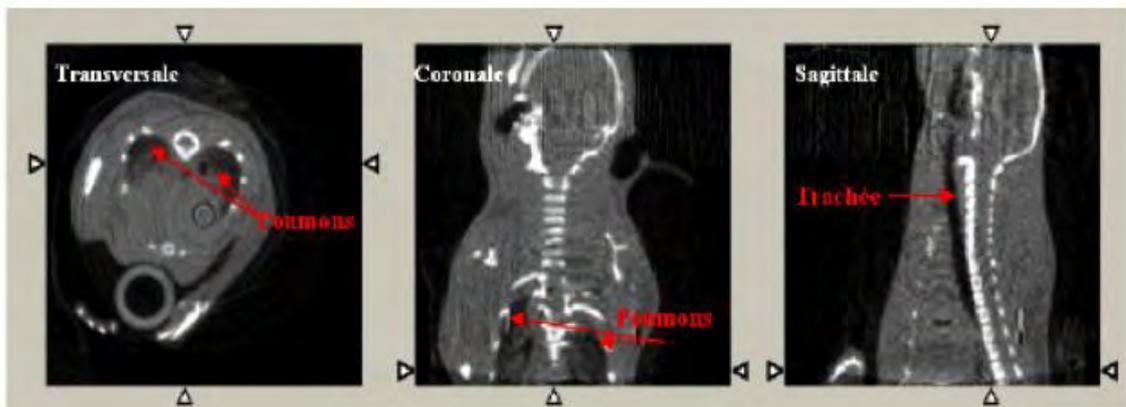


Figure 10 : Différentes coupes d'une souris en CT

Thèse de R.KHOURY 2008

### (c) Les ultrasons :

#### Principe

A la différence de la lumière qui est une onde électro-magnétique et qui, de ce fait, peut se propager dans le vide, le son est une onde mécanique qui va nécessiter un support matériel de propagation. Les ultrasons sont des vibrations mécaniques de la matière à des fréquences inaudibles pour l'oreille humaine (fréquence comprise entre 40 kHz et 100 MHz). Les ultrasons se propagent à une vitesse qui sera fonction de la nature du milieu, indépendamment de la fréquence de l'onde. Par exemple, la célérité du son dans l'air n'est que de 300 m/s alors qu'elle est de 1500 m/s dans l'eau. Ainsi, dans l'organisme humain, les ultrasons vont se propager à une vitesse proche de 1500 m/s selon la nature des organes qu'ils traversent. Cependant, les tissus présentent une certaine résistance au passage des ultrasons. Cette résistance, appelée impédance sera fonction de l'élasticité et de la densité du milieu

considéré, elle est donc différente d'un tissu à l'autre. Chaque fois qu'un son rencontre une interface, une partie de l'énergie incidente est transmise tandis que l'autre partie est réfléchi (c'est l'écho). Les directions de la transmission et de la réflexion seront fonction de l'angle d'incidence de l'onde sonore. Si l'incidence est directe (perpendiculaire à l'interface), la transmission se fait dans la même direction et le même sens que l'onde sonore, tandis que la réflexion se fait dans la même direction mais dans le sens inverse. Si l'incidence n'est pas perpendiculaire à l'interface, l'onde transmise subit une déviation, c'est la réfraction. L'onde réfléchi est également déviée d'un angle égal à celui de l'onde incidente par rapport à l'orthogonale à l'interface.

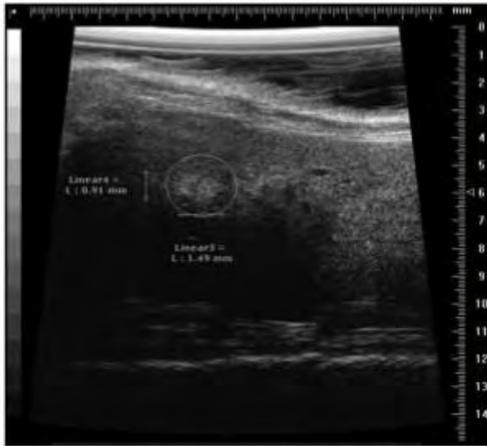
Pour réaliser une échographie, il faut placer une sonde qui émet des ultrasons sur la région à examiner après avoir appliqué sur la peau un gel qui permet de supprimer la présence d'air entre la sonde et la peau. Cette sonde est faite de plusieurs cristaux émetteurs disposés côte à côte. Quand l'un d'entre eux émet un ultrason, celui-ci pénètre donc les tissus jusqu'à ce qu'il soit arrêté par une structure et réfléchi en direction de la sonde. Plus la structure est éloignée plus il mettra du temps à revenir. L'écho qui en résulte est enregistré et donne des informations sur la position et la densité des tissus rencontrés. La vitesse de propagation de l'onde sonore étant connue, il suffit de mesurer le temps qui s'écoule entre l'émission du message et la réception de l'onde réfléchi pour connaître la position d'un organe. On peut aussi observer des différences d'impédances acoustiques reflète de la densité des tissus (Figure 11).

L'effet Doppler, utilise le principe des ultrasons pour reconstituer un mouvement et évaluer l'écoulement de la circulation du sang. En effet, lorsqu'une onde se réfléchit sur un objet en mouvement, comme un globule rouge, elle change de fréquence. L'analyse de ce changement permet de reconstituer les mouvements. Ainsi, certaines images d'échographie sont en couleur mais le langage de ces couleurs n'a aucun rapport avec la réalité : par exemple, les flux qui se rapprochent sont conventionnellement en rouge, ceux qui s'éloignent en bleu et les turbulences en vert (Figure 12).

Actuellement se développe chez le petit animal une imagerie combinant l'utilisation des ondes lumineuses et des ultrasons, l'opto-acoustique. Le principe de base consiste à envoyer des « pulse »-lasers (proches infrarouges) sur l'échantillon d'étude. Le tissu irradié absorbe localement une partie de l'énergie de ces « pulses », ce qui entraîne un réchauffement local (conversion de l'énergie des photons en

énergie cinétique). Il en résulte une génération d'ultrasons, qui se propagent dans le milieu à la vitesse du son, et peuvent être enregistrés via des capteurs de pression haute fréquence. La lenteur du son dans les tissus (~1500 m/s) par rapport à la vitesse de la lumière ( $3 \cdot 10^8$  m/s) permet d'obtenir une détection dans le temps de ces ondes de pression et de déterminer précisément la profondeur à laquelle les ondes ont été générées. En mesurant les ondes acoustiques à différentes fréquences avec un réseau de détecteurs adaptés, un spectre opto-acoustique peut être obtenu et corrélé en trois dimensions avec la surface du tissu d'étude. De plus, si l'on choisit certaines longueurs d'onde qui permettent de cibler des tissus spécifiques, cette méthode peut fournir une image extrêmement bien contrastée et d'excellente résolution des structures isolées. Il est possible d'améliorer ces images en utilisant des agents de contraste opto-acoustiques comme les nano-rods (ajout de substances dans les tissus d'études, qui s'attachent spécifiquement sur les structures d'intérêt et absorbent mieux l'énergie lumineuse des « pulses »-lasers). (Figure 13)

Les avantages de l'utilisation des ultrasons sont tout d'abord sa résolution de l'ordre de 50  $\mu\text{m}$  et sa profondeur d'étude (environ 20 mm à la résolution maximale). Il ne s'agit pas d'une méthode irradiante. De plus, c'est une méthode non invasive qui est rapide et peu coûteuse. Elle peut donc être choisie pour réaliser un suivi longitudinal des animaux dans l'évaluation de l'efficacité d'un traitement anticancéreux en mesurant sur les mêmes animaux pendant une certaine période la taille de la tumeur. Les inconvénients sont pour l'échographie un manque de spécificité et de contraste ainsi qu'une opacité de l'air et des os. Pour l'optoacoustique, il faut améliorer les dispositifs de retraitement des images.



**Figure 11:** Tumeur hyperéchogène 8 mois après injection chez le petit animal



**Figure 12:** Echodoppler du canal artériel chez un rat



**Figure 13:** Visualisation d'une tumeur chez la souris grâce à un anticorps couplé aux nanorods en optoacoustique

M. Fourelle 2012

### **(d) Imagerie par résonance magnétique (IRM)**

#### Principe

Il s'agit d'observer la résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons de l'eau contenus dans l'organisme. On étudie la réponse des noyaux soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique

Tous les noyaux portent une charge qui tourne autour de l'axe nucléaire et engendre un dipôle magnétique appelé moment magnétique. En absence de champs, les moments magnétiques ne sont pas orientés. Lorsqu'on applique un champ magnétique (CM) statique intense (CMS), les moments magnétiques des protons prennent deux orientations qui correspondent à deux états d'énergie. En présence du CMS, les moments magnétiques associés aux deux états d'énergie se mettent en mouvement et décrivent deux cônes de précession. Ce mouvement a une vitesse correspondant à une fréquence de précession  $\omega_0$ .

La résonance des protons est obtenue en appliquant un 2<sup>ème</sup> champ magnétique oscillant (CM 2, dit radiofréquence) moins intense que le premier ( $10^6$  fois plus faible). Ce second champ magnétique permet donc d'apporter une énergie permettant aux noyaux de passer de l'état fondamental à l'état excité.

Si le CM 2 appliqué est perpendiculaire au CMS alors il tourne autour de celui-ci à

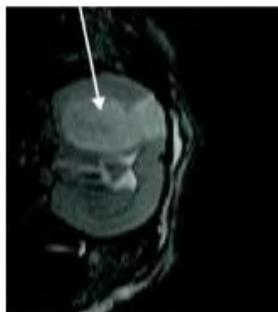
une vitesse angulaire variable  $\omega$ . Lorsque sa fréquence de rotation est égale à la fréquence de précession  $\omega_0$ , il y a résonance et passage du spin à un niveau d'énergie supérieure. On parle de relaxation quand, après absorption de l'énergie électromagnétique fournie par CM 2, les noyaux tendent à revenir à leur position d'équilibre M. La relaxation peut se décomposer en deux phénomènes, la relaxation longitudinale (T1) et la relaxation transversale (T2). Ces temps de relaxation vont varier pour un tissu donné selon l'organisation physico-chimique de l'eau qui le compose, et c'est sur ces variations que l'on s'appuie pour détecter au sein d'un tissu les modifications liées à la présence d'une lésion. Ainsi, lorsque l'on étudie un tissu, les temps de relaxation T1 et T2 dépendent de la mobilité des noyaux d'hydrogène présents : ces temps de relaxation augmentent avec l'hydratation et ils diminuent lorsque la concentration en eau diminue. Les phénomènes inflammatoires et oedémateux qui s'accompagnent généralement d'une augmentation de la quantité d'eau dans ces tissus conduira à une augmentation du T1 et du T2 alors que ce sera l'inverse pour un tissu cicatriciel ou cancéreux.

En IRM, l'intensité du signal est souvent insuffisante pour permettre d'observer une différence convenable entre les parties saines ou affectées de l'organisme. Une façon très simple d'influencer le signal en IRM est d'augmenter le contraste, soit en augmentant le temps de l'examen pour enregistrer plus d'acquisitions, soit en utilisant un agent de contraste. (Figure 14)

Il est également possible de réaliser de l'imagerie fonctionnelle. Elle est surtout réalisée pour l'imagerie cérébrale. Elle repose sur la différence de résonance entre l'hémoglobine oxygénée et non oxygénée

Les avantages de l'IRM sont une très haute résolution de l'ordre 50  $\mu\text{m}$  même pour les tissus mous. Elle permet une analyse sans limite de profondeur.

Les inconvénients sont le prix, la durée d'acquisition et la sensibilité.



**Figure 14 :** IRM de rat porteur d'un gliome

## 2) L'imagerie fonctionnelle ou métabolique : Imagerie nucléaire

Suivant le rayonnement utilisé, on va trouver 2 sortes d'imageries, la scintigraphie planaire et la TEMP qui repose sur la détection d'un rayonnement  $\gamma$  et la TEP qui repose sur l'émission d'un positon ( $\beta^+$ ).

Comme il s'agit de rayonnements ionisants provenant d'isotopes radioactifs, ces derniers doivent respecter certaines conditions pour une utilisation chez l'homme et le petit animal. Tout d'abord, l'énergie doit être adaptée à la détection par les caméras et la période (temps au bout duquel l'activité a été divisée par 2) doit être suffisamment longue pour permettre une analyse de l'organe à évaluer et suffisamment courte pour être facilement éliminée de l'organisme et limiter ainsi l'irradiation. Enfin, l'approvisionnement de ce radioisotope doit être facile (générateur  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  pour le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ). Les différents modes de désintégration de la radioactivité seront détaillés dans la 2<sup>ème</sup> partie de la thèse, ici nous ne verrons que le principe de l'imagerie.

### (a) La scintigraphie:

#### Principe :

Elle permet d'observer *in-vivo* le métabolisme d'un radio-isotope au sein d'un organe cible. Il s'agit d'une imagerie d'émission (c'est-à-dire que la source de rayonnement est l'organe étudié après injection du traceur appelé radio-pharmaceutique) par opposition à l'imagerie radiographique qui est une imagerie de transmission (le faisceau est externe et traverse le patient). On obtient ainsi une "cartographie de radioactivité" représentative de l'état de fonctionnement d'un organe.

Pour cela, on administre la plupart du temps par voie intraveineuse une molécule biologique appelée vecteur (ou traceur), dont le métabolisme est spécifique de l'organe, de la fonction ou de la pathologie à étudier. Sur cette molécule, sera greffé un radio-isotope émetteur  $\gamma$  appelé marqueur. Dans certains cas, l'organe cible est capable de métaboliser directement un atome radioactif : vecteur et marqueur sont alors confondus ( $^{123}\text{I}$  pour la thyroïde).

Le patient ou l'animal devient alors une source émettrice de rayonnements gamma qui pourront être détectés grâce à une  $\gamma$  caméra. Suivant ce que l'on recherche, on peut réaliser 2 sortes d'acquisitions : les acquisitions statiques ou dynamiques. L'acquisition statique consiste à enregistrer l'accumulation du vecteur radioactif dans l'organe d'intérêt. Le temps d'acquisition est déterminé en fonction de l'activité

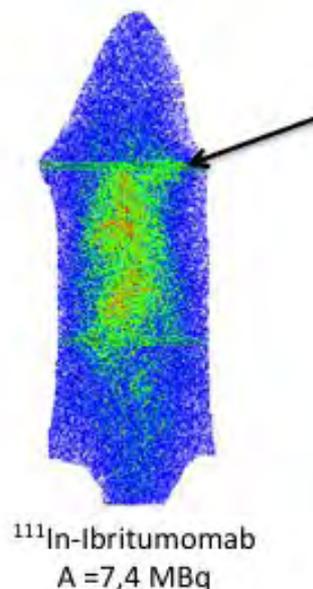
injectée et l'image obtenue est représentative de la distribution radioactive suivant une incidence précise. L'examen scintigraphique d'un organe requiert habituellement plusieurs images obtenues suivant différentes incidences. Les images statiques sont utilisées dans l'étude de distributions stables dans le temps. Il s'agit principalement des scintigraphies pulmonaires, thyroïdiennes et osseuses. La scintigraphie dynamique permet elle de réaliser une série d'images qui va pouvoir constituer une sorte de film de la fonction étudiée. Pour cela, on réalise une série d'images scintigraphiques statiques (Figure 15).

Avantages :

Il s'agit d'une méthode d'imagerie fonctionnelle très sensible. Il n'y pas de limite de profondeur. En cancérologie, il est possible d'évaluer spécifiquement la tumeur (marquage d'anticorps dirigés spécifiquement contre la tumeur) et de voir son évolution métabolique au cours du temps après la mise en place d'un traitement.

Inconvénients :

C'est une imagerie ionisante planaire qui ne permet pas une analyse quantitative. La résolution est faible (5mm). La localisation précise de la radioactivité détectée est difficile. Aujourd'hui, la scintigraphie planaire est supplantée par la TEMP.



**Figure 15 :** Visualisation d'une tumeur chez une souris en scintigraphie planaire

## **(b) La TEMP**

### Principe

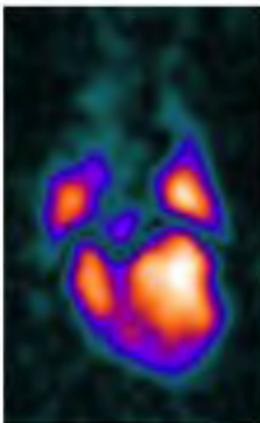
La TEMP (SPECT en anglais) repose sur la tomographie par émission. Elle utilise une ou plusieurs  $\gamma$ -caméras qui effectuent une rotation autour du patient ou de l'animal émetteur de rayonnements  $\gamma$ . Cette rotation permet de réaliser une acquisition volumique pour obtenir une image en 3 dimensions (Figure 16).

### Avantages :

Il s'agit d'une méthode d'imagerie fonctionnelle très sensible qui n'a pas de limite de profondeur. Il est possible de réaliser une quantification absolue.

### Inconvénients :

Il s'agit d'une méthode utilisant des rayonnements ionisants. La résolution est de l'ordre de 1 à 2 mm. Les données anatomiques sont insuffisantes pour préciser distinctement la localisation de la radioactivité.



**Figure 16** : Ventriculographie en SPECT chez la souris

## **(c) La TEP :**

### Principe

Les images sont obtenues après l'injection par voie intraveineuse d'un vecteur moléculaire du processus physiologique étudié. Le traceur est marqué avec un noyau radioactif, émetteur de positons ( $\beta^+$ ). Les positons animés d'une certaine énergie cinétique vont parcourir quelques millimètres dans les tissus. Lorsqu'ils atteignent un état d'équilibre thermique avec le milieu, ils s'annihilent avec un

électron en émettant deux rayons  $\gamma$  de 511 keV chacun. Ces photons sont émis dans la même direction mais en sens opposé ( $180^\circ$  d'écart).

Pour analyser la distribution du vecteur marqué, il faut détecter simultanément les deux photons de 511 keV pour remonter au phénomène d'annihilation et donc à la source.

Après correction du signal physique, notamment de l'atténuation tissulaire et du bruit de fond, la reconstruction tomographique fournit un volume représentatif de la distribution spatiale du traceur dans l'organisme.

Le vecteur moléculaire généralement utilisé en TEP est le 2-deoxy-2-, [ $^{18}\text{F}$ ]-fluoro-D-glucose, [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, marqueur du métabolisme glucidique cellulaire très utilisé en oncologie pour évaluer l'activité métabolique des cellules cancéreuses consommatrices de glucose (Figure 17).

Avantages :

Il s'agit d'une méthode d'imagerie fonctionnelle très sensible qui peut permettre de suivre l'évolution métabolique d'une tumeur chez le petit animal au cours d'un traitement. Lors de l'analyse, il n'y a pas de limite de profondeur et on peut établir une quantification absolue de la radioactivité concentrée dans un tissu.

Inconvénients :

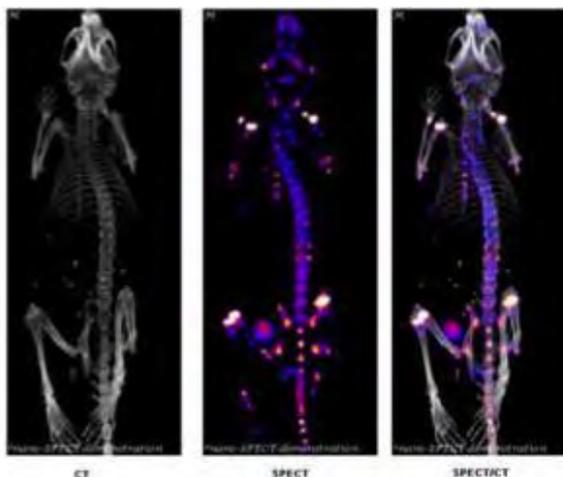
Il s'agit de rayonnement ionisant de haute énergie. La résolution est de l'ordre de 1 à 2 mm. Les données anatomiques sont insuffisantes pour préciser distinctement où est détectée la radioactivité.



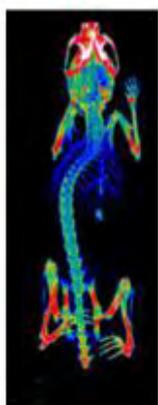
**Figure 17:** TEP au [ $^{18}\text{F}$ ]FDG chez une souris porteuse d'un lymphome

### **C. Méthodes d'imagerie couplées**

Beaucoup de ces techniques sont complémentaires. Ainsi, pour minimiser les inconvénients et surtout optimiser les méthodes d'imagerie, les constructeurs proposent maintenant des techniques d'imagerie couplées qui associent une méthode d'imagerie anatomique avec une méthode d'imagerie fonctionnelle améliorant ainsi la résolution et la sensibilité des techniques prises isolément. On retrouve ainsi la SPECT/CT (Figure 18), la TEP/CT (Figure 19) et l'IRM/TEP qui est une technique naissante.



**Figure 18 :** Métastases osseuse en SPECT/CT chez la souris



**Figure 19 :** Souris en  $\mu$ PET/CT

### **D. Comparaison des méthodes d'imagerie**

Comme nous venons de le voir, le panel d'imagerie disponible en oncologie ne cesse d'augmenter avec les avancées de la technologie. Toutes ces méthodes possèdent leurs avantages comme leurs inconvénients mais selon ce que l'on recherche, chacune pourra avoir un intérêt (Tableau 1).

L'imagerie moléculaire regroupant la SPECT/CT, le PET/CT, l'IRM et l'imagerie optique permet de visualiser des gènes, des protéines spécifiques ou des signaux. En oncologie, cela sert par exemple à étudier les interactions moléculaires existant

entre les cellules cancéreuses et leur environnement pour mieux comprendre le développement des métastases. Dans ce cas, la résolution spatiale est moins cruciale. A une échelle plus macroscopique, l'imagerie fonctionnelle incluant la scintigraphie planaire, la SPECT/CT et la TEP/CT principalement ainsi que l'IRM et l'échographie, permet elle de visualiser des processus physiologiques pour analyser le comportement d'une tumeur et de son environnement. Là aussi, la résolution spatiale est moins cruciale.

Par contre, en imagerie morphologique où l'on trouve la radiographie conventionnelle, l'IRM, le scanner et l'échographie, une haute résolution spatiale est demandée pour pouvoir suivre l'évolution dans le temps de la taille et de l'extension d'une tumeur.

Ainsi, les méthodes les plus sensibles, recherchées essentiellement pour faire de l'analyse fonctionnelle sont les techniques d'imagerie nucléaire (PET et SPECT), l'optoacoustique et l'imagerie optique. Mais ces méthodes peuvent soulever des difficultés dans l'analyse du fait d'un manque de résolution pour certaines ou d'une impossibilité d'étude en profondeur pour d'autres.

Les méthodes les plus résolutive sont recherchées essentiellement pour obtenir des données anatomiques. On retrouve l'IRM, l'échographie et l'imagerie de transmission X (radiographie et scanner). Par contre ces méthodes sont souvent dotées d'une sensibilité relative (Tableau 2).

L'émergence des techniques d'imagerie combinées associant des techniques morphologiques et fonctionnelles permettent donc d'obtenir des informations de qualité en terme de sensibilité et de résolution rendant la quantification absolue optimale.

## PROS AND CONS OF IMAGING MODALITIES

Technique	Labels	Signal measured	Strengths	Weaknesses	Cost	Throughput	Sensitivity (moles of label detected)	Resolution
PET	Radiolabelled molecules	Positrons from radionuclides	Highly sensitive	Can detect only one radionuclide, requires radioactivity	High	Low	$10^{-15}$	1-2 mm
SPECT	Radiolabelled molecules	$\gamma$ -rays	Can distinguish between radionuclides, so more processes can be imaged at once	Requires radioactivity	High	Low	$10^{-14}$	1-2 mm
CT	None	X-rays	Fast, cross-sectional images	Poor resolution of soft tissues	High	Low	$10^{-6}$	50 $\mu$ m
MRI	Can use isotope-labelled molecular tracers	Alterations in magnetic fields	Harmless, high-resolution of soft tissues	Cannot follow many labels	High	Low	$10^{-9}$ - $10^{-7}$	50 $\mu$ m
Optical	Genetically engineered proteins and bioluminescent and fluorescently labelled probes	Light, particularly in the infrared	Easy, non-damaging technique readily adapted to study specific molecular events	Poor depth penetration	Low	High	$10^{-12}$	1-2 mm
Photoacoustic	Probes that absorb light and create sound signals	Sound	Better depth resolution than light	Information processing and machines still being optimized	Low	High	$10^{-12}$	50 $\mu$ m
Ultrasound	Microbubbles, which can be combined with targeted contrast agents	Sound	Quick, harmless	Poor image contrast, works poorly in air-containing organs	Low	High	$10^{-6}$	50 $\mu$ m

M. Baker 2010

**Tableau 1:** Comparaison des différentes techniques d'imagerie présentes chez le petit animal

Technique	Resolution	Depth	Time	Quantitation	Multi channel imaging	Imaging agents	Target	Cost	Primary small animal use	Clinical use
MR imaging	10–100 $\mu$ m	No limit	Min–hours	Absolute	No <sup>1</sup>	Paramagnetic chelates, magnetic particles	A, P, M	\$\$\$	Versatile imaging modality with high soft tissue contrast	Yes
CT imaging	50 $\mu$ m	No limit	Min	Absolute	No	Iodine	A, P, M <sup>2</sup>	\$\$	Primarily for vascular, lung, and bone imaging	Yes
Ultrasound imaging	50 $\mu$ m	Cm	Sec–min	Absolute	No	Microbubbles	A, P, M <sup>2</sup>	\$	Vascular and interventional imaging	Yes
PET imaging	1–2 mm	No limit	Min–hours	Absolute	No	F-18, Cu-64, C-11 and Ga-68 labeled compounds	P, M	\$\$\$	Versatile imaging modality with many different tracers	Yes
SPECT imaging	1–2 mm	No limit	Min–hours	Absolute	Two	Tc-99m, In-111, I-131-labeled compounds, Ga-67, Tl-201	P, M	\$\$	Commonly used to image labeled antibodies, peptides, or perfusion, etc.	Yes
Fluorescence reflectance imaging (FRI)	1 mm	<1 cm	Sec–min	Relative	Multiple	Photoproteins, fluorochromes	P, M	\$	Rapid screening of molecular events in surface-based disease	Yes
Fluorescence mediated tomography (FMT)	1 mm	2–3 cm	Mins	Absolute	Multiple	Near infrared, fluorochromes	P, M	\$\$	Quantitative imaging of targeted or "smart" fluorochrome reporters	In development
Bioluminescence imaging	Several mm–cm	cm	Sec–min	Relative	Multiple	Luciferins, coelenterazines, luminol	M	\$\$	Gene expression, cell and bacterial tracking, protein processing, and MPO activity	Potentially in development
Intravital microscopy (e.g., confocal, multiphoton)	1 $\mu$ m	<400–800 $\mu$ m	Sec–hours	Relative	Multiple	Photoproteins, fluorochromes	A, P, M	\$\$\$	All of the above at higher resolutions but at limited depths and coverage	In development (endoscopy, skin)

<sup>1</sup>The Resolution and Cost columns refer to high-resolution, small animal imaging systems and are different for clinical imaging systems. <sup>2</sup>Quantitation: "absolute" and "relative" refer to techniques that generate signals that are depth independent and dependent, respectively. "Relative" quantitation techniques typically require extensive controls; however, some of them (e.g., multiphoton microscopy, MPM) can be used to derive truly quantitative parameters (e.g., cell velocity, interaction time). <sup>3</sup>Target: area(s) that a given imaging modality interrogates (A) anatomic, (P) physiologic, (M) molecular. <sup>4</sup>Cost of system: (\$) <100 K, (\$\$) 100–300 K, (\$\$\$) >300 K.

J. Condeelis, 2010

**Tableau 2:** Présentation des différentes techniques d'imagerie utilisées en oncologie chez le petit animal

En conclusion de cette première partie, nous avons évoqué la plupart des techniques d'imageries disponibles chez le petit animal. Nous avons pu voir les avantages et les inconvénients de chacune en terme de résolution et de sensibilité et l'intérêt de l'imagerie hybride associant 2 techniques d'imagerie.

L'imagerie petit animal est aujourd'hui un outil indispensable dans le domaine pharmaceutique. En effet, au cours du développement de nouveaux médicaments à visée thérapeutique, l'imagerie permet d'apporter des informations précieuses sur les cibles pharmacologiques, la pharmacocinétique de la molécule et la compréhension des effets indésirables éventuels. Sur le plan diagnostique la conception d'un traceur d'intérêt, dans une technique d'imagerie précise, débutera d'abord chez le petit animal et sera par la suite éventuellement transposable chez l'homme (Tableau 3).

	<b>TEP préclinique</b>	<b>TEMP préclinique</b>	<b>TEP clinique</b>	<b>TEMP clinique</b>
<b>Sensibilité</b>	~ 2% - 4%	~0,3%	1% - 3%	0,01% - 0,03%
<b>Résolution</b>	~1,5 mm	~1,2 mm	~5 mm	~10 mm
<b>Champs d'observation</b>	~7 cm	~8 cm	~50 cm	~50 cm

**Tableau 3** : Comparaison clinique et préclinique de l'imagerie TEP et TEMP

Thèse H.Carpenet 2012

Ce travail va donc s'intéresser aux différentes applications précliniques de l'imagerie métabolique et fonctionnelle dans le domaine de l'oncologie et plus particulièrement de l'hématologie. En effet, le gain en sensibilité et en spécificité apporté par ces techniques permet une évaluation individualisée du comportement tumoral et une prise en charge de plus en plus adaptée des patients.

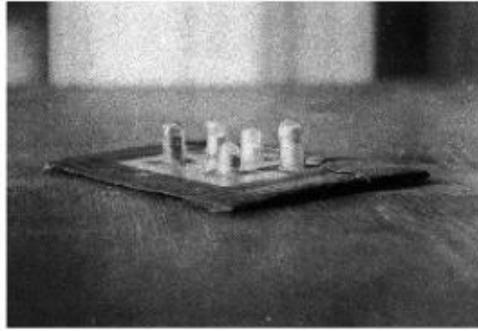
## **Chapitre 2 :**

### **TECHNETIUM 99 METASTABLE**

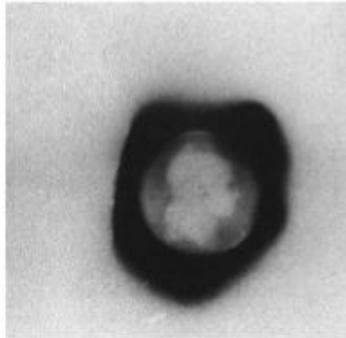
## INTRODUCTION

Dans cette partie, c'est le domaine de l'imagerie fonctionnelle et plus particulièrement de la médecine nucléaire reposant sur les rayonnements  $\gamma$  qui va nous intéresser. Comme beaucoup de découvertes, celle de la radioactivité par Henry Becquerel en 1896 fut le fruit du hasard et d'une météo nuageuse. En effet, suite à la découverte des rayons X par Röntgen en 1895, Henry Becquerel est curieux de savoir s'il existe un lien entre les rayons X et la fluorescence. Ce dernier phénomène est une émission lumineuse produite par certains corps après avoir eux-mêmes été éclairés. Pour son expérience, il utilise un médaillon placé entre des sels d'uranium et une plaque photographique enveloppée dans du carton noir. Il expose le tout au soleil pendant une journée et développe les images (Figure 20 et 21). Il obtient alors des images similaires à celles de Röntgen. Pensant avoir découvert que les sels d'uranium émettent des rayons X pendant leur fluorescence, il réalise la même expérience avec une croix de malte mais la météo nuageuse vient contrarier ses expériences. Il met alors l'ensemble dans l'obscurité et par acquis de conscience développe le tout quelques jours plus tard pensant trouver un cliché vierge. A sa grande stupéfaction, il obtient l'image photographique de la croix de Malte (Figure 22). Il venait de découvrir un nouveau type de rayonnement dont la production est indépendante des phénomènes de fluorescence et phosphorescence, c'est la radioactivité.

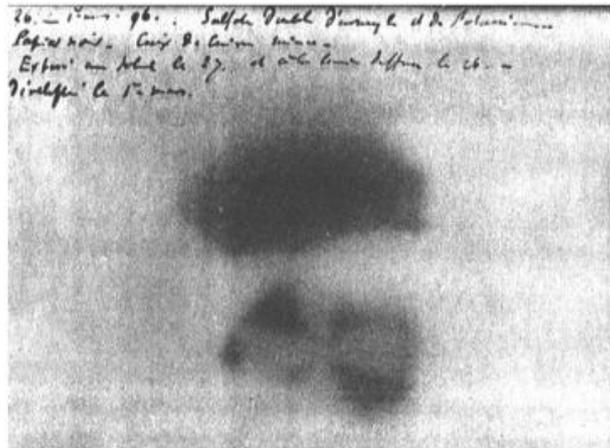
En 1903, le prix Nobel de physique est décerné conjointement à Henry Becquerel pour la découverte de la radioactivité et à Pierre et Marie Curie, pour leurs travaux sur les phénomènes de radiations.



**Figure 20 :** Premier dispositif de H. Becquerel



**Figure 21 :** Première image obtenue par H. Becquerel après exposition solaire



**Figure 22:** Image développée par H. Becquerel après être restée dans l'obscurité

Depuis ce jour les phénomènes liés à la radioactivité touchent de nombreux domaines tels que l'industrie, l'énergie ou la médecine qui va particulièrement nous intéresser dans ce travail.

Le premier centre de médecine nucléaire fut créé en 1969. Cette spécialité regroupe toutes les utilisations de radioéléments en sources non scellées à des fins de diagnostic ou de thérapie. Elle utilise des radiopharmaceutiques qui sont définis comme « tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radionucléides, incorporés à des fins médicales »[18] diagnostiques ou thérapeutiques. Ces radionucléides peuvent être utilisés soit sous une forme chimique très simple, soit liés à des vecteurs spécifiques

d'un organe, d'une fonction physiologique ou d'une pathologie. La médecine nucléaire est la constituante principale de l'imagerie dite moléculaire.

## **I. Les bases physiques de la radioactivité :**

La radioactivité est un phénomène physique intéressant le noyau de l'atome.

Des noyaux atomiques instables, dits radioisotopes, se transforment par désintégration en noyaux atomiques plus stables ayant perdu une partie de leur masse. Cette perte de masse s'accompagne d'un dégagement d'énergie sous forme d'un rayonnement particulaire et / ou électromagnétique  $\gamma$ . Le type de transformation dépend de la composition en nucléons du noyau. En effet, les noyaux instables se distribuent autour de la vallée de stabilité définie en fonction du nombre de protons et de neutrons constituant les noyaux. Un noyau présentant un excédent de neutrons par rapport à ceux présents dans la vallée de stabilité subira une transformation de type  $\beta^-$ . Au contraire, un excédent de protons se traduit par une transformation de types  $\beta^+$  ou par capture électronique (CE). Au-delà de  $Z=82$  et  $N=126$ , c'est à dire du Plomb-208 stable, tous les noyaux sont instables et on peut observer des désintégrations  $\alpha$ . Pour des noyaux très lourds, il peut se produire des fissions spontanées.

Lorsqu'une particule a été émise par le noyau, il peut se trouver dans un état excité, le retour à la stabilité se fera par l'émission d'un rayonnement électromagnétique  $\gamma$  ou le phénomène de conversion interne. Après la transformation l'atome fils peut se trouver dans un état excité, le retour à la stabilité se fera par l'émission de rayonnements électromagnétiques X ou l'émission d'électrons Auger

Suivant l'application que l'on veut faire d'un radionucléide, plusieurs paramètres sont à prendre en compte tels que le type de rayonnement émis, le transfert d'énergie linéique (TEL), la période, l'énergie du rayonnement et le mode de production.

### **A. Transfert d'Énergie Linéique (TEL)**

Il traduit la dangerosité d'un rayonnement. En effet, il correspond à l'énergie moyenne fournie par le rayonnement au milieu qu'il traverse par unité de longueur. Le nombre d'ionisations et donc de dommages créées aux structures biologiques (dont l'ADN) sera supérieur pour la particule ayant un faible parcours (et donc un TEL élevé). C'est ainsi que les particules ayant un faible parcours dans la matière auront une utilisation plutôt thérapeutique alors les rayonnements possédant un long parcours dans la matière auront une utilisation essentiellement diagnostic.

## **B. Les différents types de rayonnements**

### **1) Les rayonnements utilisés en thérapeutique**

La transformation radioactive d'un noyau X qualifié de père fournit un noyau X' qualifié de fils, avec émission d'un rayonnement particulaire et/ou électromagnétique.

Il est facile de comprendre que pour une utilisation thérapeutique, l'isotope doit créer un grand nombre d'ionisations sur une localisation précise tout en essayant de préserver les tissus sains autour. Au contraire, pour une utilisation diagnostique, le rayonnement doit avoir un parcours dans l'organisme important pour pouvoir sortir et être détecté par les gamma caméras et engendrer le moins d'irradiation possible au sein de l'organisme.

#### **(a) La transformation $\beta^-$**

Elle est due à un excès de neutrons dans le noyau.

Il y a transformation d'un neutron en un proton. Ceci se traduit par l'émission d'une particule  $\beta^-$  et d'un antineutrino.

L'Yttrium 90 est un radioélément émetteur  $\beta^-$  (Période = 2,7 jours ;  $E_{\beta_{\max}} = 2,28$  MeV). Il est utilisé en thérapeutique dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens CD20<sup>+</sup> car il est couplé à l'ibritumomab, anticorps monoclonal murin anti CD 20.

#### **(1er) Caractéristiques de l'émission $\beta^-$**

L'émission  $\beta^-$  est utilisée pour la thérapeutique car le TEL est élevé et le parcours dans la matière est faible. Il représente la profondeur maximale que peut atteindre la particule une fois émise. Il peut varier suivant l'énergie du  $\beta^-$ .

Ainsi, pour l'Yttrium-90 émetteur  $\beta^-$  pur, le TEL est de 0,22 keV/ $\mu\text{m}$  et le parcours moyen dans l'organisme est de 0,76 cm, le parcours maximal calculé est de 2,67cm.

#### **(b) La transformation $\alpha$**

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

Pour le radium 223 (Période = 11,4 jours), l'énergie de l'ensemble des  $\alpha$  émis est comprise entre 5 et 5,9 MeV). Il vient d'avoir l'Autorisation de mise sur le marché aux Etats Unis dans le traitement des métastases osseuses des cancers de la prostate réfractaires à l'hormonothérapie.

### **(1er) Caractéristiques de l'émission $\alpha$**

Les émissions  $\alpha$  se caractérisent par une grande quantité d'énergie disponible (5 à 28MeV) qui se délivre sur une courte distance (quelques micromètres). Ces rayonnements sont donc très ionisants car toute leur énergie est délivrée en un endroit très localisé. Leur utilisation est donc thérapeutique. Leur TEL est très élevé variant de 60 à 280 keV/ $\mu\text{m}$ .

Ainsi, pour le Radium 223, émetteur  $\alpha$  pur, le TEL est de 80 keV/ $\mu\text{m}$  et le parcours dans l'organisme est inférieur à 100  $\mu\text{m}$  irradiant peu la moelle osseuse.

## **2) Les rayonnements utilisés en imagerie diagnostique**

### **(a) La transformation $\beta^+$**

Elle est due en général à un excès de protons dans le noyau.

Il y a transformation d'un proton en un neutron. Ceci se traduit par l'émission d'une particule  $\beta^+$  et d'un neutrino.

Le Fluor-18 (Période = 110 min ;  $E_{\beta_{\text{max}}} = 0,634$  MeV) est utilisé couramment en imagerie diagnostique TEP (tomographie par émission de positons). Le médicament radiopharmaceutique (MRP) le plus utilisé est un analogue du glucose sur lequel est fixé le Fluor-18 (le 2-deoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-D-glucose = FDG). Il permet de visualiser la consommation cellulaire en glucose généralement augmentée au niveau des cellules cancéreuses.

### **(1er) Caractéristiques de l'émission $\beta^+$**

La particule  $\beta^+$  est émise avec une certaine énergie cinétique qui s'épuisera par interactions électrostatiques avec le milieu environnant. Après un certain nombre d'interactions, elle rencontre obligatoirement un électron négatif du milieu et cette interaction matière - antimatière entraîne l'annihilation, c'est à dire la disparition des deux électrons, et l'apparition de deux photons  $\gamma$  de 0,511 MeV, de même direction mais de sens opposés. La détection simultanée de cette paire de photons  $\gamma$  est la

base de l'imagerie de tomographie par émission de positons (TEP). Le parcours dans la matière de ces photons énergétique est de l'ordre du mètre donnant un TEL plus faible que pour les rayonnements particuliers utilisés en thérapeutique.

### **(b) La désexcitation $\gamma$**

La majorité des noyaux fils issus de transformations radioactives, par émissions  $\alpha$ ,  $\beta^-$ ,  $\beta^+$ , capture électronique, ou fission, se trouve dans un état dit excité, c'est à dire possédant un excès d'énergie qui tôt ou tard sera transféré au milieu. La forme excitée d'un noyau est signalé par \* dans les notations quand la désexcitation se produit rapidement. Parfois, le noyau reste à l'état excité pendant un certain temps, il est alors appelé noyau métastable (signalé par la lettre m). Le technétium 99 métastable est le radioélément le plus utilisé en imagerie médicale nucléaire diagnostique.

### **(1er) Caractéristiques de l'émission $\gamma$**

A l'inverse des autres types de transformations décrites plus haut, le rayonnement  $\gamma$  est un rayonnement électromagnétique appelé photon qui ne possède pas de masse ni de charge. L'interaction avec la matière n'est donc pas obligatoire en comparaison aux particules chargées. Ces photons possèdent un fort pouvoir pénétrant mais un TEL faible. Ils peuvent être détectés par des caméras après avoir traversé la matière sans interagir. C'est le principe de l'imagerie diagnostique de tomographie par émission monophotonique (TEMP).

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

## **C. La période de l'isotope radioactif**

La période d'un isotope (le temps au bout duquel l'activité du radionucléide a diminué de moitié) doit être en relation avec l'utilisation que l'on veut en faire. Ainsi, la période du radioélément doit être à la fois suffisamment longue pour permettre de préparer le MRP, lui laisser le temps d'atteindre sa cible et enregistrer les résultats mais elle doit aussi être suffisamment courte afin de limiter l'irradiation de l'organisme. Le  $^{99m}\text{Tc}$  possédant une période physique de 6h, il remplit ces conditions.

## **D. L'énergie du rayonnement :**

L'énergie du rayonnement doit être adaptée aux détecteurs. Ainsi, pour réaliser des

scintigraphies en SPECT ou TEMP, l'énergie de détection optimale liée à la sensibilité maximale des cristaux de détection des gammas caméras se situe aux alentours de 140 keV, correspondant à l'énergie d'émission du  $^{99m}\text{Tc}$  métastable.

### **E. Le mode de production**

La sélection d'un radionucléide résulte d'un compromis entre ses caractéristiques nucléaires mais aussi sa disponibilité et son prix de revient. Les isotopes couramment utilisés en médecine nucléaire sont produits à partir de cyclotrons, de réacteurs nucléaires, ou de générateurs ( $^{99m}\text{Tc}$ ). L'utilisation de générateurs permet de produire un isotope à moindre coût sur le site même de son utilisation pendant une période assez longue (1 semaine pour le générateur  $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$ ).

## **II. Caractéristiques du Technétium 99 métastable [19-21]**

Le technétium 99 métastable est devenu le radionucléide le plus utilisé pour la médecine nucléaire diagnostique car il possède les propriétés de l'isotope idéal à savoir l'émission d'un rayonnement  $\gamma$  de 140 keV qui est optimal pour l'imagerie avec les gamma caméras actuelles, une période de 6,023 heures suffisamment longue pour la préparation pharmaceutique et l'accumulation *in vivo* dans le tissu cible mais assez courte pour réduire au minimum la dose de rayonnement au patient et enfin sa facilité d'approvisionnement grâce à l'utilisation du générateur  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ . La faible émission du rayonnement particulaire associé (électrons de conversion) permet l'injection d'activités importantes (plus de 1100 MBq) compatible avec une faible dosimétrie au patient

Cependant, un des inconvénients dans l'utilisation du technétium est sa chimie. Elle repose sur une chimie de coordination. En effet, le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ne peut ni se substituer à un atome d'hydrogène d'une biomolécule ni remplacer d'autres constituants des biomolécules, tels que le carbone, l'azote ou l'oxygène.

### **A. Présentation du radioélément**

#### **1) Classification et propriétés physico chimique :**

Découvert en 1937 par Emilio Segré et Carlo Perrier, le technétium est l'élément 43 du tableau périodique. Il est placé dans la deuxième série des métaux de transition, dans le groupe VIIB. Il possède sept électrons « s » et « d » sur la couche de valence {[Kr] 4d5 5s2}. Le degré d'oxydation peut varier de -I à VII. Les degrés d'oxydation I, II, (III), V, VI ne sont stabilisés que par la présence de ligands autres que H<sub>2</sub>O (Figure 23).

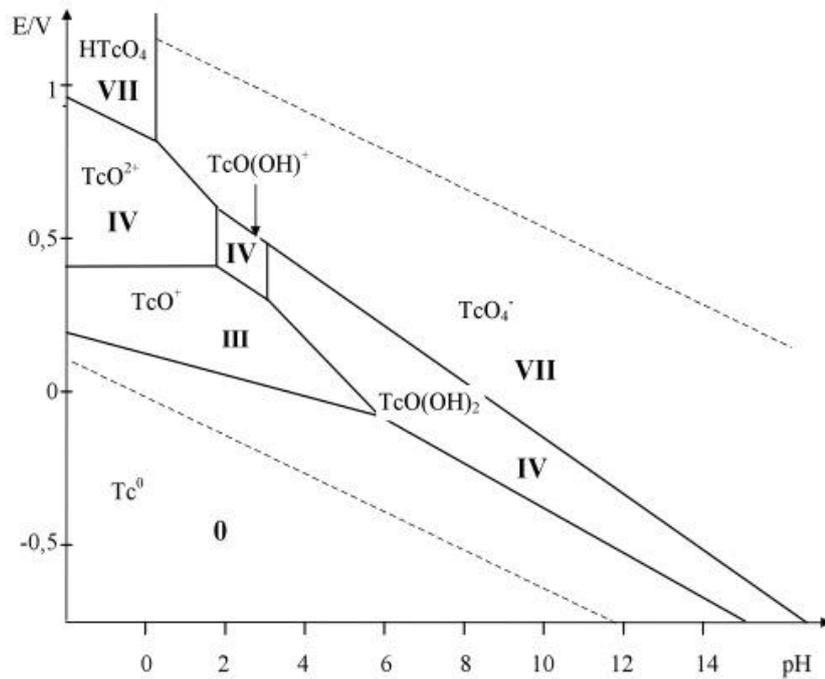
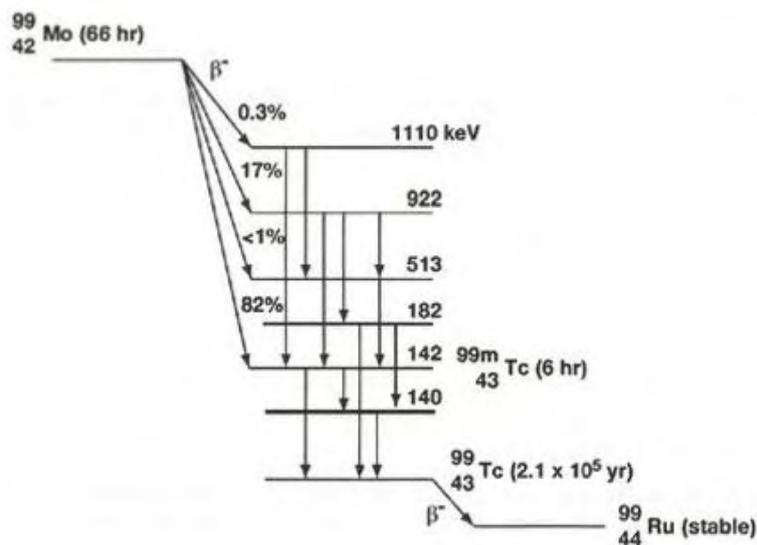


Diagramme de Pourbaix

**Figure 23 :** Diagramme potentiel/pH du technétium dans l'eau à 25°C

## 2) Obtention de <sup>99m</sup>Tc

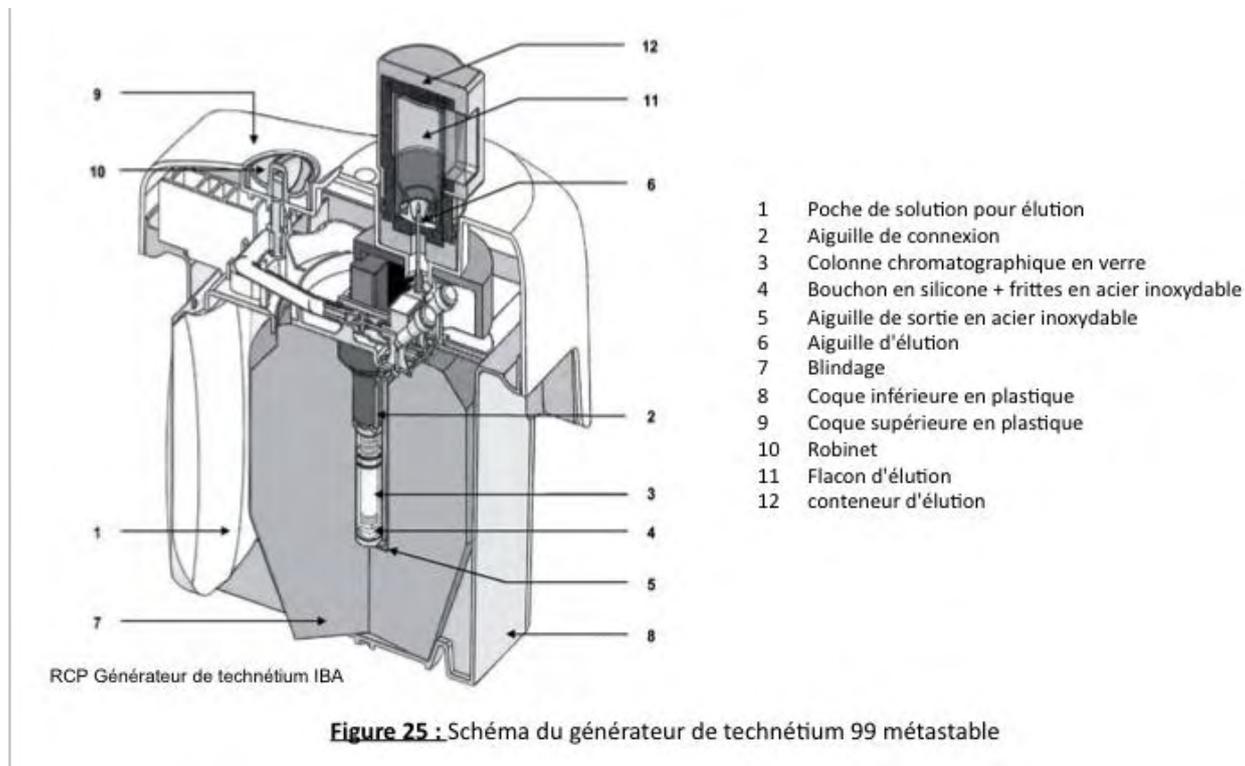
Le <sup>99m</sup>Tc est produit par un générateur de molybdène (<sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc). Il permet d'obtenir du technétium sous forme de pertechnétate de sodium Na <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>. Il est issu de la transformation radioactive du <sup>99</sup>Mo (Figure 24)



**Figure 24 :** Schéma de désintégration du <sup>99</sup>Mo

En pratique, un générateur <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc est constitué par une colonne d'alumine sur laquelle est adsorbé très fortement le molybdate polymérisé [<sup>99</sup>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>]<sup>6-</sup>. Après

transformation  $\beta^-$ , le technétium 99 formé peut être stable et métastable. Il se trouve sous forme de pertechnétate ( $TcO_4^-$ ) qui est facilement élué de la colonne par une solution aqueuse stérile de chlorure de sodium (0.9%) alors que les polymères de l'ion molybdate restent retenus. Ce système stérile est protégé par du plomb pour assurer une radioprotection du personnel [22] (Figure 25).



### **III. La chimie du technétium**

#### **A. Définitions**

Pour bien comprendre la chimie du technétium, il est important de définir certains termes.

##### **1) Degré d'oxydation :**

En solution aqueuse, le degré d'oxydation du technétium peut varier de -I à VII. Les ligands durs (petits, peu polarisables, petite charge négative), stabilisent les formes acides dures du métal qui correspondent aux degrés d'oxydation élevés. A l'inverse, les ligands mous (grands et polarisables) complexent préférentiellement les degrés d'oxydation inférieurs.

##### **2) Complexe :**

Un complexe est une espèce chimique formée par l'association d'un atome ou d'un ion central métallique avec un ou plusieurs ligands. Il possède des propriétés bien définies souvent très différentes de chacune des entités qui le constituent.

Les ligands peuvent être des atomes, des ions ou des molécules. Ils sont directement liés au centre métallique et sont donc situés dans la sphère de coordination du métal. Ce complexe peut également être considéré comme la combinaison d'un acide (centre métallique) qui constitue l'atome accepteur et d'une ou plusieurs bases (ligands) qui sont les atomes donneurs.

##### **3) Nombre de coordination :**

Le nombre de coordination d'un atome correspond au nombre d'atomes directement reliés à lui (soit par des liaisons simples, soit par des liaisons multiples).

Denticité : est le nombre d'atomes contenu dans un ligand pouvant se lier à un atome central, en général un métal, dans un complexe. Lorsqu'un seul atome du ligand peut se lier à l'atome central, on parle de ligand « monodentate ». Si à l'inverse le ligand peut se lier à l'atome central via plusieurs atomes, on parle de ligand polydentate ou multidentate.

##### **4) Chélate :**

Il se distingue du simple complexe par le fait que le cation métallique est fixé au

chélateur par au moins deux liaisons (coordinats bidentates) de coordination définissant un cycle avec le métal, à la manière d'une pince. Les cycles chélates les plus stables sont les cycles chélates à 5 et à 6 chaînons. Grâce à cet effet, les chélates sont des complexes plus stables que les complexes de ligands monodentes comportant les mêmes fonctions chimiques.

## **B. Prérequis à la formation des complexes technétiés**

Après élution du générateur, le technétium 99 métastable obtenu est sous forme de pertechnétate de sodium à une concentration inférieure à  $10^{-9}$ M. Son degré d'oxydation est de +VII. C'est la seule forme chimique disponible qui ne peut pas se complexer seule. Injecté à l'homme, il se distribue dans la thyroïde, les glandes salivaires et l'estomac. Toute la chimie du technétium va s'articuler autour du  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (+VII) dont le but sera de diminuer le degré d'oxydation pour pouvoir créer des complexes stables.

### **1) Théorie des acides et des bases de Pearson**

La réaction de complexation se fait entre le métal (technétium), acide accepteur d'électron et ses ligands, bases donneuses d'électrons. Deux paramètres vont conditionner la stabilité du complexe : la nature de l'atome donneur défini comme la dureté et le nombre d'atomes donneurs défini comme la denticité.

#### **(a) Nature du ligand**

##### **(1er) Les bases dures :**

Les bases dures (de petites tailles, très électronégatives, faiblement polarisables) se lient préférentiellement avec les métaux acides durs (petites tailles, peu électronégatifs, faiblement polarisables). La liaison est de type ionique

##### **(2e) Les bases molles :**

A l'inverse des bases dures, les bases molles qui possèdent un atome donneur peu électronégatif et fortement polarisable vont se lier préférentiellement à un centre métallique mou. La liaison est de type covalente.

La liaison dans le complexe qu'elle soit ionique ou covalente, fait intervenir les orbitales d.

### Exemple de bases et d'acides durs et de bases et d'acides mous :

<b>Base dure</b>	<b>Formule</b>	<b>Base molle</b>	<b>formule</b>
alcools	ROH	Anion organique	R <sup>-</sup>
amine, ammoniacque	RNH <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub>	Cyanure	RCN, CN <sup>-</sup> ,
ion carbonate	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Hydrure	H <sup>-</sup>
ion chlorure	Cl <sup>-</sup>	Iodure	I <sup>-</sup>
eau	H <sub>2</sub> O	Phosphine, phosphate	R <sub>3</sub> P, (RO) <sub>3</sub> P
ion fluorure	F <sup>-</sup>	thiol, thioéther	RSH, RS <sup>-</sup> , R <sub>2</sub> S
ion hydroxyde	OH <sup>-</sup>		
ion nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		

<b>Acide dur</b>	<b>Formule</b>	<b>Acide mou</b>	<b>Formule</b>
Aluminium (III)	Al <sup>3+</sup>	Cadmium	Cd <sup>2+</sup>
Béryllium	Be <sup>2+</sup>	Césium	Cs <sup>+</sup>
Calcium	Ca <sup>2+</sup>	Argent	Ag <sup>+</sup>
Chrome (III)	Cr <sup>3+</sup>	Cuivre (I)	Cu <sup>+</sup>
Chrome (VI)	Cr <sup>6+</sup>	Palladium	Pd <sup>2+</sup>
Cobalt (III)	Co <sup>3+</sup>	Platine	Pt <sup>2+</sup>
Étain (II)	Sn <sup>2+</sup>	Mercure	Hg <sup>+</sup>
Fer (III)	Fe <sup>3+</sup>	Or	Au <sup>+</sup>
Lithium	Li <sup>+</sup>		
Magnésium	Mg <sup>2+</sup>		
Manganèse (II)	Mn <sup>2+</sup>		
Plomb (II)	Pb <sup>2+</sup>		
Potassium	K <sup>+</sup>		
Proton	H <sup>+</sup>		
Silice	Si <sup>4+</sup>		
Sodium	Na <sup>+</sup>		
Titane	Ti <sup>4+</sup>		

Pour le technétium 99 métastable, les atomes donneurs les plus souvent utilisés sont le N, S, P, O, Cl ou Br et un deuxième choix va ensuite dépendre du degré d'oxydation du métal qui conditionne sa dureté.

## **2) Effet stérique :**

La stabilité du complexe métallique est augmentée avec la basicité des groupes

donneurs. Elle augmente quand le degré de substitution sur l'atome donneur est élevé. Toutefois, plus le nombre de groupements substituants augmente, plus l'encombrement stérique de la molécule augmente entraînant une déstabilisation du complexe. Pour diminuer cet encombrement stérique, on peut relier les atomes donneurs par une chaîne alkyle de type éthylène comme la structure éthylène diamine connue pour donner des complexes stables.

### **3) Le degré d'oxydation du complexe**

Le technétium peut présenter un grand nombre de degrés d'oxydation allant de  $-I$  à  $+VII$ . Les états d'oxydation qui dominent sont le  $+I, +III, +V$ . A la sortie du générateur, comme nous l'avons vu plus haut, le Tc est sous forme de  $TcO_4^-$  ( $+VII$ ). Pour obtenir les degrés d'oxydation habituellement retrouvés dans les complexes il faut diminuer celui du pertechnétate (réduction) pour obtenir des orbitales « d » vides lui permettant de se lier aux ligands donneurs d'électrons tels que S, N, P puis stabiliser le technétium au degré d'oxydation voulu. Pour cela, plusieurs paramètres vont entrer en compte : la nature du réducteur, le pH, la température et la nature du ligand. C'est ce dernier qui est le plus important dans la conception du complexe. En effet, les ligands bases dures stabilisent les formes acides dures du métal donc les degrés d'oxydation élevés du technétium alors que les bases molles se lient aux technétium possédant des degrés d'oxydation faibles[23].

### **4) La charge du complexe :**

La charge du complexe détermine sa nature physico-chimique. Elle est importante pour sa distribution dans l'organisme. Les complexes neutres sont lipophiles et peuvent donc passer la barrière hémato-encéphalique, les complexes anioniques sont basiques et les complexes cationiques sont acides.

Comme nous venons de le voir, le technétium 99 métastable à l'état natif se trouve dans un état d'oxydation  $+VII$  qui ne peut pas se complexer. Il faut donc le réduire pour former des complexes stables. L'obtention du nombre de coordination dépend de plusieurs facteurs : le réducteur, les conditions de la réaction, et la nature des ligands.

## 5) Activité spécifique de l'isotope radioactif :

Elle correspond à l'activité par unité de masse. Elle s'exprime en becquerels par kilogramme (Bq/kg). Dans la chimie du technétium elle est importante à prendre en compte. En effet, dans l'éluât se trouve du technétium 99 métastable et du technétium 99 stable. Les 2 se complexent de la même manière aux ligands. Il est donc important d'avoir des éluats avec une haute activité spécifique pour réaliser un marquage contenant essentiellement l'isotope radioactif. Pour obtenir une bonne activité spécifique, les marquages doivent donc être réalisés avec une élution fraîche datant de moins de 2h sur un générateur ayant été élué au maximum 24 h avant.

### C. Synthèse des complexes technétiés :

Dans la formation du complexe, l'entité la plus importante est le réducteur vu qu'il permet d'abaisser le degré d'oxydation du technétium. Il existe un grand nombre de réducteurs utilisés dans la chimie du technétium qui peuvent être soit des sels métalliques tels que le Sn (II), le Fe (II), le Cu (I) soit des agents non métalliques tels que le borohydrure de sodium et l'hydrazine. Tous peuvent donner 1 ou 2 électrons. Dans certains cas, le ligand peut également être réducteur comme les phosphines seules ou conjuguées avec d'autres ligands. Dans beaucoup de cas la réduction (comme dans le cas de Sn(II) ou phosphine) peut être caractérisée par une réaction d'élimination de l'oxygène.

Dans la préparation des médicaments radiopharmaceutiques, le réducteur majoritairement retrouvé est l'étain stanneux sous forme de chlorure d'étain car il est stable, soluble dans l'eau et peu toxique.

Dans la mise au point de composés, le choix du réducteur va dépendre de la nature de la molécule à marquer. Ainsi, les thiols et le borohydrure de sodium sont des réducteurs trop forts pour les peptides cycliques possédant un pont disulfure, le Cu(II) donne des complexes stables avec les ligands  $N_2S_2$ .

Pour stabiliser le degré d'oxydation, on ajoute souvent dans le milieu réactionnel des adjuvants comme l'acide ascorbique, antioxydant qui empêche la radiolyse et la réoxydation du technétium, le tartrate ou gluconate, stabilisateurs des ions  $Sn^{2+}$ , qui évitent leur précipitation en milieu aqueux et des composés comme le l'oxalate ou le citrate qui favorisent la réaction de complexation et des solutions milieux qui ajustent le pH.

Suite à leur formation, les formes réduites du technétium sont instables en solution et doivent être rapidement complexées à leur ligand. En effet, sous l'action des

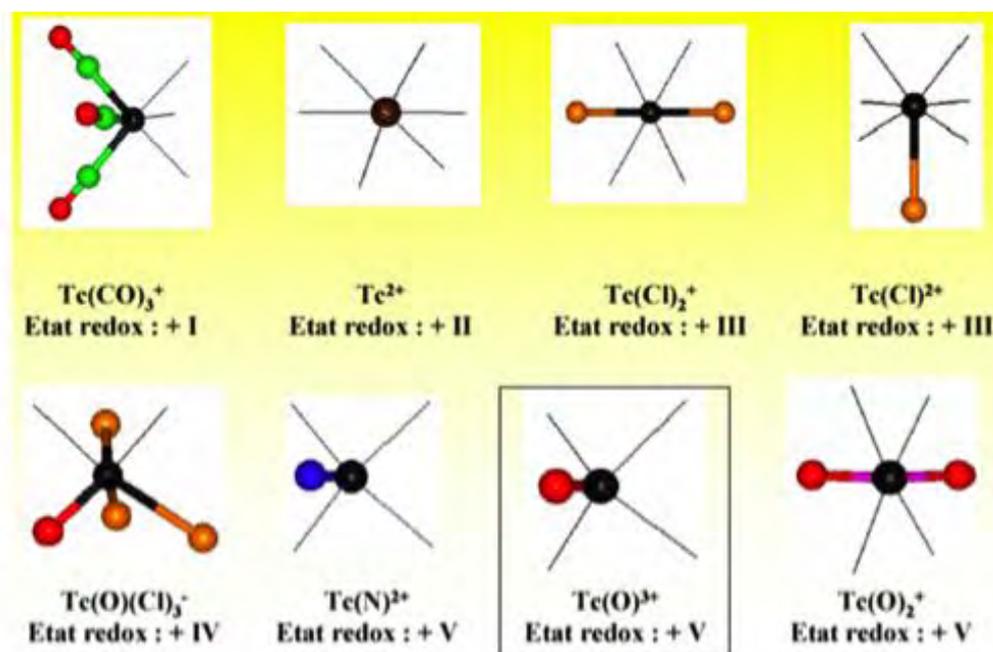
molécules d'eau et d'oxygène, le technétium réduit n'ayant pas réagi avec le ligand peut se transformer en espèce cationique qui aboutira au technétium hydrolysé réduit ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ) ou en ses formes hydroxylées qui ne se complexent plus.

La chimie du technétium est une chimie de trace car les quantités de radioisotope utilisées sont de l'ordre de  $10^{-11}$  à  $10^{-12}$  M. Suivant la vitesse de la réaction de complexation, il existe 2 méthodes de marquage, la méthode directe et la méthode indirecte. Dans la première, l'isotope est réduit et il se fixe rapidement au ligand alors que dans la seconde, la réaction de complexation est lente. Il faut alors utiliser un ligand intermédiaire peu stable qui permet de maintenir, en se liant à lui, le  $^{99m}\text{Tc}$  réduit dans le degré d'oxydation souhaité en attendant que la complexation avec le ligand d'intérêt se fasse.

### Représentation des complexes technétiés :

Il existe 2 formules pour représenter les complexes technétiés :

- $[\text{TcX}_n\text{L}_m]$  avec TcX cœur du complexe. X peut être un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote et L le ligand (la base). Les cœurs les plus souvent retrouvés sont le cœur monoxo  $[\text{TcO}]^{3+}$ , le cœur transdioxo Tc  $[\text{TcO}_2]^+$  et le cœur nitruro Tc  $[\text{TcN}]^{2+}$  (Figure 26).
- $[\text{TcX}_6]$  avec X qui peut être Br, Cl, CN,



**Figure 26** : Les principaux cœurs technétiés et les principaux états d'oxydation du cœur métallique

Lors du marquage de la molécule d'intérêt, l'approche peut être directe c'est à dire que le technétium se fixe directement sur la molécule qui possède des ligands donneurs, on parle alors de complexes « metal essential » soit de manière indirecte par l'ajout d'un ligand bifonctionnel, appelé synthon qui va permettre de relier le technétium à la molécule d'intérêt. Sans ce ligand, la complexation du métal sur la molécule serait impossible.

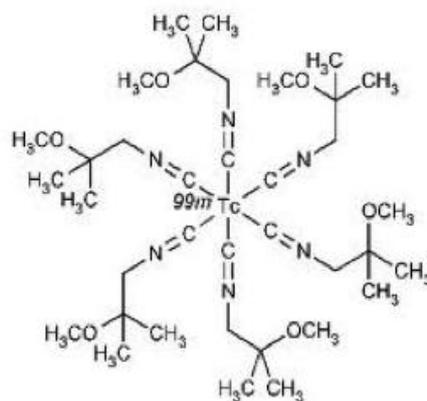
#### **D. Les complexes « $^{99m}\text{Tc}$ essential »**

Dans les complexes « Tc-essentiel », l'atome de Tc complète le vecteur. Le technétium donne un caractère physico-chimique particulier à la molécule, qui dicte efficacement la localisation du composé marqué. Ils représentent la majorité des médicaments radiopharmaceutiques (MRP) actuellement commercialisés car ils mettent en œuvre un protocole rapide et simple pouvant être utilisé dans les services de médecine nucléaire. La biodistribution de ces complexes essentiels dépend des propriétés physico-chimiques du complexe formé par la liaison du métal à la molécule. Sa taille va définir la voie d'élimination et le passage transmembranaire alors que la charge et la lipophilie vont influencer le passage de la barrière hématoencéphalique. Les degrés d'oxydation habituellement retrouvés sont le +I, +III, +V.

Nous allons voir quelques exemples des MRP les plus couramment utilisés

##### **1) L'état d'oxydation Tc (I)**

Les degrés d'oxydation bas des complexes organométalliques de Tc ont commencé à se développer dans les années 1980 avec l'apparition d'un complexe très stable et hydrosoluble  $^{99m}\text{Tc}$  sestamibi ou métoxy-isobutyl-isonitrile [ $^{99m}\text{Tc}(\text{MIBI})_6$ ]<sup>+</sup> utilisé comme agent de perfusion myocardique ou exploration des parathyroïdes (Figure 27). Ce complexe, très stable et hydrosoluble est obtenu avec un excellent rendement de marquage. Pour ce degré d'oxydation, le Cardiolite® représente le MRP le plus connu.



**Figure 27:** Complexe technétié au degré d'oxydation +I : Cardiolite®

## 2) L'état d'oxydation Tc (III)

C'est un degré d'oxydation intermédiaire. Le technétium peut donc se coordonner avec des ligands durs et mous. Parmi les ligands mous on retrouve les phosphines, alors que dans la deuxième catégorie on retrouve les anions aminocarboxylates (EDTA, DTPA, ...). La structure est de type octaédrique avec 6 coordinats.

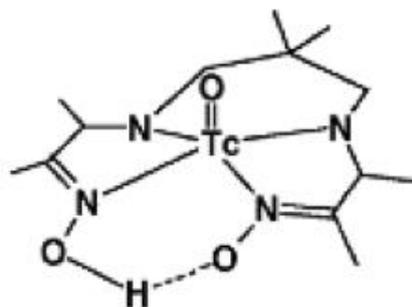
## 3) L'état d'oxydation Tc (V)

Le degré d'oxydation V est l'un des plus importants de la chimie de coordination du technétium. Les cœurs les plus représentatifs de cet état d'oxydation sont l'oxo technétium  $[TcO]^{3+}$ , le dioxotechnetium  $[TcO_2]^+$ , le nitruro technétium  $[TcN]$  et le sulfido technétium  $[TcS]$ .

### (a) Le cœur $[TcO]^{3+}$

Il s'agit du cœur le plus souvent retrouvé car il se forme facilement au cours de la réduction du pertechnétate en milieu aqueux légèrement acide. Le métal est considéré comme pentacoordonné. Ce cœur est stabilisé par les ligands donneurs de thiolate et des ligands d'alkoxide.

Le radiopharmaceutique le plus connu avec ce cœur technétié est l'examétazine (hexamethylpropylèneamine oxime ou HMPAO) Ceretec® ou Cerestab®. Ces derniers sont utilisés pour le marquage des polynucléaires ou la scintigraphie cérébrale (Figure 28).

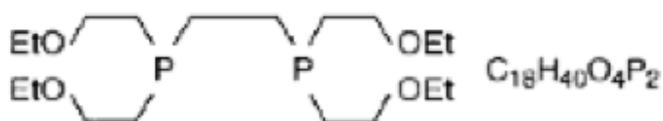


**Figure 28 :** Ligand à cœur de technétium  $[TcO]^{3+}$  : complexe HMPAO

Lors du développement des produits radiopharmaceutiques cible-spécifiques, l'inconvénient majeur de ces complexes  $[^{99m}TcO]^{3+}$  est la concentration élevée en ligand qu'il faut apporter pour stabiliser l'état d'oxydation +V du  $^{99m}Tc$ . Il en résulte une diminution de l'activité spécifique.

**(b) Le cœur  $[TcO2]^+$**

Il se forme essentiellement en milieu basique. Les ligands sont soit des ligands -CN, pyridine, bidentés (amine), tétradentés (cyclam) ou des phosphines comme c'est le cas pour la tetrofosmine ([6,9-bis (2-ethoxyethyl)-3,12-dioxa-6,9-diphosphatetradecane) retrouvée dans le Myoview® utilisé comme traceur de perfusion cardiaque (Figure 29).



**Figure 29 :** Ligand à cœur  $[TcO2]^+$ . Ligand phosphine Tetrafosmin (Myoview®)

**(c) Les cœurs nitruro technétium (TcN), et sulfido technétium (TcS)**

Ils sont moins employés, du fait de la difficulté de préparation en milieu stérile et de leur faible stabilité en milieu aqueux. Parmi les cœurs nitruro technétium, on peut citer le  $^{99m}Tc$ -NOET qui est un traceur de la perfusion myocardique et l' $^{99m}Tc$ -HYNIC qui est utilisé comme synthon bifonctionnel. Aucun de ces deux traceurs n'est utilisé en routine clinique.

## **E. Les complexes technétiés formés grâce à la présence de synthon**

Le ligand bifonctionnel (LBF) ou synthon (Figure 30) comporte une fonction réactive permettant de coupler le métal à un vecteur biologique qui possède des propriétés de reconnaissance d'une cible biologique donnée. Sans ce synthon, le technétium ne pourrait pas se lier à la molécule à marquer. Dans le cas de Tc-non essentiel, l'atome de Tc est ajouté au vecteur. Ces complexes peuvent être décrits comme des composés dont l'affinité particulière pour une cible biologique ne dépend pas principalement de l'inclusion de l'atome de technétium. Une partie importante de ce ligand est réservée à la conjugaison de ce complexe à des biomolécules (protéines, anticorps, oligonucléotides, sucres) permettant au technétium (conjugué à l'autre partie du complexe), de s'accumuler spécifiquement et significativement au niveau d'une cible biologique à étudier (protéine, cellule, tissu).

Dans l'approche du LBF, le technétium doit être le plus loin possible du motif spécifique du ligand qui permet de se lier à la cible biologique. En effet, cela minimise l'influence du chélate sur la liaison à la molécule d'intérêt.

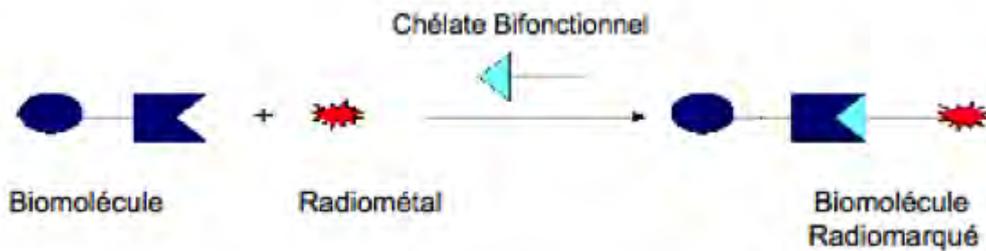
Un ligand bifonctionnel idéal doit remplir plusieurs conditions:

- Il doit avoir une stabilité thermo-dynamique et une inertie cinétique élevée dans des conditions physiologiques. En effet, la décomposition du chélate produit la libération de  $^{99m}\text{Tc}$  qui va aller s'accumuler dans des organes non spécifiques ne reflétant pas la biodistribution du complexe technétié initial.
- Il doit former un chélate avec un petit nombre d'isomères pour ne pas modifier les propriétés biologiques du complexe initial.
- Il doit être hydrophile pour améliorer la clairance sanguine et l'excrétion rénale du chélate.
- Il doit pouvoir résister à la radiolyse.

La manière la plus fréquente d'augmenter la stabilité thermo-dynamique et l'inertie cinétique d'un complexe est d'utiliser un chélateur polydentate. La condition de denticité d'un ligand bifonctionnel dépend en grande partie de la préférence de taille et de géométrie de coordination de l'ion métallique.

Le choix de LBF est déterminé par l'état d'oxydation du radiométal.

Nous allons voir maintenant quelques exemples de chélates bifonctionnels



**Figure 30 :** Schéma d'un chélate bifonctionnel

## 1) L'état d'oxydation +V

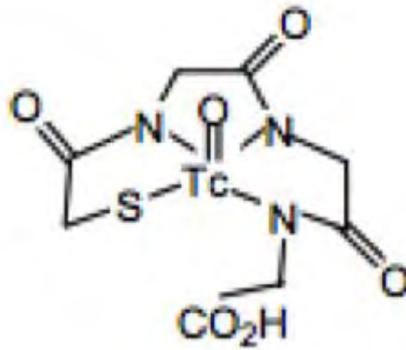
### (a) Le complexe mercaptoacetyltriglycine (MAG 3) :

Il se lie au cœur  $^{99m}\text{TcO} (+V)$ . Le  $[\text{TcO} (\text{MAG3H})]$  est un traceur anionique de la fonction rénale. Ce ligand est modifié en ester du S-acétyle MAG3-ethyl contenant un substituant de P-isothiocyanatobenzyl, ou comme ester du S-acétyle MAG3-hydroxysuccinimidyl pour la conjugaison aux biomolécules.

Les dérivés du mercaptoacetyltriglycine MAG 3 (mertiatide) sont au nombre de 2, le S acétyl MAG3 ou le S-benzoyl MAG3 (bétiatide). Dans ces 2 LBF, le soufre est protégé contre l'oxydation. Le S acétyl MAG3 est déprotégé à température ambiante alors que le S-benzoyl l'est à  $100^\circ\text{C}$ . Comme les atomes de soufre et d'azote peuvent se lier au  $^{99m}\text{Tc}$ , la molécule marquée peut se présenter sous plusieurs formes.

MAG3H5 est un membre de la famille des chélates  $\text{N}_x\text{S}_{4-x}$ . Cette famille présente l'avantage de former des chélates stables et de petite taille mais qui ne possèdent pas de centre de symétrie. La présence de ce dernier oriente vers la formation d'une forme géométrique unique.

Le MAG3H5 se lie au cœur  $[\text{Tc} (\text{V}) \text{O}]^{3+}$  (Figure 31). L'inconvénient de ce ligand est son absence de centre de symétrie lors de la coordination au  $^{99m}\text{Tc}$ . Cela va entraîner la formation d'isomères multiples qui ne posséderont pas les mêmes propriétés pharmacocinétiques.



**Figure 31 :** Structure de [TcO(MAG3H)]-(Mertiatide)

**(b) HYNIC : Hydrazino(pyridine-3-carboxylic) [24]**

L' HYNIC (Figure 32) possède à une extrémité une fonction acide (activée ou non par un dérivé N-hydroxysuccinimide) qui se lie aux groupes nucléophiles (tels que les groupements amines primaires des vecteurs comme les résidus lysine) des protéines, des polypeptides ou des glycoprotéine ainsi qu'une extrémité hydrazine qui se complexe au technétium pour donner un cœur diazotechnétium.

Il est utilisé pour marquer de nombreuses molécules de grosse taille telles que des immunoglobulines IgG, les analogues de la somatostatine, les oligonucléotides, la sérum albumine humaine ou l'anexine V.

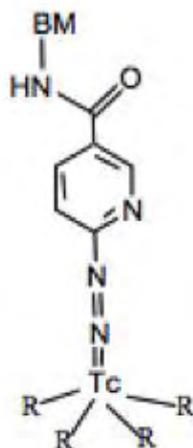
La réaction a lieu en milieu aqueux par ajout du  $^{99m}\text{Tc}$  en présence du réducteur sur la biomolécule. Les paramètres de la réaction sont à déterminer pour chaque peptide. Le complexe  $^{99m}\text{Tc}$  de HYNIC est peu stable. Il faut donc former un complexe mixte en présence de coligands comme la tricine, le glucoheptonate ou l'acide éthylène diamine diacétique, les phosphines ainsi que des systèmes ternaires contenant une association tricine phosphines hydrosolubles ou tricine –N imine hétérocycle [23]. Ces coligands sont nécessaires pour accomplir la sphère de coordination du technétium, maintenir la structure du complexe et conserver le technétium à l'état d'oxydation +V. Si les 2 coligands sont identiques on parle de systèmes binaires, s'ils sont différents il s'agit de systèmes ternaires [25].

Les coligands les plus utilisés sont la tricine et le glucoheptonate.

L'avantage d'employer l'HYNIC comme ligand bifonctionnel est son efficacité élevée de marquage et le choix des coligands tels que la tricine qui permet un marquage stable et l'obtention d'un complexe technétié hydrosoluble.

Cependant, la biodistribution de la molécule marquée peut être influencée en raison de la présence du chélate qui possède une grosse taille. Ceci entraîne des perturbations biologiques et pharmacocinétiques de la molécule à marquer (le ligand

HYNIC provoque une fixation protéique importante des molécules de faibles poids moléculaires) voire une altération de sa fonction. Il faut donc contrôler le nombre d'HYNIC fixé sur les molécules (pas plus de 1 HYNIC par molécule).



**Figure 32 :** Structure du complexe  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC- biomolécule (BM)

**(1st) S-6-HYNIC :Succinilidyl-6-hydrazino(pyridine-3-carboxylic)**

Ce LBF fut utilisé dans les années 1990 pour marquer les IgG avec de très bons rendements de marquage [24]. Les résultats montraient que 3 molécules d'HYNIC étaient fixées sur une molécule d'anticorps et que la pureté radiochimique du complexe technétié était supérieure à 98%. Cependant avant le marquage il faut bien connaître la composition en acides aminés de la protéine. En effet pour que la réaction se fasse de manière optimale, le pH du milieu doit être légèrement alcalin (entre 7,5 et 8,5) afin que le groupe amine libre de la lysine ne soit pas ionisé. Par contre à ce pH, des résidus amine de l'arginine sont ionisés pouvant ainsi donner une molécule qui reconnaîtra avec moins d'affinité sa cible. Aussi, le rapport HYNIC/protéine doit être compris entre 0,5 et 1 pour ne pas modifier la fonctionnalité du peptide et conserver une bonne activité spécifique (nombre de moles de peptide froid non marqué le plus faible possible).

Le couplage se fait de manière indirecte. D'une part S-6-HYNIC est lié à la protéine d'intérêt. D'autre part, le  $^{99m}\text{Tc}$  est chélaté par un ligand faible (le coligand) en présence de réducteur comme le chlorure d'étain stanneux. Après purification, les 2 solutions sont mélangées et le  $^{99m}\text{Tc}$  se lie par transmétallation à l'HYNIC.

## 2) L'état d'oxydation +I

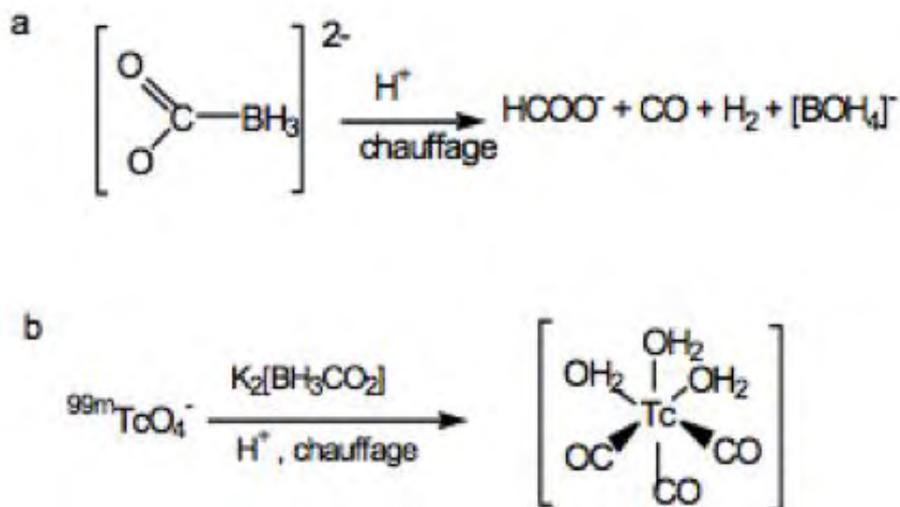
### (a) Le complexe tricarbonyle $Tc(CO)_3^{I+}$ [26-31]

En 1998, Alberto *et al* ont développé un nouveau complexe technétié tricarbonyle noté  $[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ . L'intérêt de ce synthon réside dans sa grande stabilité (due au faible degré d'oxydation du technétium) et sa petite taille en comparaison aux autres LBF le rendant un bon candidat pour le marquage des petites molécules.

#### (1er) Obtention du cœur tricarbonyle :

Le cœur  $[Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$  peut être préparé en une seule étape en présence de CO et d'un réducteur fort et soluble (pour permettre le passage de l'état d'oxydation +VII du pertechnétate à l'état d'oxydation +I) mais qui ne se coordine pas avec le technétium réduit.

Pour obtenir ce complexe, il faut un composé capable à la fois d'être un réducteur puissant du technétium et un fournisseur de monoxyde de carbone stable. L'équipe de Alberto a donc trouvé un composé qui allie ces 2 fonctions, il s'agit du boranocarbonate de potassium ( $K_2 BH_3CO_2$ ) (Figure 33).



**Figure 33 :** Génération du cœur technétié ticarbonyle à partir du boranocarbonate

a : Production de CO en présence de boranocarbonate

b : Production du cœur technétié ticarbonyle  $[Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$

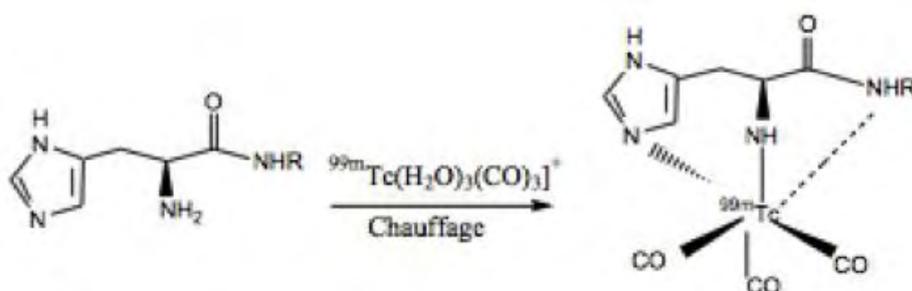
La société Mallinckrodt a commercialisé l' Isolink® permettant la préparation du cœur tricarbonyle. En effet, le kit contient du Na (K) boranocarbonate ( $Na_2(K_2)BH_3CO_2$ ) comme agent réducteur et producteur de CO, du tetraborate de sodium (borax) comme milieu et du Na-tartrate comme agent complexant qui complexe toutes les

espèces de technétium en état d'oxydation intermédiaire. La solution aqueuse de boranocarbonate est basique (pH>11) et très stable, mais l'addition d'un milieu borate Na- tetraborate, pH 9.4-10.4 at 25°C, permet d'observer une décomposition à une température de 75-90°C et à pH= 10.

La formation du cœur tricarbonyle technétié a lieu en ajoutant l'éluat contenant le pertechnétate de sodium (degrés d'oxydation +VII) au kit de marquage contenant le sodium boranocarbonate. La préparation est alors chauffée à 100°C pendant 20 à 30 minutes. Cette étape de chauffage est primordiale car elle permet non seulement d'augmenter la pression dans le flacon qui entraîne la libération du monoxyde de carbone (CO) mais elle permet aussi de réduire le technétium. La réaction a lieu à pH 10 afin de stabiliser le NaBH<sub>4</sub>. A la fin du chauffage, on obtient le semi-aquaion [Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> stable.

### (2e) Marquage des protéines avec le cœur technétié tricarbonyle

Une fois le semi-aquaion [Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> formé, on le met en présence de la molécule à marquer et les ligands présents sur celle-ci vont déplacer les molécules d'eau. En effet, à l'état d'oxydation +I, en milieux aqueux, trois sites de coordination sont occupés par le monoxyde de carbone et les sites restants sont occupés par des molécules d'eau labiles. Le précurseur tricarbonyle est stable dans l'eau à pH basique mais il échange rapidement ses molécules d'eau avec une grande variété de ligands donneurs d'électrons qui sont plus forts que l'eau et surtout plus mous. Les ligands retrouvés peuvent être des aromatiques, des amines aliphatiques, les aminocarboxylates, les phosphines, les thiols, les thioéthers et les isonitriles. La coordination peut être totale les trois sites de l'eau sont échangés et le complexe sera d'autant plus stable que ligand est tridentate (Figure 34).



**Figure 34 :** Réaction de l'histidine avec le cœur technétié tricarbonyle (liaison tridentate)

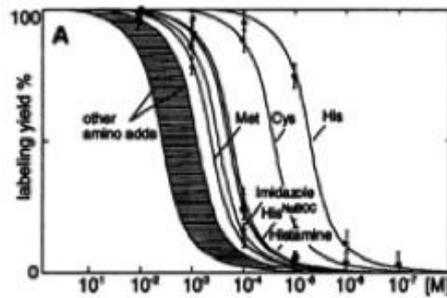
### (3e) Etude des acides aminés se liant au $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

Les amines aliphatiques isolées, les carboxylates et les anions en général se coordinent faiblement au cœur tricarbonyle. Ce sont les amines aromatiques qui présentent la meilleure liaison au cœur tricarbonyle car elle est rapide et thermodynamiquement stable. On retrouve aussi les hétérocycles, les thioéthers et les thiolates se lient mais plus ou moins lentement.

Ces fonctions thioéthers se retrouvent sur les chaînes latérales de la méthionine, les thiolates sur celles de la cystéine et les N-hétérocycles sur l'histidine. Ce sont donc ces acides aminés qui sont intéressants dans le marquage des peptides avec le cœur technétié tricarbonyle. Les ligands idéaux doivent donc contenir une ou plusieurs amines, préférentiellement aromatique N-hétérocycle comme les imidazoles, pyridine et pyrazoles, les amides, amines, et l'acide carboxylique [25]

Pour savoir quels sont les acides aminés dans une séquence peptidique qui se lient préférentiellement au cœur tricarbonyle, Egli *et al* ont étudié la liaison de divers acides aminés à différentes concentrations [32]. La principale conclusion de cette étude est que l'histidine forme des complexes à la concentration de 1  $\mu\text{mol/L}$  et une activité spécifique de 6TBq/ $\mu\text{mole}$ . La plupart des autres acides aminés ont dû être 1000 fois plus concentrés pour obtenir le complexe correspondant marqué au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . La cystéine peut se lier au complexe tricarbonyle à une concentration 10 fois supérieure à celle de l'histidine. Cependant, la forme oxydée de la cystéine, la cystine, qui est la forme la plus répandue dans les protéines, n'est pas un bon ligand et n'est pas donc un site potentiel pour le marquage.

La méthionine se lie au tricarbonyle, légèrement mieux que les acides aminés avec des chaînes latérales aliphatiques. La différence dans le rendement de marquage entre la cystéine et la méthionine suggère que la formation du complexe dépend fortement de la nature des acides aminés environnant, au moins en solution aqueuse (Figure 35).



**Figure 35 :** Rendement de marquage lors de la complexation de différents acides aminés avec le cœur technétié tricarbonyle (publication Egli et al 1999)

His :Histidine

Met : methionine

Cys : Cystéine

En conclusion, l'histidine est donc le meilleur site de marquage indépendamment de sa position bien que la position N-terminale soit plus favorable. En effet, elle permet d'obtenir un marquage stable, un meilleur rendement de marquage, et une meilleure activité spécifique.

#### **(4e) Denticité des complexes technétiés par tricarbonyle**

L'histidine retrouvée dans de nombreuses protéines permet une chélation [33]. Une étude réalisée par Schibli [31] a montré l'influence de la denticité sur le devenir des complexes dans l'organisme. Ainsi, les complexes  $^{99m}\text{Tc}$ -tricarbonyle des ligands bidentés sont plus captés par le foie et les reins que les complexes tridentés. Ces différences peuvent être liées à la susceptibilité du troisième site non chélaté ( $\text{H}_2\text{O}$ ). L'échange avec des biomolécules plus réactives *in vivo* permettant au complexe d'être maintenu dans le tissu.

Le cœur Tc tricarbonyle offre un certain nombre d'avantages pour la conception des nouveaux produits radiopharmaceutiques :

- les complexes sont hydrosolubles et subissent facilement l'échange de ligand avec l'eau
- le cœur  $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^{1+}$  est chimiquement stable,
- la nature organométallique du cœur permet la formation de liaisons covalentes
- il permet de marquer toutes sortes de protéines de grandes et de petites tailles
- le marquage se fait rapidement en 2 étapes

Comme nous venons de le voir la chimie de coordination du technétium est riche. Ceci est du en partie aux grands nombres d'oxydation que peut prendre le technétium (-I à +VII) mais aussi aux différentes géométries du cœur. Les plus étudiés jusqu'ici sont le cœur du  $[TcO]^{3+}$  représenté par le MAG 3, le cœur Tc-organohydrazine caractérisé par l'HYNIC et le cœur tricarbonyle.

L'utilisation des complexes reposant sur le cœur  $[TcO]^{3+}$  MAG3 est limitée à cause de l'instabilité des complexes pendant l'imagerie et la présence d'isomères multiples et des variations de la charge du complexe dues à la présence de plusieurs sites de protonation.

La voie de HYNIC a été aussi appliquée avec succès dans l'imagerie et semble être une technique souple pour marquer des biomolécules. Cependant, en dépit de la nature stable du cœur Tc-organohydrazino, les complexes sont mal caractérisés au niveau du traceur formé. En outre, la synthèse du conjugué HYNIC-peptide est nécessaire. Cette synthèse ainsi que la chimie de coordination/coligand sont complexes.

Le cœur organométallique de tricarbonyle,  $[Tc(CO)_3]^{1+}$ , où le Tc est dans l'état d'oxydation +I a été développé pour la préparation des complexes de petites tailles avec une activité spécifique élevée.

Le cœur tricarbonyle possède un spin d6 et un centre du Tc(I) qui est cinétiquement inerte et offre plus de flexibilité de choix de ligands en termes de taille, de charge et de lipophilie sans influencer la stabilité thermodynamique. Les trois ligands aqueux facilitent la formation des complexes stables tridentés. Divers ligands contenant de des thioéthers, des thiolates et des N-hétérocycles tels que la méthionine, la cystéine ou surtout l'histidine réagissent avec le précurseur pour former des complexes stables pour l'obtention de radiopharmaceutiques spécifiques d'une cible biologique. Le complexe technétié est petit et hydrophile. Il modifie peu les propriétés physicochimiques et biologiques de la molécule bioactive.

Sa grande stabilité et sa petite taille par rapport aux autres complexes en font un bon candidat pour le marquage de petites molécules.

Au terme de cette partie, nous avons voulu montrer la richesse de la chimie du technétium et les différentes applications que l'on pouvait en faire. Dans la dernière partie de cette thèse nous avons voulu montrer les différentes applications diagnostiques et pré-thérapeutiques de la médecine nucléaire dans une pathologie bien décrite, le lymphome.

## **Chapitre 3 : ETUDE DU LYMPHOME CHEZ LE PETIT ANIMAL**

**MISE EN PLACE DE RADIO TRACEUR TUMORAUX  
ET  
ETUDE DE BIODISTRIBUTION CELLULAIRE**

Les lymphomes B non Hodgkinien (LNH) représentent les hémopathies malignes les plus fréquentes en France. L'incidence a augmenté sur les 20 dernières années et les LNH sont la 5<sup>ème</sup> cause de cancer en France. Le pronostic de cette maladie a été amélioré avec l'arrivée de nouvelles thérapeutiques tels que les anticorps monoclonaux comme le Rituximab (Mabthera®). Il s'agit d'une immunoglobuline chimérique humaine/souris dirigée contre l'antigène transmembranaire CD 20, qui est exprimé dans plus de 90% des LNH [34]. Au cours du parcours thérapeutique du patient, l'imagerie occupe une place centrale dans le diagnostic, le bilan d'extension, la réponse au traitement ou le suivi des rechutes. Les techniques d'imagerie utilisées dans les LNH sont la tomодensitométrie et la tomographie par émission de positons couplée à la tomодensitométrie. Comme nous l'avons déjà vu, la TEP / CT au [<sup>18</sup>F]FDG est une méthode basée sur la fusion entre une image anatomique et une image métabolique donnée. Bien que cette méthode soit très sensible, elle n'est malheureusement pas spécifique du LNH. Elle ne peut pas être utilisée pour les lymphomes indolents ayant une faible consommation de glucose. Par conséquent, le développement d'un composé diagnostique plus spécifique des LNH semble être intéressant. En raison de l'expression répandue du CD 20 sur les cellules tumorales du LNH, le radiomarquage du Rituximab avec un émetteur de positons [35] ou le <sup>99m</sup>Tc représente une approche spécifique de la maladie.

Ainsi, dans notre travail, nous avons décidé d'aborder l'apport de l'imagerie métabolique suivant 2 approches. La première est plutôt orientée diagnostic. Elle a consisté à mettre au point un radiotracer de tumeur basé sur l'utilisation du Rituximab anti CD 20 et du cœur <sup>99m</sup>Tc tricarbonyle par un procédé ne comprenant pas d'étape de réduction spécifique de l'anticorps. Nous avons évalué l'efficacité du marquage par des études *in vitro* et *in vivo* chez des souris greffées avec un lymphome de Burkitt humain CD 20+.

Dans un deuxième temps, nous montrerons les travaux réalisés dans une approche plus thérapeutique. Elle consiste à évaluer l'efficacité antitumorale de cellules appelées lymphocytes T $\gamma\delta$  en les marquant avec un complexe technétié ou indié. Nous avons ensuite étudié leur distribution chez des souris greffées ou non avec un lymphome de Burkitt humain CD 20+.

## **I. Mise en place d'un radio traceur spécifique du lymphome**

Les cellules tumorales peuvent être visualisées spécifiquement suivant trois approches : utilisation de gènes rapporteurs (GFP, luciférase), la chimie bioorthogonale qui permet de visualiser un substrat cellulaire préalablement modifié et le marquage de molécule d'intérêt.

Alors que les 2 premières stratégies demandent une modification génétique des cellules, la dernière consiste à marquer *in* ou *ex vivo* une molécule physiologique d'intérêt sans altérer sa fonction principale et de suivre son devenir dans l'organisme. L'avantage de cette dernière technique de marquage, si elle est réalisée avec un isotope radioactif, est qu'une fois développée chez le petit animal, elle peut s'appliquer à l'imagerie humaine. Cependant, le passage de la souris à l'homme représente moins de 5% des traceurs tumoraux élaborés. Cela est dû à la difficulté d'obtenir des ratios tumeurs sur bruit de fond significativement discriminants.

Nous allons détailler au cours de cette partie toutes les étapes de la mise au point d'un radiotraceur spécifique du lymphome CD 20+. Au cours des dernières années, plusieurs méthodes basées sur le marquage du Rituximab au  $^{99m}\text{Tc}$  ont été décrites [36-38]. Toutes comprennent une étape de réduction afin de créer des sites qui facilitent la fixation du technétium. Depuis 2003, la société Mallinckrodt a commercialisé l'Isolink® qui permet d'obtenir facilement un complexe du  $^{99m}\text{Tc}$  à cœur tricarbonyle [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ ] qui résiste à l'oxydation à l'oxygène [32]. Le boranocarbonate de sodium présent dans le kit donne les CO en même temps qu'il assure la réduction du  $^{99m}\text{Tc}^{\text{VII}}\text{O}_4^-$  au degré d'oxydation +I.

Les 3 molécules d'eau peuvent être facilement échangées par des ligands contenant des N-hétérocycliques, des thioéthers, des fonctions thiolate [39], présents dans les acides aminés comme l'histidine, la cystéine et la méthionine [33, 39]. Ces acides aminés étant présents dans le Rituximab, le radiomarquage de celui-ci est théoriquement possible sans aucune étape de réduction préalable des ponts disulfures de l'anticorps.

Nous aborderons aussi les principes du marquage des peptides avec un traceur PET, le zirconium 89.

## **A. Mise au point du marquage du Rituximab au Technetium 99m**

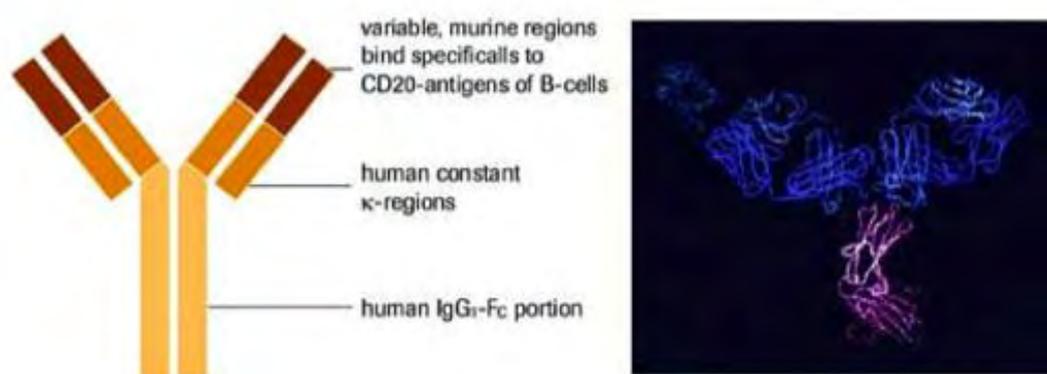
Toutes les manipulations utilisant des isotopes radioactifs se sont déroulées en zone contrôlée dans des hottes blindées ou derrière des paravents plombés. Les déchets radioactifs ayant une période inférieure à 100 jours ont été stockés pendant au moins 10 périodes et éliminés lorsque la mesure était inférieure à deux fois le bruit de fond (Guide de l'ASN n°18 [40]).

### **1) Matériel et méthode**

#### **(a) Matériel :**

##### **(1er) Anticorps : Rituximab**

Le Rituximab (Mabthera®) est un anticorps monoclonal chimérique murin/humain anti-CD20. Il s'agit d'une immunoglobuline de type IgG1 associant les régions constantes (les plus immunogènes) humaines et les régions variables (reconnaissant l'Ag) des chaînes légères et lourdes murines (Figure 36).



**Figure 36 :** Structure du Rituximab

##### **(2e) L'isotope radioactif : Technetium 99m**

Le  $^{99m}\text{Tc}$  représente l'isotope radioactif de référence en diagnostic car il possède les propriétés de l'isotope idéal décrites plus haut.

Le pertechnétate [ $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ] a été élué dans une solution saline à partir d'un générateur de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  (IBA, Saclay, France).

**(3e) Le coeur tricarbonate :**

Il est commercialisé et fourni gracieusement par la société Mallinckrodt (Petten, Pays Bas) sous le nom d'Isolink®. Il est constitué par un mélange de 4,5 mg de boranocarbonate de sodium, de 7,15 mg de carbonate de sodium, de 2,85 mg de tétraborate de sodium et de 8,5 mg de tartrate de sodium.

**(4e) Purification par Extraction sur Phase Solide (SPE):**

Nous avons utilisé des colonnes d'exclusion composées de gel de Sephadex (PD-10 GE healthcare®) qui permettent de séparer les molécules en fonction de leur poids moléculaire. Pour ce travail, nous avons utilisé du gel de Sephadex G-25 qui permet la séparation des molécules de poids moléculaire supérieur à 5000 Da.

**(5e) CLHP :**

L'appareil de CLHP que nous avons utilisé (ICS) comporte une colonne d'exclusion stérique (CIL Cluzeau Satbility 200 SEC 5µm 300 x8mm). Ce type de chromatographie permet de séparer des espèces macromoléculaires selon leur taille. La solution contenant la molécule d'intérêt ainsi que des impuretés éventuelles de tailles diverses est éluée dans cette colonne qui comporte une phase stationnaire constituée par un gel présentant une structure poreuse (taille des pores 5 µm, ouverture des pores 200 angström). La séparation est basée sur un effet d'exclusion stérique par les pores de la phase stationnaire. Les grosses molécules sont éluées en premières.

La colonne CLHP est éluée par du sérum physiologique à un débit de 2 mL/min. Elle est dotée de deux détecteurs : l'un pour l'UV réglé à 280 nm et un autre (sonde NaI, Gabi-Raytest) pour la détection des rayons gamma.

Elle est utilisée pour évaluer la pureté radiochimique de l'anticorps marqué ainsi que sa purification si nécessaire.

**(6e) La chromatographie sur couche mince :**

Elle est réalisée pour déterminer la pureté radiochimique de l'Isolink® ainsi que la stabilité de l'anticorps dans le plasma. L'échantillon à analyser est déposé sur une bande d'Alugram®. La plaque est alors mise dans une cuve saturée par une phase mobile constituée par un mélange eau/méthanol (90/10) avec 2,5 µl d'acide acétique. L'analyse est effectuée grâce à un radiochromatographe (Mini Gita, Raytest). L'Isolink se situe au dépôt, le TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> migre au front.

## (7e) Les gamma caméras et les logiciels d'acquisition

### La gamma caméra Biospace $\gamma$ -IMAGER (Figure 37)

La première gamma caméra utilisée pour ce travail est une gamma caméra Biospace  $\gamma$ -IMAGER®. Il s'agit d'une  $\gamma$ -caméra qui permet de réaliser des acquisitions en 2 dimensions.

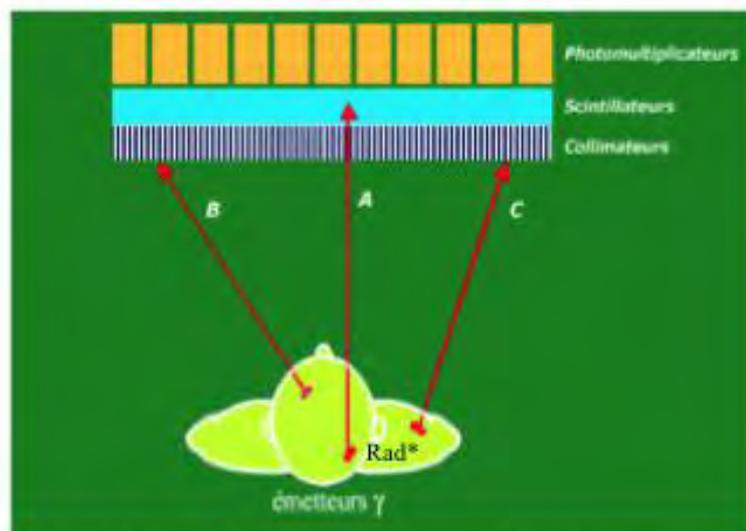
Elle est composée par :

- un seul collimateur qui permet de sélectionner les rayons  $\gamma$  se propageant dans une direction donnée. Il s'agit ici d'un collimateur utilisé pour les énergies  $<200$  keV (collimateur : 20 mm, trou : 1,8 mm, cloisons : 0,2 mm). Ces caractéristiques diminuent légèrement la résolution de la caméra qui est de l'ordre de 2 mm mais améliore la sensibilité. Il ne permet de visualiser des traceurs indés (trop haute énergie).
- un scintillateur formé par des cristaux d'iodure de sodium ou d'iodure de césium qui transforme les photons  $\gamma$  arrivant en photons de scintillation,
- un photomultiplicateur qui transforme et amplifie l'énergie déposée par les photons en signal électrique,
- convertisseur d'analogie numérique qui numérise le signal électrique



**Figure 37 :** Gamma caméra Biospace  $\gamma$ -IMAGER

Les rayonnements gamma étant émis dans toutes les directions, il faut utiliser un collimateur pour sélectionner une direction donnée qui permettra de localiser l'endroit de l'émission. Sur la figure ci dessous, seul les photons A seront détectés car ils passent à travers le collimateur et arrivent sur le scintillateur. Les photons B et C n'arrivant pas sous un angle précis, ne passent pas le collimateur. Ils sont absorbés par le plomb et donc non détectés (Figure 38).



**Figure 38** : Principe de fonctionnement d'une gamma caméra

L'acquisition des images et l'interprétation des images sont réalisées avec les logiciels «  $\gamma$  Acquisition » et « Vision  $\gamma$  » (Biospace ®). Les acquisitions ont été réalisées en enregistrant un nombre de coups définis pour tous les animaux.

Les images obtenues sont uniquement planaires et elles reflètent la distribution du radio traceur dans l'organisme de la souris. Il s'agit d'une imagerie métabolique.

Gamma caméra nanoSPECT/CT de chez Biospace (Figure 39):

Depuis septembre 2012, l'Institut Fédératif de Recherche Bio-Médicale de Toulouse avec Anexplo et plus particulièrement la plateforme d'Exploration Non Invasive s'est dotée d'une  $\gamma$ -caméra plus performante que celle utilisée jusqu'à maintenant. Il s'agit de la nanoSPECT/CT Biospace qui est dotée d'un CT et d'un système de TEMP (SPECT) composé de 4 détecteurs possédant chacun 9 pinholes qui peuvent détecter le technétium 99 m comme l'indium 111. Ses caractéristiques sont les suivantes :

- 4 détecteurs constitués de cristal de NaI (230mm x 215mm)
- 36 pinholes au total soit 9 par détecteur
- une résolution de la  $\gamma$ -caméra de 0,9 mm (en comparaison au 2 mm celle utilisée auparavant)
- une sensibilité supérieure à 1400 cps/MBq
- une résolution du scanner de l'ordre de de 100  $\mu$ m
- une irradiation inférieure à 50 mGy pour des scans de 3 minutes.

L'avantage de cette caméra par rapport à la première utilisée est qu'elle réalise une imagerie en 3 dimensions qui permet d'analyser l'animal sur différents plans. De plus, la fusion de la SPECT et du scanner permet d'obtenir une image à la fois fonctionnelle et anatomique par la fusion des 2 modalités.



**Figure 39** : Gamma caméra nanoSPECT/CT

#### (8e) Autoradiographie

Certains animaux sont sacrifiés 24h après administration de l'anticorps radiomarqué, La tumeur est prélevée, rincée 2 fois dans du NaCl 0,9% et immédiatement congelée dans l'isopentane (Prolabo) à -45°C. Des coupes de 20 mm d'épaisseur sont ensuite rapidement réalisées au moyen d'un microtome Microm Hm 500m et déposées sur des lames préalablement gélatinées.

Les lames sont ensuite disposées dans une cassette qui est composée d'un écran de stockage au phosphore (Phosphor Screen Molecular Dynamics) destiné à être exposé à la radioactivité pendant 48h. La cassette sur laquelle se sont impressionnés les rayons est révélée grâce au système Typhoon 9400 de chez GE Healthcare. L'instrument Typhoon est un imageur en mode variable qui produit des images numériques d'échantillons radioactifs, fluorescents, ou de chimioluminescence.

#### (9e) Cellules cancéreuses

Nous avons utilisé un lymphome de Burkitt RAJI. Les cellules sont cultivées dans un milieu complet, RPMI 1640 supplémenté avec 10% sérum de veau foetal (FCS), de la glutamine (2 mM), de la streptomycine (10 pg/mL) et de la pénicilline (200 U/mL) (Invitrogen). Les cellules sont placées dans un incubateur à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub> Tous les 4 jours, les cellules sont

remises à une concentration de 0,2 millions/mL et la viabilité est mesurée au bleu trypan (Cambrex®). Il s'agit d'un colorant qui pénètre dans toutes les cellules mais qui est rapidement exclu des cellules vivantes. Après 5 minutes seules les cellules mortes sont colorées en bleu. Le comptage s'effectue sur une cellule de Malassez.

#### **(10e) Animaux de laboratoire**

Les souris sont abritées dans un établissement exempt d'agents pathogènes et manipulés conformément aux procédures décrites dans la directive 86/609/CEE.

Nous avons utilisé des souris mâles SCID-beige âgées de 12 à 16 semaines. Ces souris ont la particularité d'être dépourvues en lymphocytes B et T. Elles présentent en outre des anomalies fonctionnelles de leur système immunitaire résiduel : leurs cellules NK et les macrophages sont viables mais dépourvues de cytotoxicité. Elles ne pourront donc pas rejeter les tumeurs et LT $\gamma\delta$  humains injectés. Les animaux sont injectés par voie sous cutanée avec des cellules RAJI à une concentration de 6 millions ou avec des cellules DAUDI à une concentration de 10 millions. Les injections sont effectuées sur le flanc. Les expériences débutent quand les tumeurs sont devenues détectables macroscopiquement. Pour toutes les expériences, les souris sont anesthésiées avec un mélange de xylazine / kétamine (proportion 1 :5) ou de l'isoflurane.

Après l'acquisition des images, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale jusqu'à 24h après l'injection. Les organes sont pesés et la radioactivité contenue dans chaque organe est comptée avec un compteur gamma (Automatic Gamma counter 1470 Wizard). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée de [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ]-Rituximab par gramme d'organe (% ID/g). La dose est calculée en utilisant un échantillon de 10  $\mu\text{L}$  de [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ]-Rituximab.

#### **(b) Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. La comparaison statistique des données a été effectuée avec le test t de comparaison entre les deux groupes. Une valeur de  $p < 0,05$  est considérée comme significative.

### **(c) Méthode de radiomarquage de l'anticorps**

Les conditions de marquage du Rituximab avec le composé tricarbonyle ont été optimisées (milieu de la solution, pH de la solution, température, durée de chauffage et temps de marquage). Les différentes étapes de la mise au point sont détaillées ci-dessous.

#### **(1er) Substitution du milieu**

Dans le Mabthera®, le Rituximab à 10 mg/mL est en solution dans un mélange milieu contenant entre autres excipients du citrate de sodium et du polysorbate 80 qui peuvent potentiellement se lier au cœur  $^{99m}\text{Tc}^{\text{I}}$ -tricarbonyle. Nous avons donc substitué le milieu suivant 2 méthodes : la première a été inspirée de la publication de Forer *et al* [41] qui préconise un tampon carbonate/bicarbonate. Nous avons donc utilisé un mélange contenant 10 mM de carbonate acide de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) et 10 mM de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) de pH élevé voisin de 10. La deuxième méthode, plus douce, consiste simplement à remplacer le milieu initial par du sérum physiologique (NaCl 0,9%). Pour ces 2 méthodes, le changement de milieu s'opère avec les colonnes Sephadex. Après 4 rinçages de la colonne par le milieu choisi, nous avons déposé 10 mg d'anticorps (1mL) et nous avons récupéré les fractions contenant l'anticorps. Après ajout de 10 mg de Rituximab, la solution obtenue dans le nouveau milieu est de l'ordre de 8 mg/mL.

#### **(2e) Réduction de l'anticorps**

Pour comparer notre méthode de marquage à la méthode de référence, nous avons réduit, préalablement au marquage, le Rituximab. Pour cela nous avons utilisé du 2-Mercaptoéthanol (2-ME) (Sigma Aldrich®, concentration : 14,3 M et PM = 78,13 g.mol<sup>-1</sup>). Nous avons mélangé 10 mg de Rituximab dans son milieu original avec le 2-ME dans un rapport molaire 2000 :1 (2-ME : anticorps) soit 9 µL de 2ME[42] [43]. La solution est laissée à température ambiante pendant 30 minutes puis l'anticorps réduit est purifié grâce à une colonne PD 10 (G 25) pour éliminer l'excès de réducteur.

**(3e) Marquage avec l'isolink® sans étape de réduction spécifique de l'anticorps**

- Obtention du cœur Tc<sup>I</sup>-tricarbonyl [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]

Quatre milligrammes d'Isolink ® (Mallinckrodt Inc, Petten, Pays-Bas) sont mélangés avec 200 µL de <sup>99m</sup>TcO<sup>4-</sup> (activité comprise entre 740 et 1850 MBq) fraîchement élué de moins de 2h dans un flacon en verre borosilicaté. Après fermeture, le mélange est chauffé à 100 °C pendant 30 minutes au bain marie. La solution est ensuite refroidie dans de l'eau froide pendant 10 minutes. Elle doit être utilisée dans les 4 heures. La solution obtenue a un pH proche de 11.

Pour abaisser le pH, nous avons utilisé une solution d'acide acétique 0,2M. Après ajout de 50µL de cette solution, le pH de la solution d'Isolink® est de 6-7.

- Marquage de l'anticorps

On ajoute 50 µL de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>] neutralisé à 150µL de Rituximab concentré soit 1 à 2 mg (7 à 14 nM). Le mélange est incubé à 37°C pendant 1h.

Si nécessaire, une purification du Rituximab marqué est réalisée en récupérant le pic de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab détecté par CLHP.

**(4e) Contrôle de qualité**

Les contrôles qualité sont réalisés par CLHP avec la même colonne et le même éluant que pour la purification soit le NaCl 0,9%.

Avant d'évaluer la pureté radiochimique, une injection isolée de <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> est réalisée dans les mêmes conditions pour déterminer son temps de rétention et le comparer à celui de l'anticorps marqué. Le temps de rétention de <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> est de 7,38 minutes.

**(d) Expériences in vitro**

**(1er) Stabilité in vitro de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab dans le plasma humain**

Des aliquotes de 50 µL de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab sont ajoutées à 100 µL de plasma humain frais. Elles sont placées dans une étuve sèche à 37 °C. La stabilité est évaluée par CCM après des temps d'incubation de 4h et 24h.

**(2e) Immunoréactivité de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab**

L'immunoréactivité du [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab a été mesurée par la méthode Lindmo. Quatre concentrations de cellules du lymphome DAUDI sont utilisées (nombre compris entre à 0,6.10<sup>6</sup> et 10.10<sup>6</sup> cellules). Pour chaque expérience

d'immunoréactivité, il faut utiliser 140 millions de cellules : 70 millions pour la liaison totale et 70 millions pour la liaison non spécifique. Avant de commencer, les cellules sont préalablement lavées 2 fois dans 15 mL de PBS/BSA 1% pour éliminer les molécules CD 20 qui auraient pu se détacher des cellules. Ceci est effectué par centrifugation (1500 tours par minute pendant 5 minutes). Après le lavage, les cellules sont remises en suspension dans 7 mL de PBS/BSA 1%. Pour chaque concentration cellulaire nous avons réalisé en parallèle la liaison non spécifique. Pour cela nous avons utilisé 32 tubes (16 pour la liaison totale et 16 pour la liaison non spécifique). Nous avons placé 500  $\mu$ l de cellules dans les tubes 2, 3, 4, (le tube 1 correspondant à la concentration cellulaire la plus élevée ( $10 \cdot 10^6$ )). Nous avons pipeté 500  $\mu$ l de cellules que nous avons mises dans le tube 1 ( $10 \cdot 10^6$  millions de cellules) et 2 (qui se retrouve donc dilué au demi soit  $5 \cdot 10^6$  millions de cellules) puis nous avons pris 500  $\mu$ l du tube 2 que nous avons mis dans le tube 3 ( $2,5 \cdot 10^6$  millions de cellules) et enfin nous avons pris 500  $\mu$ l du tube 3 que nous avons placé dans un tube contenant 500  $\mu$ L de PBS/BSA 1% et nous avons pris 500  $\mu$ L de ce tube que nous avons mis dans le tube 4 ( $0,6 \cdot 10^6$  millions de cellules). Nous avons ensuite ajouté 500  $\mu$ l de [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ]-Rituximab à une concentration comprise entre 5 et 7,5 ng/mL pour un volume total de réaction de 1 mL par tube.

Les mêmes manipulations ont été effectuées pour réaliser la liaison non spécifique mais 10  $\mu$ g de Rituximab froid (1000 fois plus) ont été préalablement ajoutés aux tubes contenant le [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ]-Rituximab.

Les tubes sont vortexés et placés à 4°C pendant 2h sous agitation. Après incubation, les tubes sont centrifugés 2 fois à 1500 tours par minute pendant 5 minutes. A la fin de la deuxième centrifugation, nous avons prélevé 500  $\mu$ l de surnageant. La radioactivité contenue sur les cellules et dans les surnageants est mesurée avec un compteur gamma (Automatic Gamma counter 1470 Wizard). Les coups par minute (cpm) obtenus dans les surnageants sont soustraits aux cpm des tubes contenant les cellules. L'essai est toujours réalisé en triple.

Pour chaque concentration, la liaison spécifique du [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ]-Rituximab est calculée en soustrayant à la liaison totale les cpm obtenus pour la liaison non spécifique.

L'immunoréactivité de [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ]-Rituximab est calculée à l'aide du logiciel EXCEL. L'inverse de l'ordonnée à l'origine de la droite de régression linéaire est la fraction immunoréactive.

### **(3e) Expérience de binding [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab**

La liaison de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab est réalisée avec une concentration unique de cellules DAUDI (1 million dans un volume totale de réaction de 1 mL). Quatre concentrations de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab sont utilisées (1,5 ng/mL à 4 ng/mL). Les cellules sont mises en suspension dans un volume de 500 µL RPMI (pH = 7,4) et réparties dans chacun des tubes de l'essai. Pour chaque concentration d'anticorps nous avons réalisé en parallèle la liaison non spécifique. Pour cela nous avons utilisé 32 tubes (16 pour la liaison totale et 16 pour la liaison non spécifique). Nous avons placé 500 µl [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab à une concentration de 48 ng/mL dans le tube 1 (soit une concentration finale dans le tube de 24 ng/mL). Dans le tube 2 nous avons ajouté 500 µl [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab à une concentration de 24 ng/mL (soit une concentration finale dans le tube de 12 ng/mL). Dans le tube 3 nous avons ajouté 500 µl [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab à une concentration de 12 ng/mL (soit une concentration finale dans le tube de 6 ng/mL). Enfin, dans le tube 4 nous avons ajouté 500 µl [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab à une concentration de 3 ng/mL (soit une concentration finale dans le tube de 1,5 ng/mL).

Les mêmes manipulations ont été effectuées pour réaliser la liaison non spécifique mais 10 µg de Rituximab froid (environ 1000 fois plus) ont été préalablement ajoutés au marquage par [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab.

Les tubes sont vortexés et placés à 4°C pendant 2h sous agitation. Après incubation, les tubes sont centrifugés 2 fois à 1500 tours par minutes pendant 5 minutes. A la fin de la deuxième centrifugation, nous avons prélevé 500 µl de surnageant. La radioactivité contenue sur les cellules et dans les surnageants est mesurée avec un compteur gamma (Automatic Gamma counter 1470 Wizard). Les cpm obtenus dans les surnageants sont soustraient aux cpm des tubes contenant les cellules. L'essai est toujours réalisé en triple.

Pour chaque concentration, la liaison spécifique du [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab est calculée en soustrayant les coups obtenus pour la liaison non spécifique à ceux correspondant à la liaison totale. L'interprétation a été faite en utilisant le logiciel GraphPad®.

## B. RÉSULTATS

### 1) Mise au point de la méthode de marquage

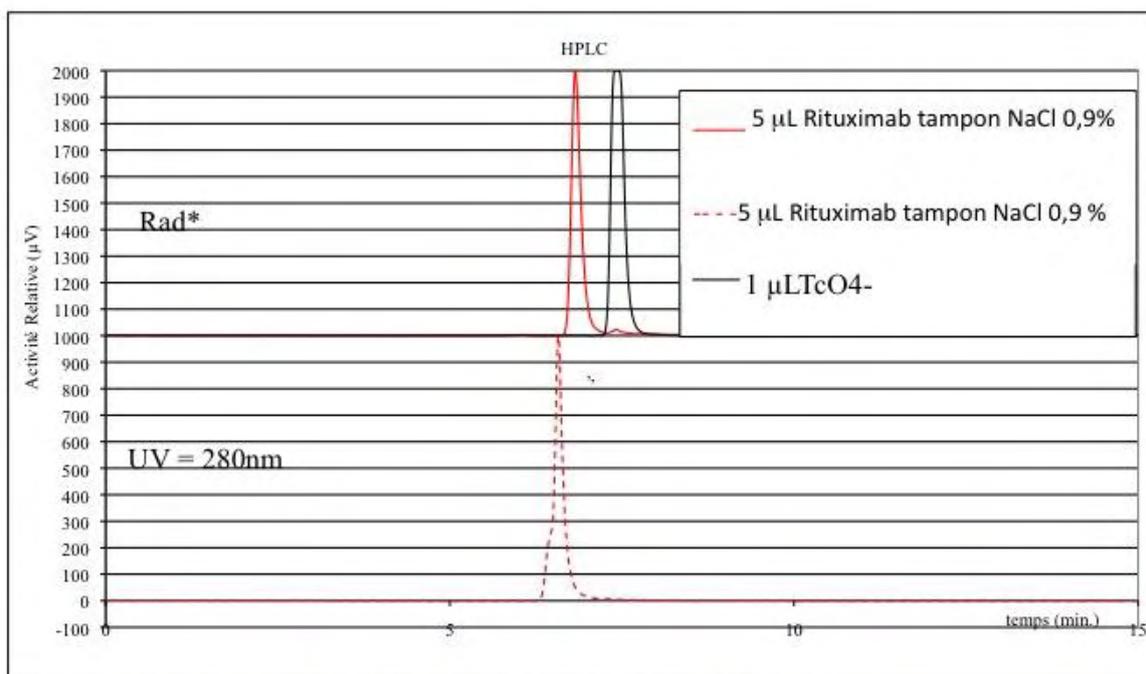
#### (a) Evaluation de la pureté radiochimique (PRC) du $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab

Pour évaluer la PRC du  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab, nous avons effectué une CLHP d'exclusion. La Figure 40 montre 2 séries de chromatogrammes.

Celui situé en haut (Rad) et en trait plein correspond aux pics enregistrés par le détecteur de radioactivité. Le chromatogramme rouge correspond au  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab dont le temps de rétention ( $T_r$ ) est  $T_r = 6,9$  min. Le chromatogramme noir correspond au pertechnétate ( $\text{TcO}_4^-$ ). Son  $T_r = 7,4$  minutes.

Sans purification, la PRC du Rituximab marqué est supérieure à 95%.

Le chromatogramme situé en bas (UV) correspond au pic enregistré par le détecteur UV réglé à 280 nm. Cette longueur d'onde permet de détecter des acides aminés aromatiques présents dans la protéine et donc de déterminer le temps de rétention du Rituximab. On constate que le pic radioactif rouge se superpose au pic UV correspondant en pointillé. Ceci prouve que le pic enregistré en radioactivité est du Rituximab marqué avec le cœur technétié tricarbonyle.

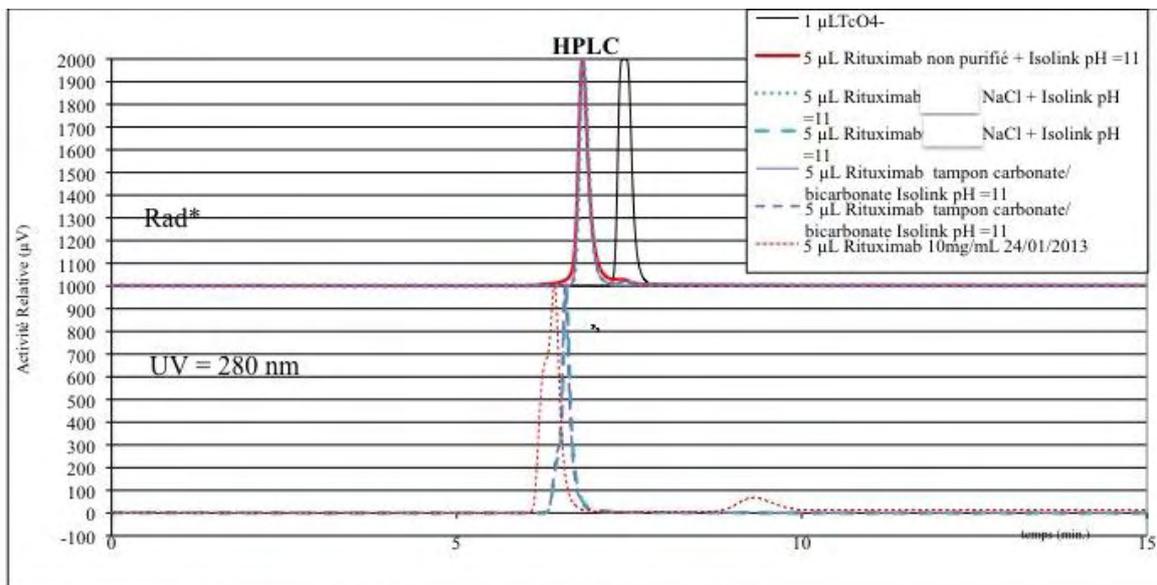


**Figure 40 :** Evaluation de la Pureté Radiochimique (PRC) du  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab  
Les chromatogrammes du  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab sont obtenus grâce à un détecteur de rayonnement gamma (Rad\*) en trait plein et un détecteur UV en pointillé.  
La détermination de la PRC s'est effectuée avec une CLHP d'exclusion. La phase mobile est composée de NaCl 0,9 %. Le débit est de 2mL/min.  
Le temps de rétention ( $T_r$ ) du pertechnétate (noir) est  $T_r = 7,4$  minutes.  
Le temps de rétention ( $T_r$ ) du  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab (rouge) est  $T_r = 6,9$  min.  
La PRC de l'anticorps marqué est de 95%

**(b) Evaluation de l'influence du milieu sur le marquage du Rituximab**

Nous avons voulu comparer 3 solutions milieux pour le Rituximab marqué : le milieu initial dans lequel se trouve habituellement le Rituximab, le NaCl 0,9% et le tampon carbonate/bicarbonate 200M. Pour cela, nous avons évalué la PRC de l'anticorps avec l'Isolink® par CHLP d'exclusion dans les 3 conditions.

Les chromatogrammes obtenus avec le détecteur de rayonnement gamma (trait plein) se superposent alors que pour l'UV (trait en pointillé), nous retrouvons une superposition des pics pour le milieu NaCl 0,9% et le tampon carbonate/bicarbonate 200M. Le pic UV correspondant au Rituximab dans sa solution initiale se superpose au 2 autres mais il possède un deuxième pic en UV montrant la présence d'une impureté plus légère correspondant probablement à un excipient qui diminue donc le rendement de marquage et la PRC de l'anticorps marqué(Figure 41).



**Figure 41:** Evaluation de l'influence de la solution du Rituximab sur le marquage

Chromatogrammes du  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab avec 3 tampons différents : milieu initial (rouge), milieu NaCl 0,9% (bleu) et tampon carbonate/bicarbonate (violet) par le détecteur de rayonnement (Rad\*) en trait plein et UV (UV 280nm) en pointillé.

La PRC a été obtenue par CLHP d'exclusion. La phase mobile est composée de NaCl 0,9 %. Le débit est de 2mL/min. Avec le détecteur de rayonnement gamma, les 3 pics de  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab se superposent mais il apparaît la présence de technétium pour le rituximab marqué dans son tampon d'origine (rouge).

Les chromatogrammes obtenus en UV, montrent une superposition des pics du rituximab en solution dans le NaCl 0,9% et dans le tampon carbonate/bicarbonate alors que le rituximab dans sa solution initiale montre la présence d'une impureté vers 9 minutes.

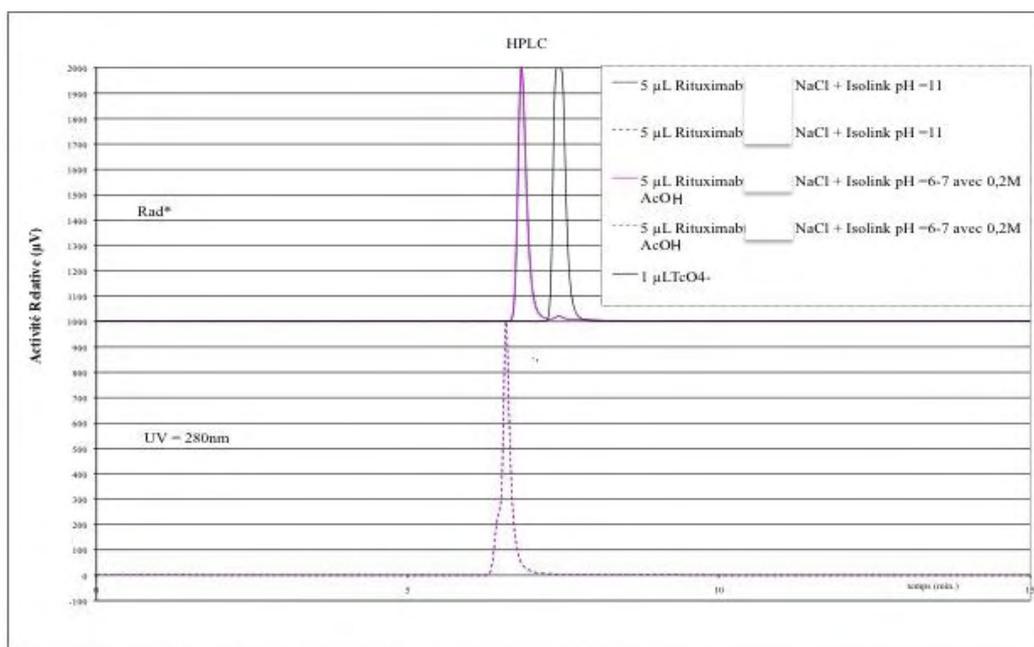
Les meilleurs milieux semblent être le milieu NaCl 0,9% et carbonate/bicarbonate 200M. Ce dernier n'a pas été retenu comme milieu pour le marquage car il possède un pH > 11 qui peut endommager la structure de l'anticorps.

Le milieu de marquage pour le Rituximab sera donc le NaCl 0,9%.

Nous allons maintenant regarder quel est le pH optimal de l'isolink® pour le marquage.

**(c) Evaluation de l'influence du pH de l'isolink® sur le marquage du Rituximab**

Nous avons voulu regarder si le pH avait une influence sur le marquage de l'anticorps. Pour cela, nous avons évalué la PRC de l'anticorps marqué avec l'isolink® non neutralisée (pH =11) ou neutralisée avec de l'acide acétique 0,2M (pH = 7). Ceci a été effectué par CHLP (Figure 42)



**Figure 42 :** Evaluation du pH de l'isolink sur le marquage du Rituximab

Les chromatogrammes du  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab sont obtenus grâce à un détecteur de rayonnement gamma (Rad\*) en trait plein et un détecteur UV en pointillé. Les chromatogrammes de couleur bleu (plein et pointillé) correspondent à de l'isolink® non neutralisé (pH = 11) et les chromatogrammes de couleur violet (plein et pointillé) correspondent à de l'isolink® neutralisé avec de l'acide acétique 0,2M (pH = 6)

La détermination de la PRC s'est effectuée avec une CLHP d'exclusion. La phase mobile est composée de NaCl 0,9 %. Le débit est de 2mL/min.

Les chromatogrammes se superposent quelque soit le pH.

Nous constatons que la PRC est la même quelque soit le pH de la solution milieu. Le pH de la solution d'isolink® n'influence donc pas le marquage de l'anticorps.

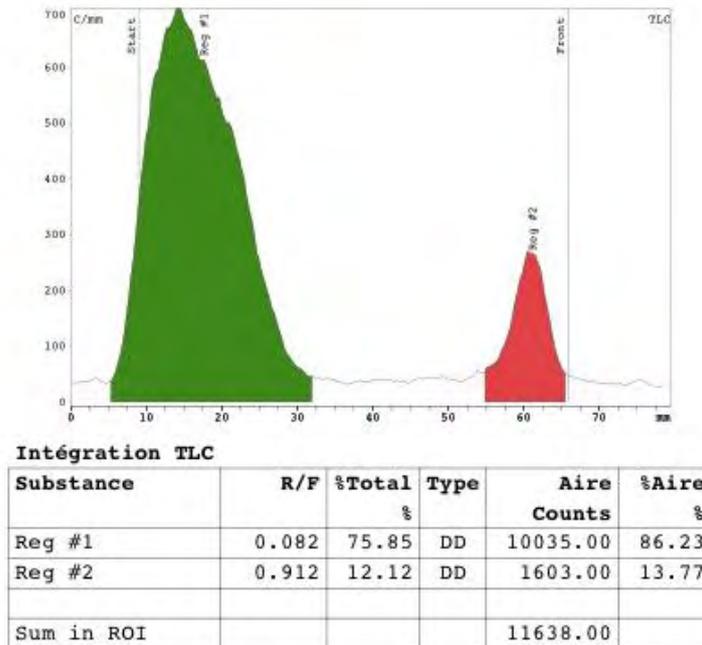
Nous avons donc choisi de conserver le milieu NaCl 0,9% avec l'isolink® milieu à pH= 7 pour maintenir l'anticorps dans un milieu qui ne déstabilise pas sa structure.

## 2) Etudes in vitro

### (a) Stabilité de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab dans le plasma

Après incubation dans le plasma humain frais à 37°C, la stabilité de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab est d'environ 88% à 4h, et 86% à 20h (vert sur la Figure 43), les 14% d'impuretés étant du pertéchnétate libre (rouge sur la Figure 43).

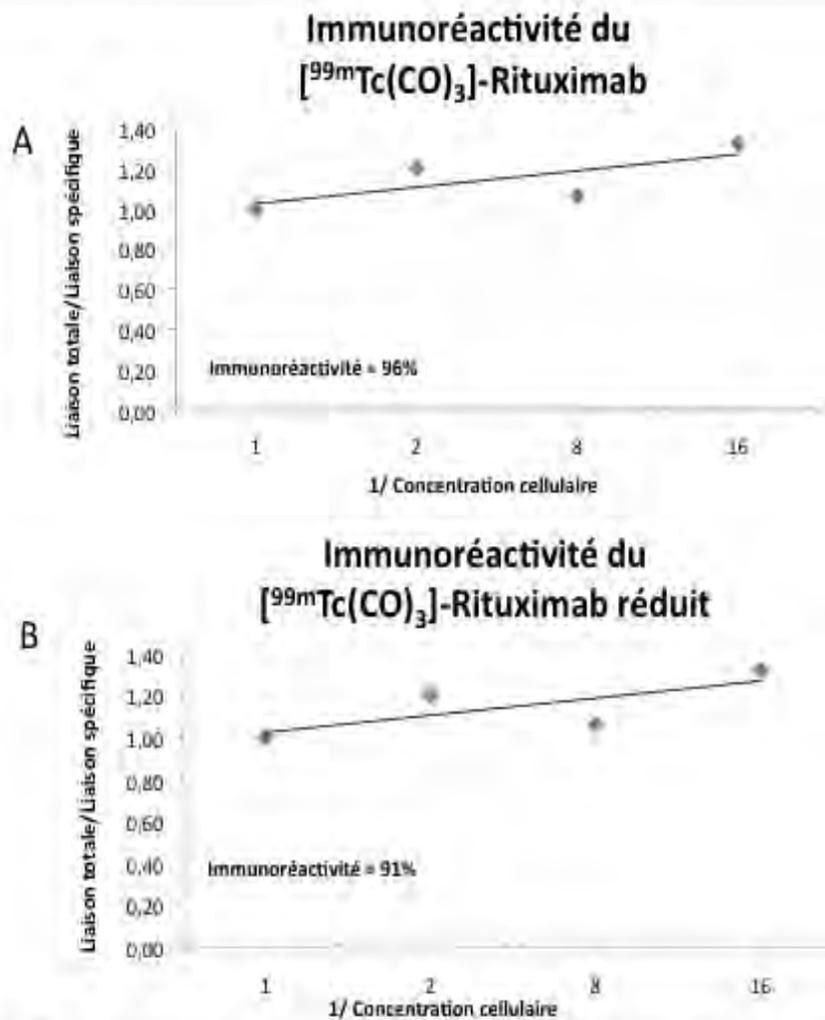
Ce résultat est plus faible qu'avec le [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab réduit avec le 2-ME qui est proche de 90%.



**Figure 43 :** Stabilité du [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab dans le plasma à 20h  
La CCM réalisée sur une plaque d'Alugram® à 20h montre une PRC = 86%  
Les 14% d'impuretés correspondent à du pertéchnétate de sodium

### (b) Immunoréactivité de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab

L'immunoréactivité du [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab est représentée selon la méthode de Lineweaver-Burk. Les expériences sont réalisées avec des cellules lymphomateuses RAJI exprimant le CD20. La droite de régression linéaire montre une fraction immunoréactive proche de 96% plus élevée que le Rituximab réduit avec le 2-ME (Figure 44).



**Figure 44** : Immunoréactivité du  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab sur les cellules DAUDI (CD 20 +)

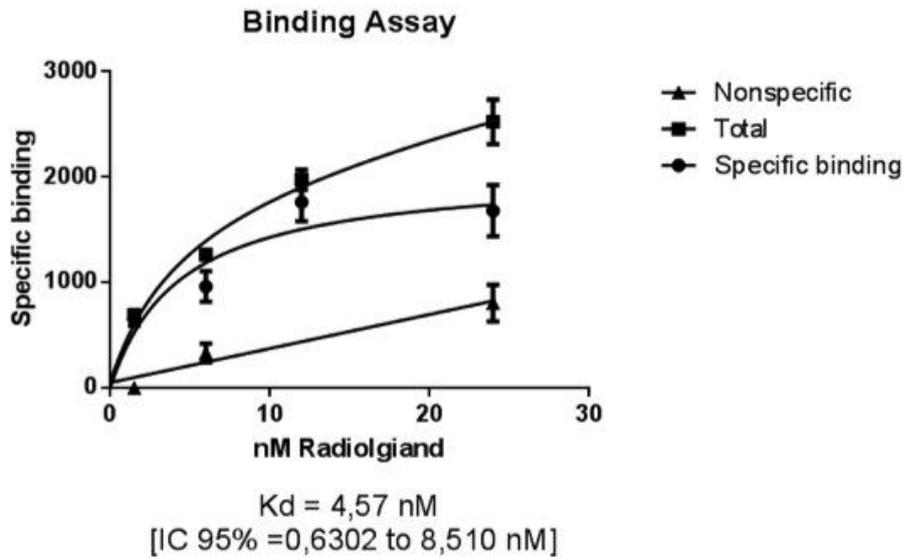
La fraction immunoréactive a été déterminée par une extrapolation linéaire de la concentration cellulaire. L'inverse de l'ordonnée à l'origine donne la fraction immunoréactive.

A. Rituximab non réduit : Immunoréactivité est proche de 96 %.

B. Rituximab réduit avec le 2-ME : Immunoréactivité est proche de 91 %.

### (c) Binding du $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab

La liaison de  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab est réalisée avec des cellules lymphomateuses RAJI exprimant le CD20 (Figure 45). Le  $K_d$  est de 4,57 nM proche de celui du Rituximab qui est de 5,2 nM [34].

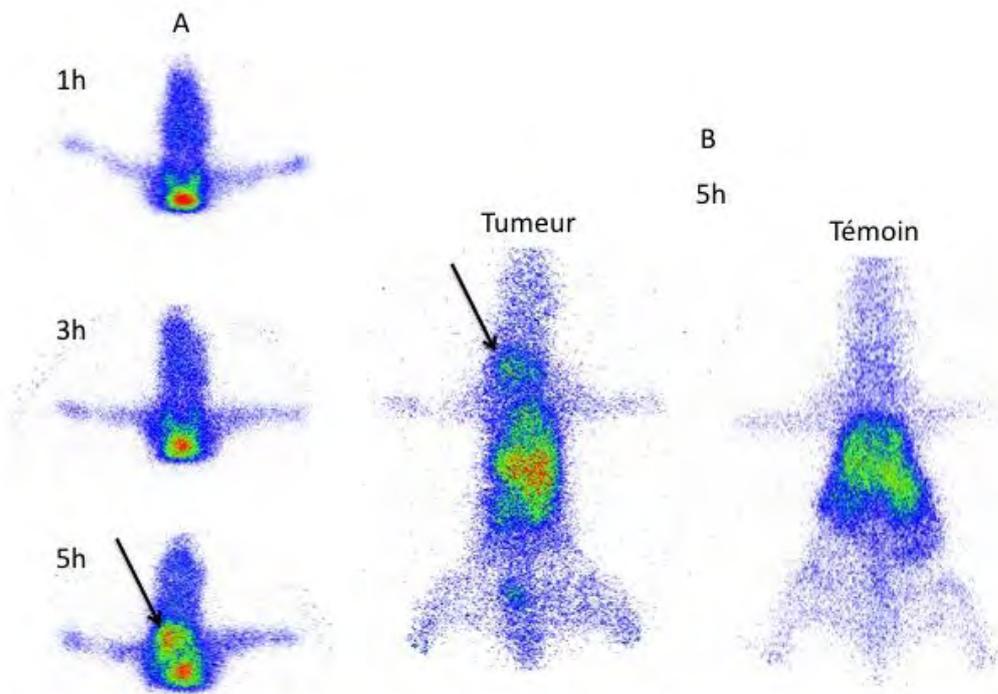


**Figure 45:** Essai de binding du  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab sur les cellules DAUDI (CD 20 +)  
Grâce au logiciel GraphPad prism la courbe de saturation obtenue avec 4 concentrations croissantes de radioligand donne un Kd = 4,57nM

### 3) Etudes d'imagerie

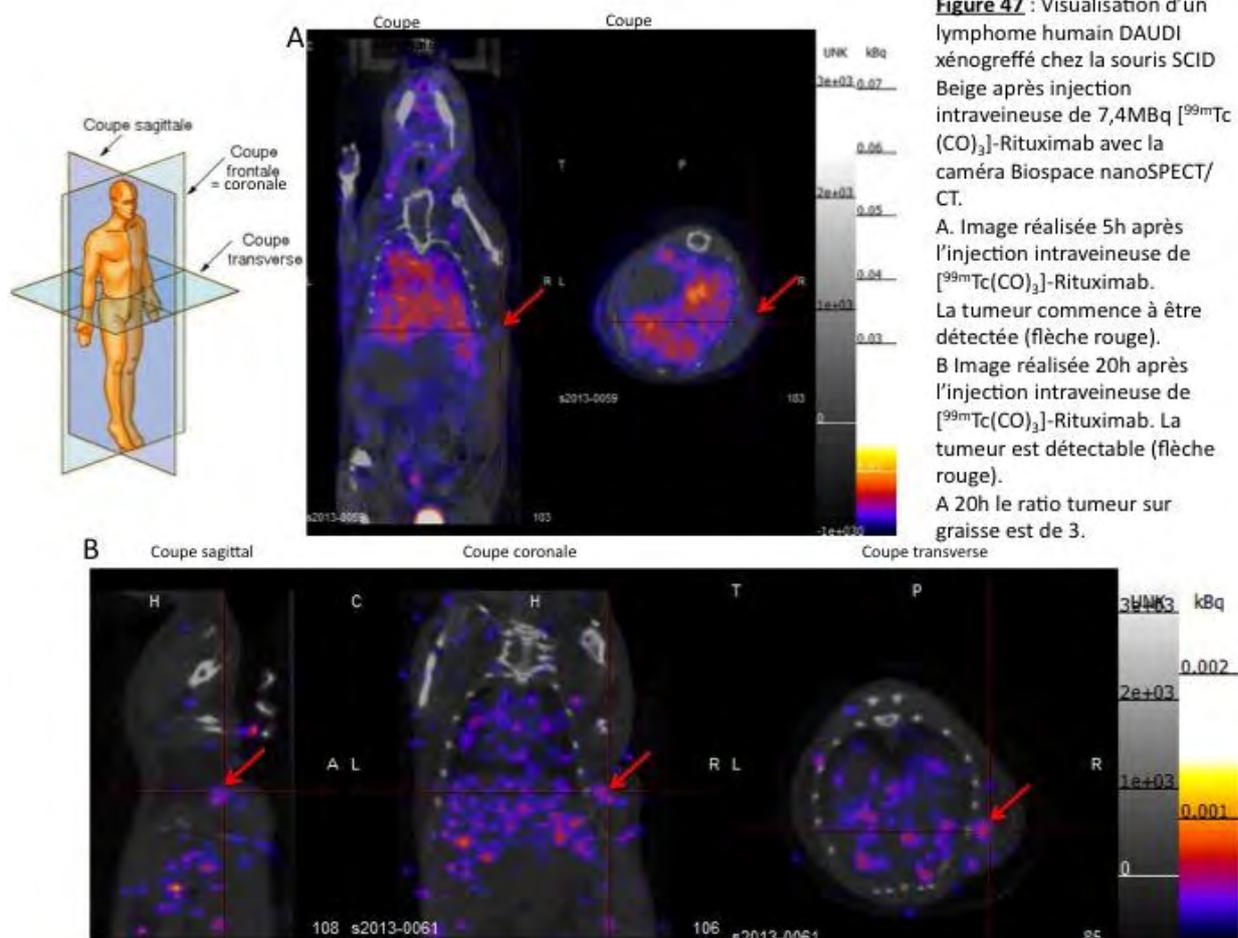
#### (a) Biodistribution du $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab

Après injection intraveineuse du  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab chez des souris xénotreffées en sous-cutané d'un lymphome DAUDI ou RAJI, l'anticorps s'accumule dans la tumeur. La détection apparaît à partir de 5h après l'injection (n = 3) (Figure 46).



**Figure 46** : Visualisation d'un lymphome humain DAUDI xéno greffé chez la souris SCID Beige  
 Injection intraveineuse de 10,73MBq  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab. Acquisitions réalisées avec la caméra  $\gamma$ -imager Biospace .  
 A. Détection de la tumeur par le  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab qui s'accumule au niveau du lymphome à partir de 5h (flèche noire) .  
 B Comparaison de la biodistribution du  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Rituximab 5h après l'injection entre une souris porteuse d'un lymphome RAJI (flèche noire, tumeur ) et une souris témoin (dépourvue de tumeur)

Vingt-quatre heures après l'injection, les animaux sont sacrifiés ( $n = 5$ ) et les organes sont comptés. Le radiotracer s'accumule dans les reins, la rate, le foie, les poumons, le cœur, l'intestin, l'estomac, la tumeur ainsi que les muscles et des os (Figure 47). Une activité circulante est également présente.



**Figure 47** : Visualisation d'un lymphome humain DAUDI xéno greffé chez la souris SCID Beige après injection intraveineuse de 7,4MBq [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab avec la caméra Biospace nanoSPECT/CT.  
 A. Image réalisée 5h après l'injection intraveineuse de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab. La tumeur commence à être détectée (flèche rouge).  
 B Image réalisée 20h après l'injection intraveineuse de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab. La tumeur est détectable (flèche rouge).  
 A 20h le ratio tumeur sur graisse est de 3.

Le ratio tumeur / muscle est de 2,75 (p = 0,005). (Tableau 4)

Organes	% DI/g d'organes	Déviati on standard
Sang	13,465	1,491
Reins	7,722	0,095
Rate	7,211	5,401
Foie	6,370	1,829
Poumons	5,617	2,276
Coeur	2,549	0,095
Intestin	2,519	0,266
Estomac	2,134	1,213
Tumeur	1,670	0,563
Muscle + os	0,616	0,077

**Tableau 4**: Biodistribution du [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab chez la souris SCID-Beige xéno greffée avec un lymphome humain RAJI. Les animaux sont sacrifiés 24 après l'injection intraveineuse du radio traceur (activité moyenne = 8,14MBq ; n =5 souris). La biodistribution du radiotraceur montre une accumulation au niveau des reins, de la rate, du foie, des poumons, du cœur, de l'intestin, de l'estomac de la tumeur ainsi que des muscles et des os. Une activité circulante est également présente. Le rapport tumeur/muscle = 2,75

**(b) Autoradiographie :**

Malgré une résolution de 25 μm et une bonne sensibilité, les images obtenues ne nous ont pas permis d'exploiter les résultats. En effet, l'activité contenue dans la tumeur 24h après l'injection de [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Rituximab (4 périodes de l'isotope) était trop faible pour la détection.

En conclusion de ce premier travail, nous avons développé une technique simple et rapide de marquage du Rituximab, anticorps spécifique des cellules CD 20+ présentes dans la majorité des lymphomes. Les études réalisées *in vitro* et *in vivo* montrent que le radiotracer est stable dans le plasma avec 86% d'anticorps marqué à 20h, un Kd de l'ordre de 4,6 nM qui est proche de celui du Rituximab (Kd = 5,2 nM) [34], une meilleure immunoréactivité que le Rituximab réduit par le 2-ME.

La méthode choisie ici est donc une méthode douce et rapide. En effet, la seule étape de réduction rencontrée est celle du pertechnétate lorsque l'on ajoute l'Isolink®. Ce dernier possédant un réducteur, le boranocarbonate, une réduction de l'anticorps est envisageable au moment de la réaction de chélation. Cependant, la demie vie courte du réducteur limite celle-ci. Ainsi, nous avons mis au point une méthode de marquage du Rituximab sans étape de réduction spécifique de l'anticorps par le 2-ME ou l'UV [36-38, 43].

Le radiotracer se distribue dans les reins, la rate, le foie, les poumons, le cœur, l'intestin, l'estomac, la tumeur ainsi que les muscles et des os. La tumeur est détectable 5h après l'injection mais un meilleur ratio est observé 24 heures après l'injection en raison de la clairance sanguine de l'anticorps radiomarqué au cours du temps. Cependant celle-ci est lente et la cinétique pour atteindre la tumeur semble l'être aussi. Ainsi, l'utilisation d'un isotope radioactif de période plus longue pourrait être intéressante pour évaluer la fixation dans le temps du Rituximab.

Grâce à sa sensibilité la TEP peut être une alternative intéressante à l'étude de la biodistribution des anticorps en les marquant avec des isotopes dont la période, pour certains sensiblement plus longue que celle du Technétium 99m, peut être en accord avec la distribution de la molécule. C'est le cas du Zirconium 89 qui est un bon candidat pour réaliser de l'immunoTEP.

J'ai eu l'opportunité de suivre une formation en Décembre 2012 sur le marquage des anticorps au <sup>89</sup>Zr. Elle a eu lieu à l'Université VU d'Amsterdam par la société CYCLOTRON<sup>VU</sup>. Je vais donc présenter les principes du marquage des peptides au <sup>89</sup>Zr.

## **II. Marquage des anticorps avec le Zirconium 89**

### **A. L'isotope radioactif [44]**

Le zirconium est un métal de transition du groupe IVB du tableau périodique. Le Zirconium 89 ( $^{89}\text{Zr}$ ) se transforme en Yttrium 89 stable par capture électronique (77%) et par émission  $\beta^+$  (23%)[45].

Il possède une période de 3,3 jours. L'énergie du  $\beta^+$  est de 395,5 keV. Après l'émission du  $\beta^+$ , il y a formation de l'Yttrium 89 métastable qui revient à l'état stable en émettant un rayonnement  $\gamma$  de 908.97 keV.

#### **1) Avantages et inconvénients [44].**

##### **(a) Avantages**

Le premier avantage est sa méthode de production. En effet, sa synthèse ne nécessite pas des cibles hautement enrichies comme c'est le cas pour l'iode 124 et l'énergie requise pour sa fabrication est basse. Un autre avantage est sa période. En effet, elle est de 3,3 jours, temps compatible avec une distribution tumorale optimale de l'anticorps. En général, il faut attendre plusieurs jours pour atteindre un bon signal tumeur sur bruit de fond. Enfin, vu qu'il s'agit d'un radiométal, il y a peu de Zirconium 89 qui se détache de l'anticorps après internalisation de la molécule à la différence de l'iode 124 qui peut se retrouver libéré rapidement après protéolyse lysosomiale.

##### **(b) Inconvénients**

Le principal inconvénient est l'énergie du rayonnement  $\gamma$  de 908,97 keV associé au retour à la stabilité qui limite la dose injectée au patient. En effet, lors des essais cliniques réalisés pour une activité injectée de 37 MBq, la dosimétrie du patient s'élève à 20 mSv alors qu'elle est de 6 mSv pour une injection de 300 MBq le [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG. Un autre inconvénient est sa disponibilité. En Europe il est produit à Amsterdam par la société CYCLOTRON<sup>VU</sup>.

#### **2) Production du Zirconium 89 [44]**

Le zirconium 89 peut être produit de 2 manières.

La méthode la plus courante est celle utilisant la réaction nucléaire suivante  $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ . Le faisceau de protons bombardant la cible d'Yttrium montée sur un disque composé d'aluminium et de cuivre possède une énergie de 14 à 14,5 MeV. Le bombardement a lieu pendant 2 à 3h (65-80  $\mu\text{A}$ ) et la séparation de l'isotope a lieu par chromatographie d'échange ou par extraction de solvant.

Après un temps d'irradiation optimal, il peut y avoir moins de 0,2% d'impuretés ( $^{88}\text{Zr}$ )  
La seconde méthode basée sur la réaction nucléaire  $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$  peut être utilisée pour réduire au maximum le taux de  $^{88}\text{Zr}$ . Pour cela, la cible d'Yttrium est irradiée par un faisceau de deutons de 16 MeV et le  $^{89}\text{Zr}$  peut être séparé de la cible par chromatographie d'échange d'ion avec un rendement supérieur à 80%. On peut atteindre un taux de  $^{88}\text{Zr}$  inférieur à 0,008% à la fin du bombardement. Pour augmenter le rendement de la réaction nucléaire, il faut augmenter l'énergie du faisceau incident mais le taux de  $^{88}\text{Zr}$  augmentera aussi.

Actuellement, le plus gros producteur de Zirconium 89 est la société CYCLOTRON<sup>VU</sup>  
Le produit livré possède les caractéristiques suivantes :

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

### **B. Chimie du Zirconium 89 [44, 46, 47].**

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

Ils organisent aussi des stages de formation au radiomarquage des anticorps par le  $^{89}\text{Zr}$ . J'ai pu participer à un de ces stages de formation qui me permettent donc de présenter les 2 principales méthodes de marquage. L'anticorps utilisé pour le marquage a été le Cetuximab car il correspond à celui sur lequel travaille cette équipe. Les techniques acquises pour le marquage de cet anticorps s'appliquent au Rituximab.

La chimie du Zirconium 89 utilise un chélateur qui est la Déféroxamine.

#### **1) La déféroxamine**

La Déféroxamine est commercialisée par Novartis sous le nom de Desferal®.

Ce médicament est indiqué dans le traitement de l'hémochromatose primitive non curable par saignées.

En effet, il s'agit d'un agent chélateur des anions trivalents comme l'ion ferrique

(Fe<sup>3+</sup>) avec une constante de formation de 10<sup>31</sup> et ion aluminium trivalent (Al<sup>3+</sup>) avec une constante de formation de 10<sup>25</sup>.

La chélation s'effectue sur une base molaire : 1 g de déféroxamine peut théoriquement complexer 85 mg de fer ferrique (ou 41 mg d'Al<sup>3+</sup>).

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

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

## **2) Changement de milieu**

Avant de marquer la molécule, il est important de changer le milieu qui peut interférer avec le marquage avec la même méthode que celle utilisée pour le Rituximab. En résumé, il faut utiliser une colonne Séphadex PD 10 lavée avec du NaCl 0,9%. Une fois lavée, 1mL de Cétuximab (5mg) est déposé sur la colonne. L'anticorps est récupéré dans un volume de 1,5 mL. La concentration finale de l'anticorps dans le milieu NaCl 0,9% est de 3,33 mg/mL.

## **3) Modification de l'anticorps**

La modification de l'anticorps peut s'effectuer suivant 2 méthodes qui utilisent la déféroxamine (Df) qui chélate de manière stable le le <sup>89</sup>Zr.

### **(a) Méthode 1[46]**

Cette méthode est en 6 étapes (Figure 48).

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

La deuxième étape consiste à chélater l'ion ferrique (FeCl<sub>3</sub>) sur la N-SucDf, il y a alors formation de la N-sucDf-Fe.

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

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

Pour cela, il faut utiliser 3,17 mg de cetuximab (20 nmol). Le pH de la solution doit être ajusté à 9,5-9,8 avec une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1M. Il faut alors ajouter 66 nmol TFP-*N*-sucDf-Fe (commercialisé). Incuber 30 minutes à température ambiante.

Le rapport chélate:anticorps est 1:1.

Après les 30 minutes, ajouter 50 mL d'acide gentisique (100 mg/mL pH= 4-4,5) et ajuster le pH de la solution à 4,2-4,5 avec de l' $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,25M.

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

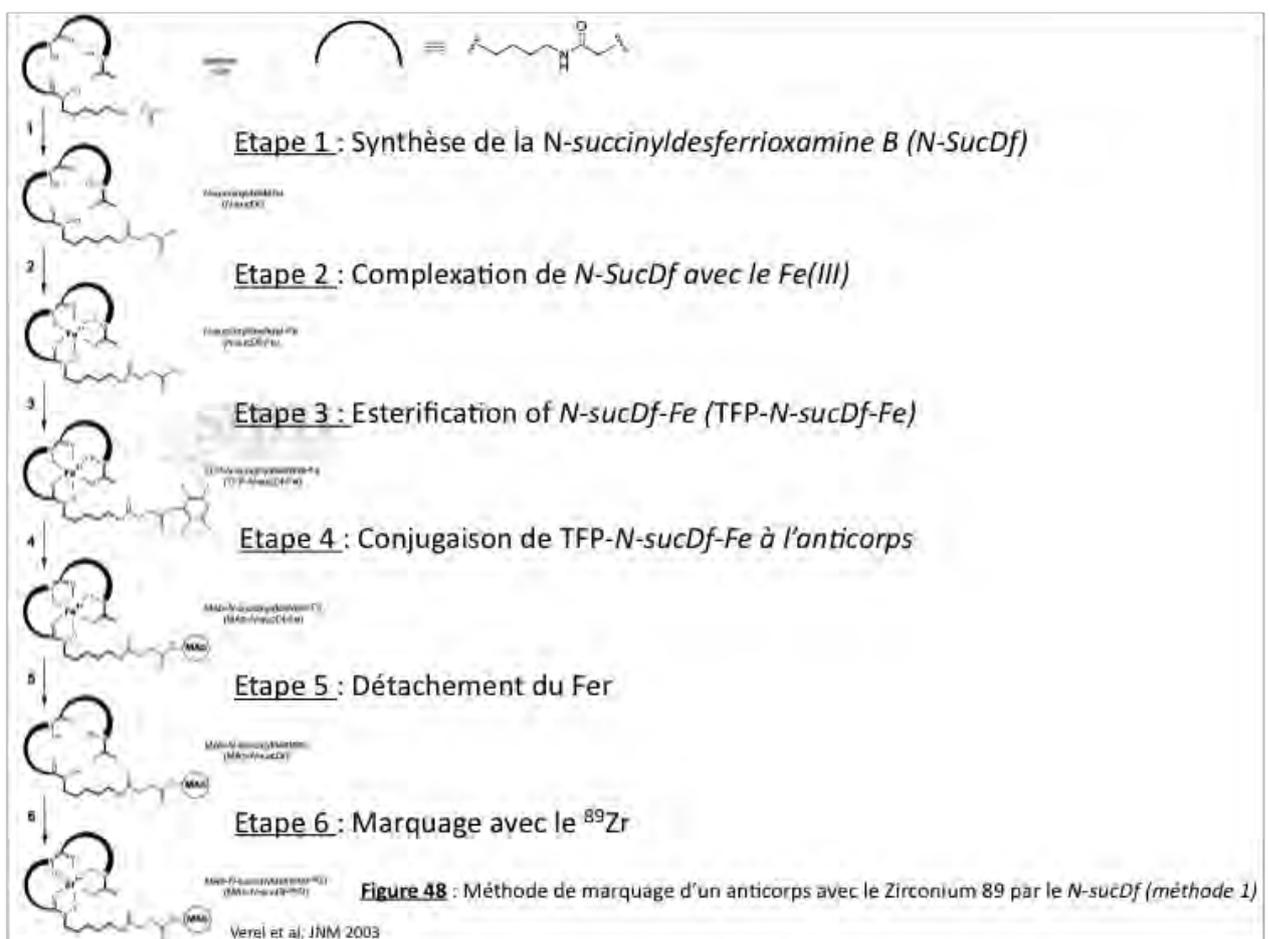
La cinquième étape consiste à déplacer l'ion ferrique. Pour cela, on ajoute 50 mL d'EDTA (25 mg/mL) puis on mélange.

La solution est alors mise sur un thermomixer pendant 30 minutes à 35°C.

A la fin des 30 minutes, la solution est placée sur une colonne sephadex PD 10 préalablement lavée avec de l'acide gentisique (5 mg/mL dans du NaCl 0,9%).

Récupérer la fraction contenant l'anticorps modifié.

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



**(b) Méthode 2[47]**

Il s'agit d'une méthode plus simple en 2 étapes (Figure 49).

Il s'agit d'un nouveau ligand utilisant toujours le Df. Il s'agit du 1-(4-isothiocyanatophenyl)-3-[6,17-dihydroxy-7,10,18,21-tetroxo-27-[N-acetylhydroxyamino)-6,11,17,22-tetraazaheptaecosane]thiourée(p-isothiocyanato-benzyl déferoxamine appelé Df-Bz-NCS commercialisé par Macrocyclics (Dallas, TX).

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

Ajuster le pH de la solution d'anticorps à 8,9-9,1 avec du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1M (maximum 100 mL).

Dissoudre la Df-Bz-NCS dans du DMSO à une concentration comprise entre 2 et 10 mM (1,5 à 3,8 mg/mL). Ajouter 20 mL de cette solution (40 à 200 nmol) à la solution saline contenant 2 à 10 mg anticorps (13,2 à 66nmol). Il faut qu'il y ait trois fois plus de chélateur que d'anticorps (en concentration molaire). Mélanger. La concentration de DMSO doit rester inférieure à 2%.

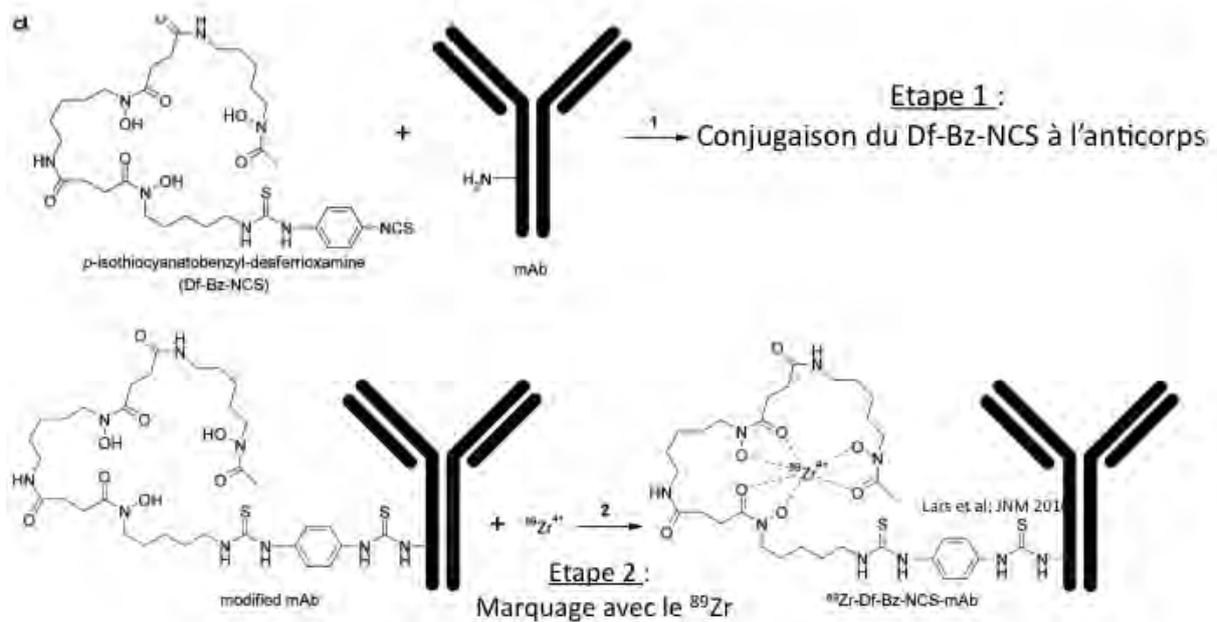
Dans cette situation de couplage, il y a 0,3 à 0,9 Df-Bz-NCS par molécule d'anticorps.

Incuber le mélange sur le thermomixer à 37°C pendant 30 minutes.

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

Collecter la fraction contenant l'anticorps modifié.

La deuxième étape est le marquage de l'anticorps modifié avec le <sup>89</sup>Zr.



**Figure 49 :** Méthode de marquage d'un anticorps avec le Zirconium 89 par le Df-Bz-NCS (méthode 2)

#### 4) Radiomarquage avec le Zirconium 89 :

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

Ajouter 90  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 M et attendre 3 minutes.

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

Ajouter 710  $\mu\text{L}$  de l'anticorps modifié.

La durée de marquage varie entre 30 et 60 minutes.

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

Collecter la fraction contenant l'anticorps modifié.

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

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

## 5) Contrôles qualités :

### (a) CCM

Pour la phase mobile, il s'agit d'un mélange contenant 450 µL d'acide citrique 20 mM avec 50 ml d'acetonitrile.

La bande est une bande Biodex ref 150-771.

L'anticorps reste au dépôt alors que le chélatant et le  $^{89}\text{Zr}$  migrent au front.

### (b) CLHP

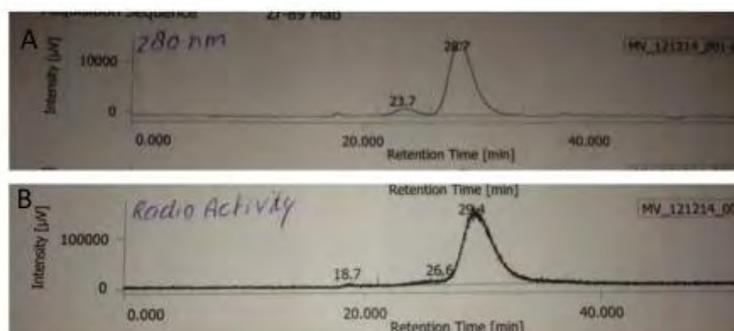
Colonne : colonne d'exclusion Superdex 200 10/300 GL (GE healthcare)

Eluant : milieu phosphate

Débit : 0,5 mL/min

Un run typique donne après injection de 20 µL d'anticorps marqué (Figure 50):

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



UV 280 nm (A) Peak number	Peak Name	Retention time (min)	Area %
1	Impurity	23,742	7,480
2	$^{89}\text{Zr}$ -TFP-N-sucDf-Cetuximab	28,692	92,520

RADIOACTIVITY (B) Peak number	Peak Name	Retention time (min)	Area %
1	Impurity 1	18,692	1,040
2	Impurity 2	26,567	4,195
3	$^{89}\text{Zr}$ -TFP-N-sucDf-Cetuximab	29,450	94,766

**Figure 50 :** Evaluation de la pureté radiochimique (PRC) du  $^{89}\text{Zr}$  N-sucDf-Cetuximab

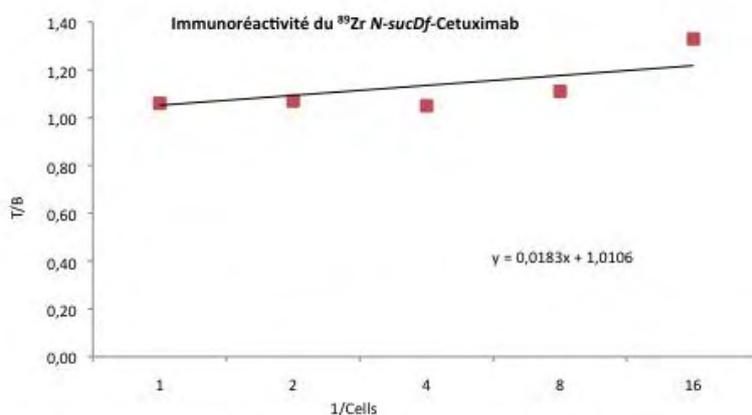
A : A 280 nm : détection de l'anticorps. Tr = 28,7 minutes

B : Radioactivité : détection du  $^{89}\text{Zr}$ . Apparition d'un pic principal dont le Tr = 29,450 minutes correspondant au  $^{89}\text{Zr}$  N-sucDf-Cetuximab PRC = 95%

### (c) Immunoréactivité

La méthode pour réaliser l'expérience d'immunoréactivité est la même que celle décrite pour le [ $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ]-Rituximab.

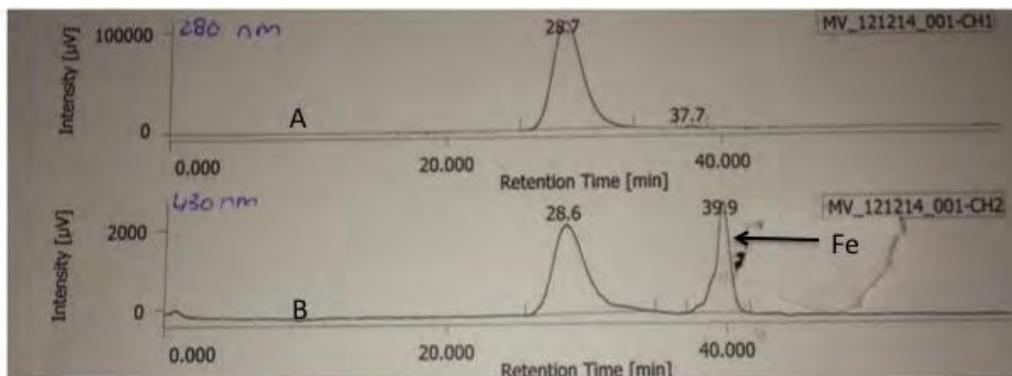
Les cellules utilisées sont des cellules RAMOS. Les concentrations cellulaires sont comprises entre  $2,8 \cdot 10^6$  et  $0,2 \cdot 10^6$  cellules. L'isotope ayant une période longue, l'incubation sous agitation douce à  $4^\circ\text{C}$  se déroule pendant toute une nuit (Figure 51).



**Figure 51** : Immunoréactivité du  $^{89}\text{Zr}$  N-sucDf-Cetuximab sur la lignée cellulaire A 431  
La fraction immunoréactive a été déterminée par une extrapolation linéaire de 5 concentrations cellulaires  
L'inverse de l'ordonnée à l'origine donne la fraction immunoréactive. Elle est proche de 99 %.

## 6) Avantages et inconvénients des méthodes

Le  $^{89}\text{Zr}$ -Df-Bz- NCS-mAb est moins stable dans certaines conditions de conservation que l'anticorps marqué avec la méthode 1. En effet, la présence d'ion chlorure dans le milieu de conservation peut altérer l'intégrité de l'anticorps car les rayonnements émis par le  $^{89}\text{Zr}$  peuvent conduire à la formation du composé  $\text{ClO}^-$  qui peut alors réagir avec le groupement thiol. Ceci peut conduire au clivage des ponts peptidiques. Grâce à la présence de l'ion ferrique, il est possible de savoir exactement combien de molécules chélatrice se sont fixées sur une molécule d'anticorps grâce à la détection UV du Fe à 430nm par CLHP après 20 minutes de complexation (Figure 52).



UV 280 nm (A) Peak number	Peak Name	Retention time (min)	Area %
1	TFP-N-sucDf-Fe Cetuximab	28,708	99,434
2	TFP-N-sucDf-Fe	37,700	0,566

UV 430 nm (B) Peak number	Peak Name	Retention time (min)	Area %
1	TFP-N-sucDf-Fe Cetuximab	28,642	65,773
2	TFP-N-sucDf-Fe	39,875	34,227

**Figure 52:** Evaluation du nombre de TFP-N-sucDf-Fe conjugués au Cetuximab

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

A : A 280 nm : détection de l'anticorps. Tr = 28,7 minutes

B : A 430 nm : détection du Fe. Apparition de 2 pics : un pic dont le Tr = 28,642 minutes correspondant au de TFP-N-sucDf-Fe Cetuximab et un pic dont le Tr = 39,875 minutes correspondant au TFP-N-sucDf-Fe non conjugué.

Lors de la réaction de conjugaison il y a 3 fois plus (rapport molaire) de N-sucDf-Fe que d'anticorps. Ici, le pourcentage de conjugaison sur l'anticorps étant de 66% : il y a 1,8 TFP-N-sucDf-Fe pour une molécule de Cetuximab.

Par contre la méthode 1 est compliquée et longue à effectuer en comparaison à la méthode 2. Les nombreuses étapes rendent difficile le radiomarquage de l'anticorps en condition GMP pour des essais cliniques potentiels. En plus de sa rapidité de marquage, la méthode 2 possède un faible ratio chélatant : anticorps qui peut améliorer l'immunoréactivité.

## 7) Autres méthode de marquage des anticorps

Historiquement, on peut noter la réaction entre N-(S-acetyl)thioacetyl-Df (SATA-Df) et les anticorps conjugués à un groupe maléimide [48, 49]. Cette méthode de marquage a été abandonnée car le radio traceur tumoral était instable dans le plasma humain à 37°C. Ces dernières années sont apparues des ligands Df avec des groupements thiols réactifs [50]. Cela permet de réaliser une conjugaison chimiosélective. Pour cela, les anticorps sont modifiés par addition de résidus de cystéine positionnés de manière spécifique. Le groupe amine du Df peut être acétylé par différents composés chimiques pour obtenir des réactifs réagissant avec un thiol. On retrouve la bromoacetyl- déferoxamine (Df-Bac), la iodoacetyl-déferoxamine (Df-lac) et la maleimidocyclohexyl-déferoxamine (Df-Chx-Mal). Des essais réalisés sur le trastuzumab et les différents thio-trastuzumab conjugués avec un composé Df modifié étaient marqués avec le  $^{89}\text{Zr}$  avec un rendement élevé. Les radios traceurs

testés ont montré un bon rapport tumeur/sang dans le model murin de cancer du sein.

### **8) Utilisation d'antioxydant**

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

Au terme de ce stage, le marquage du Rituximab au  $^{89}\text{Zr}$  nous semble facilement extrapolable à partir de notre expérience sur le Cetuximab. En effet, l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ce stage a testé toute une série d'anticorps dont le Rituximab et le marquage réalisé avec les 2 méthodes décrites est stable. Nous envisageons de le réaliser sur Toulouse lorsque la plateforme d'Exploration Non Invasive ce sera dotée du microTEP.

Maintenant que nous avons vu une des applications diagnostiques possibles dans la détection des tumeurs avec la mise en place d'un radio traceur, nous allons voir les informations que peut apporter l'imagerie nucléaire gamma en pré-thérapeutique.

### **III. Marquage des lymphocytes T gamma delta (LT $\gamma\delta$ )**

#### **A. Le système immunitaire**

Il est constitué de 2 entités, le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif.

##### **1) Système immunitaire inné**

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

Il représente la première barrière de défense contre les agents pathogènes. La réponse immunitaire est caractérisée par sa non-spécificité et sa rapidité de mise en place. N'ayant pas de mémoire immunologique, ces cellules ne nécessitent pas de contact préalable avec le pathogène pour optimiser la réponse. Celle-ci est reproductible quel que soit l'agent agresseur. La manière d'éliminer l'agent pathogène est différente selon le type cellulaire. Les monocytes/macrophages et les polynucléaires ont pour principale fonction, la phagocytose qui consiste en une ingestion du pathogène. La vésicule intracellulaire alors formée est nommée phagosome. Elle va fusionner avec un lysosome dans lequel les enzymes et les radicaux libres de l'oxygène vont tuer et digérer l'intrus. Les cellules NK ont un mécanisme de défense qui se rapproche des lymphocytes T CD8. En effet, elles vont lyser par dégranulation des cellules considérées comme étrangères. Ce mécanisme de lyse est le résultat d'une intégration entre des signaux activateurs et des signaux inhibiteurs présents à la surface membranaires de cellules NK via des récepteurs activateurs comme NKG2D (portant des séquences « ITAM » : immunoreceptor tyrosine-based activation motif) ou inhibiteurs (portant des séquences « ITIM » : immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). Lorsqu'un NK rencontre une cellule, la lyse de cette dernière ne se produira que si les signaux d'activation sont supérieurs aux signaux d'inhibition. Le principal signal inhibiteur est produit par les récepteurs KIR (acronyme de l'anglais « Killer cell Ig-like Receptor »), portés par le NK, qui reconnaît les molécules du CMH de classe I. L'activation d'un seul type de récepteur KIR suffit à empêcher l'activation du NK alors qu'il faut toujours plusieurs signaux activateurs pour provoquer la dégranulation du NK et la mort de la cellule. Les signaux d'activation sont variés, et comportent notamment des protéines produites par des cellules stressées, comme lors d'une infection. Ce

système d'équilibre dynamique activation/inhibition permet en pratique aux cellules NK de lyser toutes les cellules dépourvues des molécules du CMH de classe I ou les cellules infectées par des virus ou des bactéries tout en épargnant les cellules saines.

## 2) **Système immunitaire adaptatif**

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

### (a) **L'immunité humorale**

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

### (b) **L'immunité cellulaire**

Elle est assurée par les LT. Il y a les lymphocytes TCD4 et TCD8. Le TCR de ces lymphocytes est formé pour la majorité (90 %) de chaînes protéiques  $\alpha$  et  $\beta$ . On parle de  $LT_{\alpha\beta}$ . Outre ce  $TCR_{\alpha\beta}$ , impliqué dans la reconnaissance de l'Ag, la transduction du signal d'activation après la liaison TCR/Ag ne peut pas se faire sans la présence de la molécule de surface CD3 présente à la surface de tous les LT. Pour pouvoir s'activer ces cellules nécessitent la présentation de l'Ag par un composant du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe-I pour les  $LT_{CD8}$  et de classe-II pour les  $LT_{CD4}$ . La réponse est donc caractérisée par une restriction par le CMH. On trouve 2 catégories de LT :

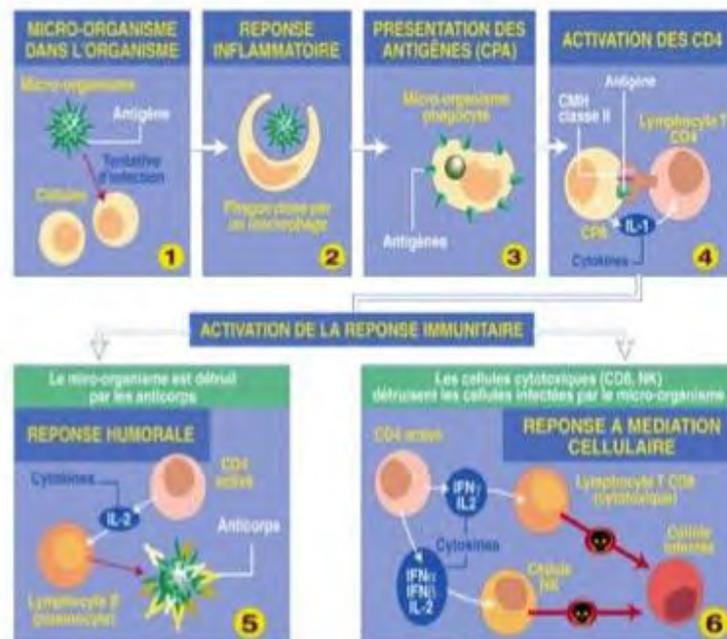
- **Les  $LT_{CD4}$**  (=Lymphocytes T Helper (LTh))

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

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

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

Ce sont les cellules effectrices de l'immunité cellulaire. Elles assurent l'élimination directe des cellules anormales ou infectées. Les antigènes viraux sont reconnus par le TCR de la surface des lymphocytes T CD8+. Après activation de ces CTL, la lyse exige le contact entre cellules cibles et cellules immunitaires à travers une synapse immunologique au sein de laquelle il va y avoir sécrétion par le CTL d'une part de perforine et de granzyme (sérines protéases) qui provoquent la nécrose de la cellule infectée, et d'autre part de Fas-ligand qui en se liant au Fas de la cellule infectée y déclenche un signal de mort programmée (apoptose) (Figure 53).



**Figure 53** : Réponse immunitaire innée et adaptative

## **B. Lymphocytes T $\gamma\delta$ : frontière entre l'immunité innée et immunité adaptative**

En plus des LT $\alpha\beta$ , il existe une autre population de lymphocytes T appelés les lymphocytes T $\gamma\delta$ . Ils ne représentent que 1 à 5 % des lymphocytes circulants. Ils présentent un intérêt grandissant dans le domaine de l'oncologie car ils se situent à la frontière entre l'immunité innée et l'immunité acquise. Ils possèdent donc les armes de chacun des 2 systèmes pour pouvoir lutter contre la prolifération des cellules tumorales [51, 52].

### **1) Marqueurs de l'immunité innée**

Les LT $\gamma\delta$  possèdent le récepteur NKG2D habituellement exprimé par les cellules NK. Il s'agit d'un récepteur activateur capable de reconnaître MICA, MICB et les ULBP1-4, molécules habituellement présentes à la surface des cellules stressées ou infectées par des virus. Les principaux autres récepteurs retrouvés à la surface des lymphocytes T $\gamma\delta$  sont les récepteurs inhibiteurs (KIR) comme NKG2A ou C qui ont pour fonction d'inhiber l'activation des LT $\gamma\delta$  à l'égard des cellules cibles exprimant les molécules du soi, c'est-à-dire les molécules du CMH. L'intégration des signaux activateurs et inhibiteurs reçus par ces deux types de récepteurs conditionnent la réponse cellulaire.

### **2) Marqueurs de l'immunité adaptative : TCR $\gamma\delta$**

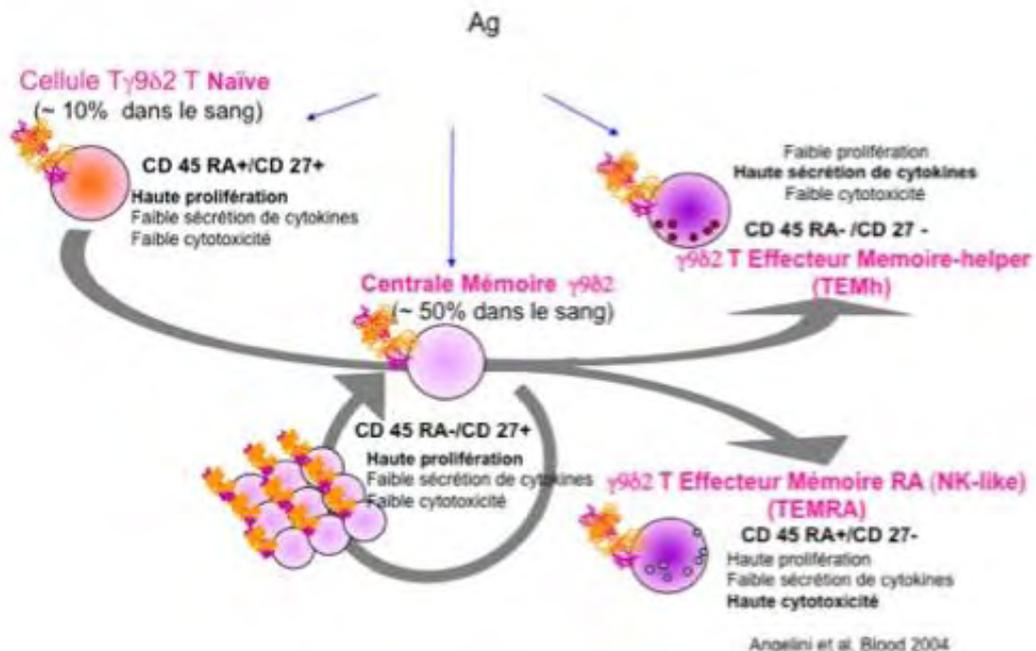
Au niveau des récepteurs de l'immunité acquise, les LT $\gamma\delta$  possèdent un TCR formé de deux chaînes réarrangées, une chaîne  $\gamma$  et une chaîne  $\delta$ . La reconnaissance de l'Ag par ce récepteur les distingue fondamentalement des LT classiques. En effet, les LT $\alpha\beta$  reconnaissent un Ag peptidique, si et seulement si, il est présenté à la surface d'une molécule du CMH. C'est ce que l'on appelle l'allorestriction. Cette reconnaissance est facilitée par la présence du module de signalisation membranaire CD3 et de l'un des deux marqueurs membranaires exclusif, CD4 ou CD8. En ce qui concerne les LT $\gamma\delta$  ils expriment le CD3 mais ils sont dépourvus la plupart du temps des marqueurs CD4 et CD8. La reconnaissance antigénique s'effectue directement par le TCR sans présentation par une molécule du CMH de classe I ou II. Elle n'est donc pas allorestreinte.

Ils se caractérisent par leur oligoclonalité. En effet, à la différence du TCR des  $LT\alpha\beta$  qui possèdent une grande diversité de reconnaissance antigénique, les  $LT\gamma\delta$  ont un TCR invariant c'est-à-dire que celui-ci est spécifique du tissu dans lequel il se trouve. Ainsi chez l'homme, les  $LT\gamma\delta$  à TCR de type  $V\delta_1$  sont plutôt localisés au niveau des muqueuses alors que la principale population, qui se trouve dans la circulation sanguine possède un TCR de type  $\gamma 9\delta 2$ . Ces derniers jouent un rôle important dans la surveillance antitumorale. Nous ne nous intéresserons qu'à cette sous population dans ce travail. Nous les noterons  $LT\gamma\delta$  pour plus de facilité [53].

### 3) Phénotype

Le CD45RA et le CD27 sont les marqueurs membranaires caractéristiques de l'état de maturation des  $LT\gamma\delta$ . Grâce à eux, on distingue 4 degrés de maturation cellulaire (Figure 54) :

- Les  $LT\gamma\delta$  naïfs ( $CD27^+CD45RA^+$ )
- Les  $LT\gamma\delta$  mémoire ( $CD27^+CD45RA^-$ ).
- Cellules effectrices T Effector Memory Cells helper (TEMh) ( $CD27^-/CD45RA^-$ )
- Cellules effectrices T Effector Memory Cells RA (TEMRA) ( $CD27^-/CD45RA^+$ ).



**Figure 54:** Maturation des  $LT\gamma\delta$

Angelini et al, Blood 2004

#### 4) **Fonctions**

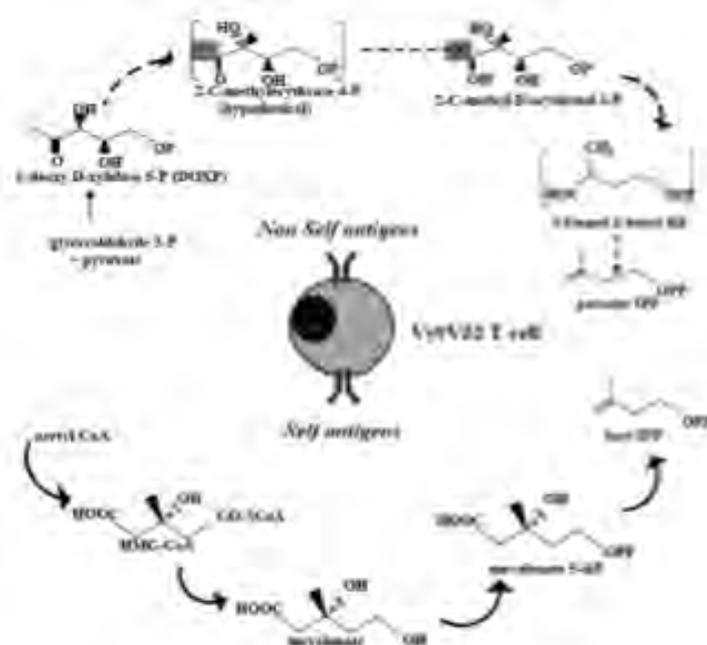
Alors que les TEMh vont avoir pour fonction principale de synthétiser des cytokines proinflammatoires telles que l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$ , les TEMRA présentent les propriétés de cytotoxicité. Les principaux mécanismes de lyse cellulaire mises en œuvre par les LT $\gamma\delta$  sont la voie de la perforine et de la granzyme, la voie TRAIL ou Fas/ Fas ligand [54].

#### 5) **Antigène reconnu**

Une autre différence fondamentale repose sur la nature de l'Ag reconnu par les LT $\gamma\delta$ . Celui-ci n'est pas de nature protéique comme pour les lymphocytes T $\alpha\beta$  classiques. Il s'agit de petites molécules phosphorylées appelés phosphoantigènes (PAg). Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique.[55, 56]

##### ***(a) Phosphoantigènes d'origine naturelle***

Il s'agit de métabolites de la voie de synthèse du cholestérol. La molécule la plus puissante dans l'activation des LT $\gamma\delta$  est le HDMAPP (4-hydroxy-3-diméthylallyl pyrophosphate), issue de la voie de biosynthèse bactérienne du cholestérol. Il est caractérisé par sa concentration efficace 50 (EC<sub>50</sub>), paramètre de quantification expérimentale de l'effet in vitro des médicaments (EC<sub>50</sub>=0,2nM). Chez les eucaryotes le PAg naturel est l'isopentenyl pyrophosphate (IPP), intermédiaire de synthèse du cholestérol dans la voie du mévalonate (MVA). Il est moins actif que l'HDMAPP (EC<sub>50</sub>=3 $\mu$ M). Ces petites molécules sont donc reconnues à la surface des cellules infectées ou cancéreuses par le TCR $\gamma\delta$ , sans restriction par le CMH. [54] (Figure 55).



**Figure 55** : Synthèse des phosphoantigènes :

Cellule eucaryotes : voie du mévalonate pour la synthèse du PAG endogène : IPP

Bactéries : voie du 1-deoxy-D-xylulose-5phosphate pour la synthèse du PAG bactérien : HDMAPP

### **(b) Phosphoantigène d'origine synthétique**

#### **(1er) Phosphostim® :**

Il s'agit de bromohydrine pyrophosphate. C'est un composé synthétique élaboré à partir des PAG naturel. Son efficacité est meilleure que l'IPP physiologique ( $EC_{50}=15nM$ ). Cette molécule est aujourd'hui utilisée dans de nombreux essais cliniques dans le but de provoquer l'activation *in vivo* ou *in vitro* des  $LT\gamma\delta$  [57] [55, 58]

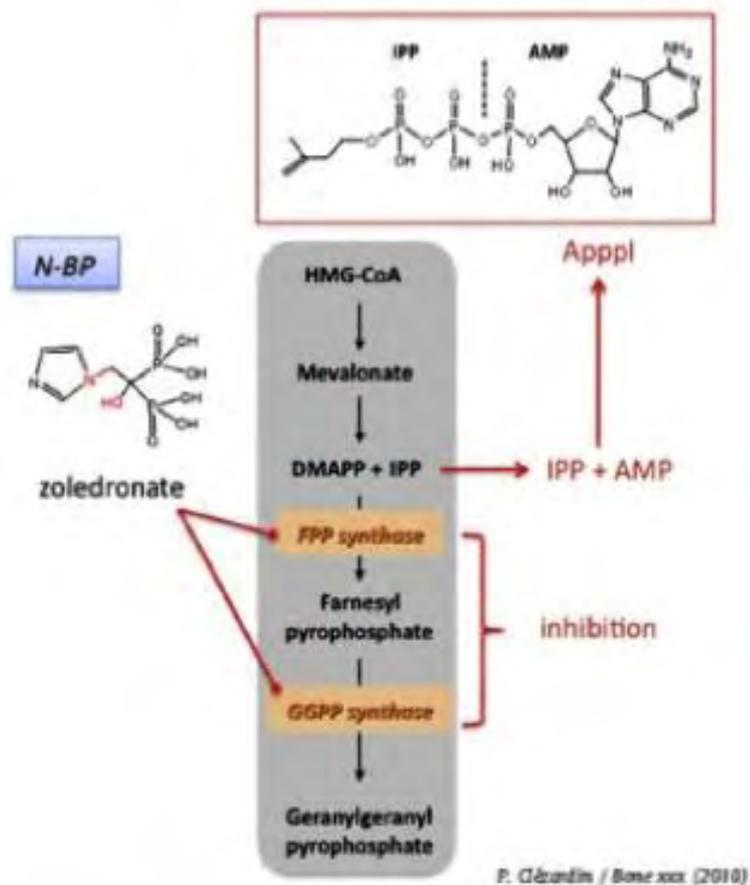
#### **(2e) Les Biphosphonates (BPs)**

Les BPs sont des médicaments indiqués dans le traitement des complications osseuses chez des patients atteints de pathologie maligne à un stade avancé avec atteinte osseuse comme le myélome multiple. Ils possèdent comme les PAG naturels un groupement pyrophosphate. Leur action stimulatrice sur les  $LT\gamma\delta$  a été découverte fortuitement à la suite de syndromes grippaux observés chez des patients traités par du pamidonate. Des prélèvements sanguins ont alors montré une élévation du nombre de  $LT\gamma\delta$ . Ce sont les BPs de dernière génération (N-BPs) qui sont actifs sur les  $LT\gamma\delta$ . En effet, ils sont capables d'inhiber simultanément 2 enzymes de la voie du MVA, la farnésyl pyrophosphate synthase (FFPS) et la geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPPS), 2 enzymes situées en aval de l'IPP dans la voie

du MVA et responsables de son métabolisme. Leur inhibition provoque une accumulation de l'IPP qui va pouvoir activer les  $LT\gamma\delta$ .

Les cellules sont capables de mettre en réserve l'IPP synthétiser en excès sous forme d'un analogue de l'ATP (=Apppl). Ce dernier est peu actif sur les  $LT\gamma\delta$ . Il sera retransformé sous l'action d'une nucléotide pyrophosphatase qui libère l'IPP et de l'AMP.[59-61]

Actuellement le N-BPs le plus étudié est le zoledronate, N-BP de 3<sup>e</sup> génération, qui s'est révélé le plus actif sur la stimulation des  $LT\gamma\delta$  ( $EC_{50}=3nM$ ) (Figure 56)



**Figure 56** : Mécanisme d'activation des  $LT\gamma\delta$  par les biphosphonates

### **C. Intérêt thérapeutique des $LT\gamma\delta$**

Parmi l'arsenal thérapeutique disponible actuellement dans le traitement des tumeurs (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie), l'immunothérapie est en plein essor. On peut la diviser en 2 stratégies thérapeutiques. La première et celle utilisant les anticorps monoclonaux, l'autre repose sur l'utilisation des cellules du système immunitaire [62].

## 1) Anticorps monoclonaux

Leur apparition depuis une dizaine d'années a révolutionné la prise en charge de nombreuses tumeurs dont celle des lymphomes non hodgkiniens. Leur activité implique plusieurs mécanismes qui découlent de leur structure. En effet, la partie Fab est capable de reconnaître l'Ag, alors que la partie Fc va activer des effecteurs de cytotoxicité comme le système du complément ou les cellules du système immunitaire inné (polynucléaires, macrophages, NK,  $LT\gamma\delta$ ) via les récepteurs  $Fc\gamma$  de ces cellules, c'est l'ADCC ou cytotoxicité médiée par les anticorps.

## 2) Les cellules du système immunitaire

Il est reconnu depuis maintenant longtemps que les cellules du système immunitaire veillent au maintien de l'intégrité de notre organisme en éliminant avec succès les cellules infectées et transformées.

### (a) Les lymphocytes $T\alpha\beta$

Les données de la littérature sont riches sur l'utilisation thérapeutique de ces cellules. En effet, l'activation des LTCD4 et TCD8 permet d'une part de stimuler un grand nombre de cellules du système immunitaire via la sécrétion d'interleukine et/ou d'interféron et d'autre part de lyser les cellules cibles tumorales grâce à l'action des LTD8 [63]. Pourtant, bien que prometteur, les résultats obtenus sont encore décevants [64, 65]. En effet, cette stratégie présente de nombreux désavantages dont le plus important est la restriction de la présentation de l'Ag tumoral par les molécules CMH, molécules régulièrement perdues par les cellules tumorales. De plus, après la reconnaissance, l'activation du lymphocyte nécessite l'interaction de molécules de costimulation entre les 2 cellules (ICAM1 qui permet, grâce à son interaction avec la molécule LFA1 des cellules cibles, de stabiliser la liaison TCR/CMH, la molécule CD28 qui reconnaît CD80/CD86 nécessaire à l'activation des lymphocytes et le CD40L qui interagit avec le CD40 de la cellule présentant l'Ag et qui permet l'activation finale du lymphocyte et la sécrétion de cytokines par ce dernier). Ces molécules peuvent disparaître de la surface des cellules tumorales rendant alors ces dernières résistantes à l'action cytotoxique des LTCD8. En effet, les lymphocytes ayant reconnu l'Ag vont entrer en anergie car ils seront incapables de s'activer [66].

### **(b) Les lymphocytes T $\gamma\delta$**

L'intérêt pour ces cellules dans le domaine de la thérapie cellulaire antitumorale est grandissant depuis ces dernières années [55, 67, 68]. En effet, comme nous l'avons précédemment décrit, elles possèdent à la fois les armes des cellules du système immunitaire inné et celles du système immunitaire adaptatif dans la défense antitumorale [57, 60, 68-70]. Comme les cellules NK, les LT $\gamma\delta$  sont capables de reconnaître et d'éliminer des cellules stressées ayant perdu l'expression des molécules CMH et exprimant MICA/MICB ou ULBP1 comme c'est le cas des cellules tumorales [71]. Mais ils peuvent aussi, reconnaître et éliminer spécifiquement les cellules présentant le PAg via leur TCR $\gamma\delta$  [72].

De nombreux essais cliniques impliquant les LT $\gamma\delta$  sont actuellement en cours aussi bien dans les tumeurs solides (cancers métastatiques du rein[58, 71, 73], cancer de la prostate, cancer du sein[74]) que dans les tumeurs liquides (lymphome folliculaires[65, 75-77], myélome multiple[78]). En effet, il est possible d'amplifier spécifiquement cette population cellulaire grâce à l'adjonction du PAg. Deux voies d'approches sont actuellement étudiées, l'expansion *in vivo* ou l'expansion *in vitro* [79, 80].

#### **(1er) L'expansion in vivo**

Elle consiste à injecter aux patients des N-BP associés à de l'IL2. L'essai le plus connu est celui de Wilhelm *et al* qui a étudié la réponse thérapeutique à l'expansion des LT $\gamma\delta$  par des injections de pamidronate et d'IL2 [65]. Le schéma thérapeutique consistait en une perfusion de pamidronate au 1<sup>er</sup> jour de la cure (90 mg en perfusion de 3h) suivie d'une perfusion d'IL2 pendant 6 jours ( $1.10^6$ UI/m<sup>2</sup>) chez des patients atteints de lymphomes ou de myélome. Les résultats de cet essai ont apporté de précieuses informations sur les effets *in vivo* des LT $\gamma\delta$ .

- Les injections de N-BP et d'IL2 ne provoquent pas de graves effets secondaires.
- A la première cure, un prélèvement sanguin a établi une corrélation entre l'échec d'amplification *in vivo* des LT $\gamma\delta$  et une absence de prolifération *in vitro* des cellules exposées à l'IL2 et au N-BP. Ceci est donc un critère d'éligibilité essentiel à l'inclusion des patients dans ce type de protocole.
- Sur ce critère, les patients inclus ont montré une réponse objective pour 33 % d'entre eux (3/9 patients). Ces réponses ont été attribuées à la stimulation des LT $\gamma\delta$

car pour les 5 patients non répondeurs, 4 n'ont pas montré de prolifération *in vivo* des LT $\gamma\delta$

- Le N-BP stimule spécifiquement les LT $\gamma\delta$
- Les LT $\gamma\delta$  activés par l'IL2 et le N-BP ont un phénotype de cellules effecteurs mémoires car elles sécrètent des cytokines telles que l'IFN $\gamma$  qui possède une activité antitumorale (inhibition de la croissance tumorale, propriété antiangiogéniques, activation des macrophages).

Cette méthode est attractive car elle n'entraîne pas de manipulation de cellules hors du corps humain mais les résultats obtenus montrent qu'il y a un manque ou une inhibition d'amplification des LT $\gamma\delta$ . Ceci peut s'expliquer par la cytopénie provoquée par les chimiothérapies aplasiantes ou par l'amplification d'autres cellules ayant des actions immunosuppressives sur les LT $\gamma\delta$  comme les lymphocytes T régulateurs.

D'autres essais cliniques utilisant le PAg de synthèse ont été réalisés dont un à Toulouse qui a évalué la combinaison thérapeutique du Rituximab avec l'IL2 et le Phospostim® dans le lymphome.

### **(2e) L'expansion *in vitro***

Elle consiste à prélever du sang à des patients et d'isoler les cellules mononuclées périphériques (PBMC). Elles sont mises en culture en présence de PAg (Picostim® ou N-BP) à J0 et de l'IL2 est ajoutée à J0 et tous les 4 jours. Le phénotype et le pourcentage de LT $\gamma\delta$  sont contrôlés régulièrement. Après 14 à 15 jours d'amplification, les lymphocytes sélectionnés sont injectés aux patients en autologue. L'équipe de Yu Abe *et al* [81] a réalisé un essai chez 6 patients atteints de myélome. Les PBMC recueillies sont mises en culture avec 5mM de zolendronate à J1 et 1000UI/mL d'IL2 ajouté tous les 4 jours. Au 14<sup>ème</sup> jour, l'amplification et la pureté de la culture cellulaire ont permis l'injection de 0,3 à 2.10<sup>9</sup> cellules par cure (nombre de cure = 4 à 2 semaines d'intervalle répétées une autre fois si la protéine M reste stable). Les résultats obtenus ont montré :

- Peu d'effets indésirables déclarés.
- Il y a expansion du même phénotype cellulaire que dans l'étude précédente à savoir les cellules effectrices mémoires qui sécrètent des cytokines telles que l'IFN $\gamma$ .
- La lyse cellulaire effectuée par les LT $\gamma\delta$  est médiée par le récepteur NKG2D qui reconnaît ses ligands MICA/MICB ou ULBP1.

- Les  $LT\gamma\delta$  sanguins retrouvés expriment CD6 qui reconnaît à la surface des cellules tumorales CD166. Cette interaction aboutit à l'activation des LT traités par N-BP et IL2.
- Pas de réponses objectives observées.

Ces exemples, bien que prometteurs, montrent la difficulté d'extrapolation entre les données *in vitro* qui montrent d'excellents résultats sur certaines lignées tumorales, les données chez le petit animal xéno greffé similaires à l'*in vitro* et le passage chez l'homme qui ne produit pas les résultats escomptés. L'étude du comportement de ces cellules chez le petit animal paraît donc importante pour évaluer leur cinétique et leur biodistribution vers la tumeur. L'utilisation de l'imagerie trouve là tout son intérêt car en marquant les  $LT\gamma\delta$  avec un isotope radioactif, on sera en mesure d'étudier leur distribution et d'évaluer leur comportement dans l'organisme.

## **D. Etude de la biodistribution cellulaire des $LT\gamma\delta$**

### **1) Matériels et méthodes**

#### **(a) Acquisition des images**

Dans un premier temps, les images ont été réalisées avec une gamma caméra Biospace Gamma-Image ® à l'aide d'un collimateur en énergie <200 keV (collimateur: 20 mm, trou: 1,8 mm, cloisons: 0,2 mm). L'acquisition et l'interprétation des images ont été réalisées avec les logiciels "γ Acquisition» et «Vision γ" (Biospace ®). Les acquisitions ont été réalisées en enregistrant un nombre de coups défini pour tous les animaux.

La résolution intrinsèque de cet appareil dépend du collimateur utilisé. Pour un collimateur standard (pas 1,8 mm, septa de 0,2 mm), la résolution est de 2 mm. Il n'est pas possible de réaliser des images avec un traceur indiié car l'énergie du rayonnement utilisée pour l'étude est celle de 245 keV.

Dans un deuxième temps, les acquisitions ont été réalisées avec la nanoSPECT/ CT Biospace permettant l'utilisation de  $^{99m}\text{Tc}$  et de  $^{111}\text{In}$ . Grâce à ses 4 détecteurs et ses 36 pinholes, la résolution est de 0,9 mm. Il y a possibilité de réaliser un CT pour fusionner les images anatomiques et métaboliques.

**(b) Quantification de la radioactivité sur images de  $\gamma$ caméra**

La quantification du signal de radioactivité sur les images obtenues a été réalisée au moyen du logiciel  $\gamma$  Vision pour la caméra  $\gamma$ -imager ou In vivoscope pour la nanoSPECT/CT. Pour établir une quantification, des ROI ont été réalisées.

**(c) Les souris SCID-Beige**

Les souris ont été abritées dans un établissement exempt d'agents pathogènes et manipulés conformément aux procédures décrites dans la directive 86/609/CEE. Nous avons utilisés des souris mâles SCID-beige âgées de 12 à 16 semaines. Certains animaux ont été injectés par voie sous cutanée avec des cellules RAJI à une concentration de 6 millions dans du PBS, d'autres avec un lymphome DAUDI à une concentration de 10 millions dans du PBS. Les expériences ont débuté quand les tumeurs sont devenues détectables. Pour toutes les expériences, les souris ont été anesthésiées avec un mélange de xylazine / kétamine.

Après l'acquisition des images, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale jusqu'à 48h après l'injection. Les organes ont été pesés et la radioactivité contenue dans chaque organe a été comptée avec un compteur gamma (Automatic Gamma counter 1470 Wizard).

**(d) Marquage des  $LT\gamma\delta$**

**(1er) Culture de  $LT\gamma\delta$**

Les PBMC sont isolés à partir de prélèvements sanguins issus de donneurs sains adultes (Buffy Coat) (collectés au Centre de Transfusion Sanguine du Centre Hospitalo-Universitaire de Purpan) par centrifugation sur gradient de milieu de séparation des lymphocytes. Lors de la centrifugation, les érythrocytes et les granulocytes sédimentent au fond du tube tandis que les cellules mononuclées (PBMC) forment un anneau à l'interface entre le Ficoll et le sérum. Cet anneau est récupéré et les PBMC collectés sont lavés deux fois avec du RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) avant d'être mis en culture à une concentration de 1.5 millions de cellules/mL dans du milieu de culture composé de RPMI additionné de 10 % de sérum de veau foetal (SVF) (Gibco, Invitrogen) supplémenté avec 2mM de L-glutamine, 1mM de sodium pyruvate (Gibco, Invitrogen), 100 U/mL pénicilline (Cambrex), 100 mg/mL streptomycine (Cambrex). Pour permettre d'isoler et

d'amplifier les LT $\gamma\delta$ , on rajoute au milieu de culture 20 nM de PAg et de l'Interleukine 2 (IL2) (12 ng/mL représentant une activité de 300UI/mL). Ils sont placés à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Ils sont dilués et supplémentés en IL2 toutes les 48h. Les cellules sont utilisées quand la culture contient plus de 90% de LT $\gamma\delta$ .

### **(2e) Culture des cellules cancéreuses**

Nous avons utilisé un lymphome de Burkitt RAJI et DAUDI. Les cellules sont cultivées dans un milieu complet, RPMI 1640 supplémenté avec 10% sérum de veau foetal (FCS), de la glutamine (2 mM), la streptomycine (10 pg/mL) et de la pénicilline (200 U/mL) (Invitrogen). Les cellules sont placées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Tous les 4 jours, les cellules sont remises à une concentration de 0,2 millions/mL et la viabilité est mesurée au bleu trypan.

### **(3e) L'isotope radioactif : le <sup>99m</sup>Tc**

Le <sup>99m</sup>Technétium représente l'isotope radioactif de référence en diagnostic car il possède les propriétés de l'isotope idéal décrites plus haut.

Le pertechnétate [<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>] a été élué dans une solution saline à partir d'un générateur de <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc (IBA, Saclay, France).

### **(4e) L'HMPAO**

Le pertechnétate de sodium (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) qui est élué du générateur est hydrophile. Il ne peut donc pas marquer de manière stable la cellule. Le Ceretec® qui est une trousse composé d'HMPAO permet de réduire le <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> (+VII) à un degré d'oxydation +V grâce au chlorure d'étain présent dans la trousse. L'isotope est alors complexé à l'HMPAO. Ce complexe est instable. Il doit être mis en contact avec les cellules dans les 30 minutes suivant sa préparation. Par contre, une fois réduit dans les cellules, le complexe est peu élué. HMPAO est un composé lipophile qui pénètre passivement dans les cellules où il subit une réduction par la glutathion-S-réductase. Le complexe technétié devient alors hydrophile et reste séquestré dans les lymphocytes. Les cellules sont alors radiomarquées.

Lors de la préparation, un contrôle de pureté radiochimique (PRC) est réalisé. Il permet de déterminer le pourcentage de <sup>99m</sup>Tc lié à l'HMPAO. Cette PRC doit être supérieure à 80 %.

### **(5e) L'isotope radioactif : l'indium 111**

L'indium 111 se transforme en cadmium par capture électronique. Le Cadmium étant instable, il émet successivement des photons  $\gamma$  possédant respectivement une énergie de 173 et 247 keV.

Pour le marquage cellulaire, l'indium se trouve sous forme d'une solution d'oxinate d'indium (Covidien). Il forme un complexe saturé avec la 8-hydroxyquinoléine (oxine). Ce complexe étant neutre et liposoluble, il traverse la membrane cellulaire. A l'intérieur de la cellule, l'indium se fixe solidement aux composants du cytoplasme, l'hydroxyquinoléine étant relarguée par la cellule. Il est probable que le mécanisme des cellules marquées avec l'oxinate d'indium-111 implique une réaction d'échange entre le porteur l'hydroxyquinoléine et les composants cellulaires qui chélatent l'indium plus fortement que l'hydroxyquinoléine.

### **(6e) Le marquage cellulaire**

Pour le marquage cellulaire nous nous sommes inspirés de l'expérience clinique du marquage des polynucléaires au  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO et des plaquettes à l'oxinate d'indium 111. Au cours du temps, ces méthodes ont été améliorées (Tableaux 5 et 6). Initialement, le milieu de marquage des polynucléaires au  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO ou des plaquettes à l'oxinate d'indium 111 était constitué de plasma pauvre en plaquette. Ce dernier était utilisé pour maintenir les cellules dans un milieu physiologique. Les rendements de marquage observés étaient mauvais, moins de 50% pour les polynucléaires et moins de 30% pour les plaquettes car dans le plasma, les protéines présentes peuvent être marquées par les 2 radiotraceurs. Nous avons donc décidé de changer le milieu de marquage et de le remplacer par du NaCl 0,9%. Cette modification a amélioré les rendements vu que nous avons dépassé les 50% pour les polynucléaires marqués au  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO et que le rendement de marquage des plaquettes dans ce nouveau milieu s'approchait des 50%. Grâce à cette amélioration et pour ne pas altérer la fonctionnalité des cellules nous avons diminué l'activité de marquage en marquant les polynucléaires avec 740 MBq  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO et les plaquettes avec un activité comprise entre 18,5 MBq à 23 MBq d'oxinate d'indium 111. Ceci a encore amélioré les rendements de marquage. Les méthodes optimisées sont donc celles qui ont été choisies pour ce travail.

Type cellulaire	Traceur	Milieu réactionnel	Activité de marquage	Rendement de marquage	Viabilité cellulaire
1 <sup>ère</sup> méthode : Polynucléaire	<sup>99m</sup> Tc-HMPAO	Plasma pauvre en plaquettes	1110 MBq à 1295MBq	<50% (30 à 50%)	> 98%
2 <sup>ème</sup> méthode : Polynucléaire	<sup>99m</sup> Tc-HMPAO	NaCL 0,9%	1110 MBq à 1295MBq	>50% (50-80%)	> 98%
3 <sup>ème</sup> méthode : Polynucléaire	<sup>99m</sup> Tc-HMPAO	NaCL 0,9%	740 MBq	>70% (70-85%)	> 98%

**Tableau 5 :** Amélioration de la technique de marquage des polynucléaires au <sup>99m</sup>Tc-HMPAO

Type cellulaire	Traceur	Milieu réactionnel	Activité de marquage	Rendement de marquage
1 <sup>ère</sup> méthode : Plaquettes	Oxinate d'indium 111	Plasma pauvre en plaquettes	23 MBq à 33 MBq	<30% (10 à 30%)
2 <sup>ème</sup> méthode : Plaquettes	Oxinate d'indium 111	NaCL 0,9%	23 MBq à 33 MBq	> 30% (30-50%)
3 <sup>ème</sup> méthode : Plaquettes	Oxinate d'indium 111	NaCL 0,9%	18,5 MBq à 23 MBq	> 50 %

**Tableau 6 :** Amélioration de la technique de marquage des plaquettes à l'oxinate d'indium 111

#### Marquage au <sup>99m</sup>Tc-HMPAO suivant la méthode 3 des polynucléaires (Tableau 5)

Cinq à dix millions de LT $\gamma\delta$  sont marqués avec 740 MBq de <sup>99m</sup>Tc-HMPAO (Ceretec®, GE Healthcare) dans du NaCl 0,9%. Après 20 minutes d'incubation sous agitation régulière, les cellules sont lavées avec 10 mL de PBS par centrifugation à 160g pendant 7 minutes. Le culot, dont l'activité est de 518 MBq est repris dans un volume permettant d'obtenir l'activité désirée dans les cellules dans 150  $\mu$ L de PBS (7,65 g de NaCl, 0,724 g de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 0,210 g de NaPO<sub>4</sub> pour 1000 ml d'eau distillée).

La viabilité cellulaire a été déterminée par le test d'exclusion au bleu trypan. Après radiomarquage avec le <sup>99m</sup>Tc-HMPAO la viabilité des lymphocytes était supérieure à

90 % mais inférieure à celle observée avec les polynucléaires. En effet, les lymphocytes sont plus radiosensibles que les polynucléaires.

#### Marquage à l'oxinate d'Indium 111 suivant la méthode 3 des plaquettes (Tableau 6)

Soixante millions de  $LT\gamma\delta$  sont marqués avec 33 MBq d'oxinate d'Indium 111 (Covidien®) dans du NaCl 0,9%. Nous avons utilisé des activités plus importantes car les lymphocytes sont moins fragiles que les plaquettes. Après 20 minutes d'incubation sous agitation régulière, les cellules sont lavées avec 10 mL de PBS par centrifugation à 160g pendant 7 minutes. Le culot, dont l'activité est alors de 16 MBq est repris dans 300  $\mu$ L de PBS puis réparti en 2 seringues (pour 2 animaux). La viabilité cellulaire déterminée au bleu trypan est de l'ordre de 90%.

## **2) Etude de la biodistribution cellulaire des $LT\gamma\delta$**

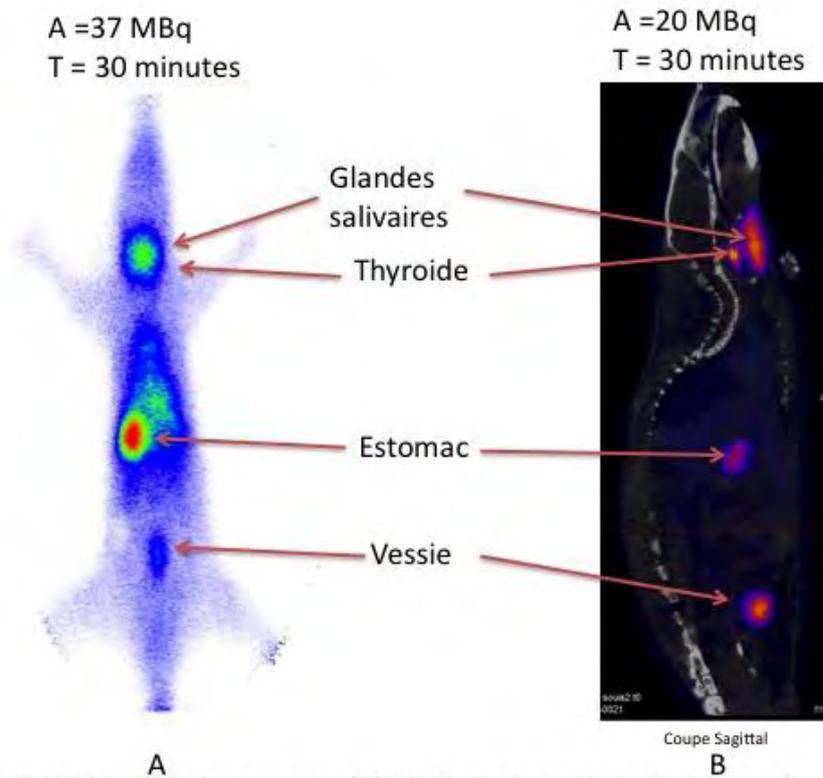
Le but de ce travail est d'évaluer le recrutement tumoral des  $LT\gamma\delta$  humains injectés à des souris immunodéficientes xéno greffées avec un lymphome humain. Pour cela, il est nécessaire de connaître préalablement la distribution naturelle des  $LT\gamma\delta$  humains chez la souris dépourvue de tumeur pour pouvoir la comparer par la suite avec un animal xéno greffé d'une tumeur [82].

### **(a) Etude de la biodistribution dans une souris saine des $LT\gamma\delta$ marqués au $^{99m}Tc$ -HMPAO**

Pour évaluer la biodistribution des lymphocytes  $T\gamma\delta$  humains dans une souris SCID-Beige, nous devons d'abord étudier la distribution physiologique des marqueurs radioactifs utilisés, l'isotope sous sa forme native, le  $^{99m}TcO_4^-$  et le complexe lipophile radiomarqué  $^{99m}Tc$ -HMPAO pour pouvoir apprécier la distribution des cellules marquées.

#### **(1er) Biodistribution du $^{99m}TcO_4^-$**

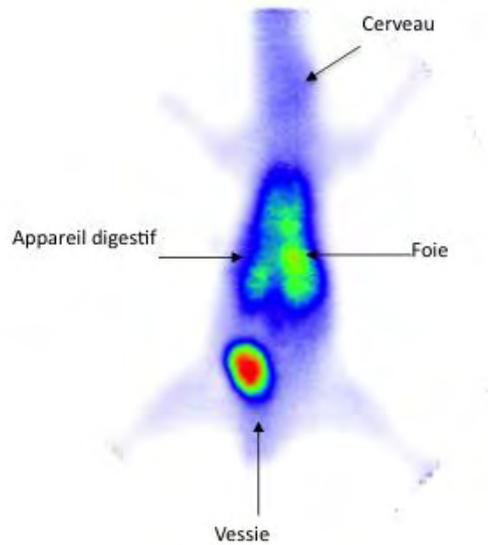
L'injection intraveineuse (IV) par la veine caudale de  $^{99m}TcO_4^-$  montre que le radionucléide se localise comme chez l'homme, dans la thyroïde, les glandes salivaires et l'estomac trente minutes après l'injection (Figure 57).



**Figure 57:** Biodistribution chez une souris SCID Beige du pertechnétate de sodium en utilisant 2  $\gamma$  caméras  
 A : Image obtenue après injection intraveineuse de 37 MBq avec la caméra Biospace  $\gamma$  imager  
 B : Image obtenue après injection intraveineuse de 20 MBq avec la caméra nanoSPECT/CT Biospace

**(2e) Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO**

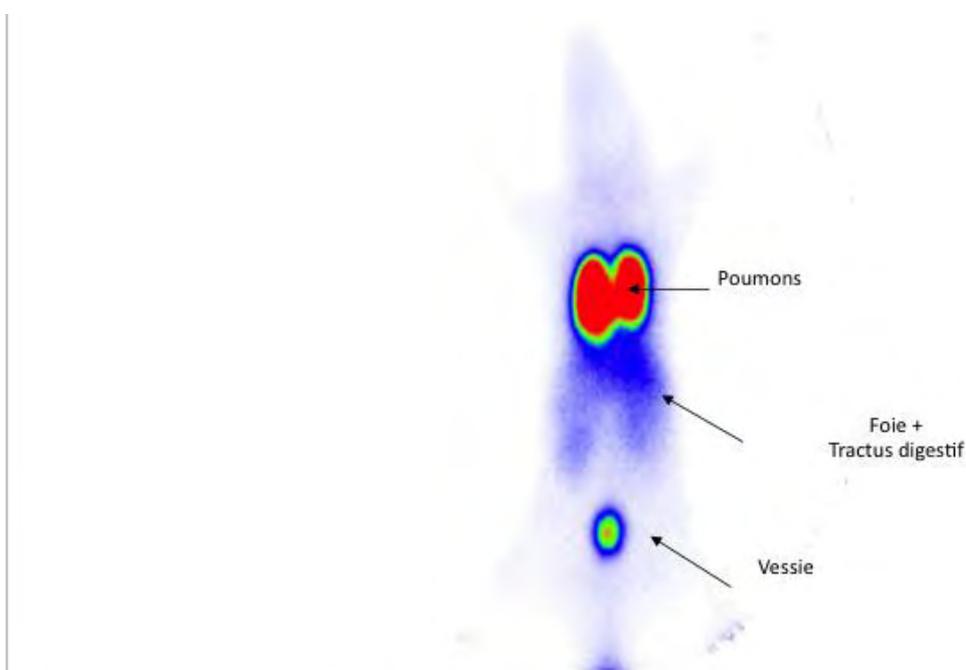
L'injection IV par la veine caudale de  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO montre une distribution du complexe dans le cerveau et le tractus digestif trente minutes après l'injection. Cette répartition tissulaire chez la souris est conforme à la répartition normale chez l'homme (Figure 58).



**Figure 58:** Distribution chez la souris SCID Beige du  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO trente minutes après injection intraveineuse de 37 MBq. Les acquisitions sont réalisées sur la caméra Biospace  $\gamma$ -imager. On observe une distribution digestive et cérébrale. La visualisation de la vessie correspond à l'élimination du technétium.

### (3e) Biodistribution des LT $\gamma\delta$ marqués au $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO

L'injection IV par la veine caudale de 10 millions de LT $\gamma\delta$  radiomarqués au  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO (activité comprise entre 7,4 MBq et 37 MBq) montre une distribution différente de celle observée précédemment. Les cellules s'accumulent immédiatement dans les poumons puis se redistribuent dans le tractus digestif dans les trente minutes qui suivent l'injection (Figure 59). L'utilisation du technétium ne permet des acquisitions de plus de 24h.



**Figure 59** : Biodistribution chez la souris SCID Beige de 10 millions de LT $\gamma\delta$  marqués avec 37 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO trente minutes après leur injection par voie intraveineuse.

Les acquisitions sont réalisées sur la caméra Biospace  $\gamma$ -imager.

On observe une distribution essentiellement pulmonaire. Le foie commence à se visualiser.

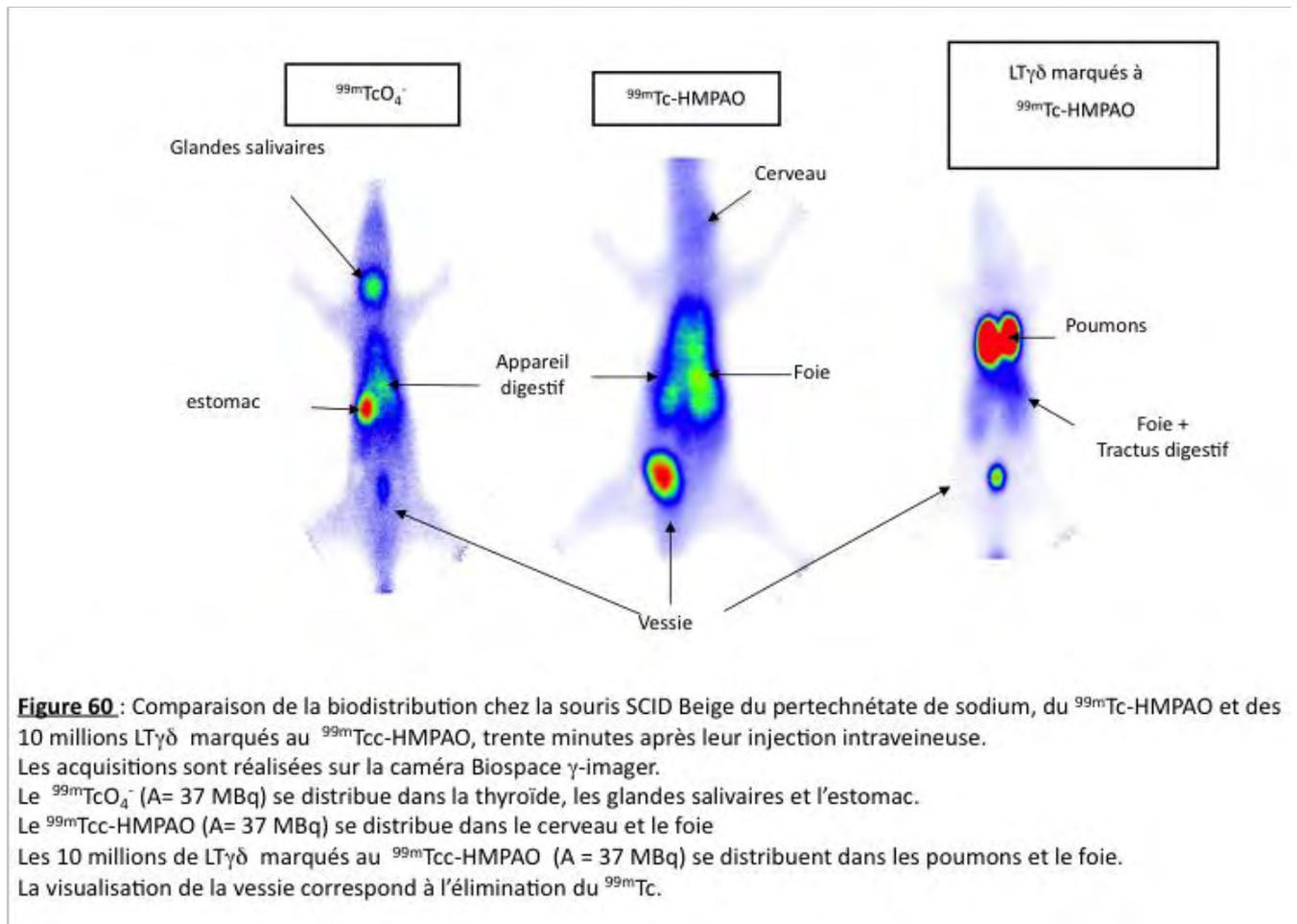
La visualisation de la vessie correspond à l'élimination du technétium élué des cellules

### (4e) Comparaison de la biodistribution des LT $\gamma\delta$ marqués au $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO avec les 2 autres traceurs

A la différence du  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  retrouvé dans l'estomac, le tractus digestif et les glandes salivaires, le  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO se localise dans le cerveau et le tractus digestif. L'injection IV des LT $\gamma\delta$  montre une distribution instantanée au niveau pulmonaire puis

une redistribution digestive. Toutes ces images ont été obtenues 30 minutes après l'injection intraveineuse des radiotraceurs.

Si l'on compare les images obtenues avec les différentes souris, on constate que la vessie apparaît dans tous les cas. Il s'agit de l'élimination urinaire physiologique de l'isotope radioactif (Figure 60).



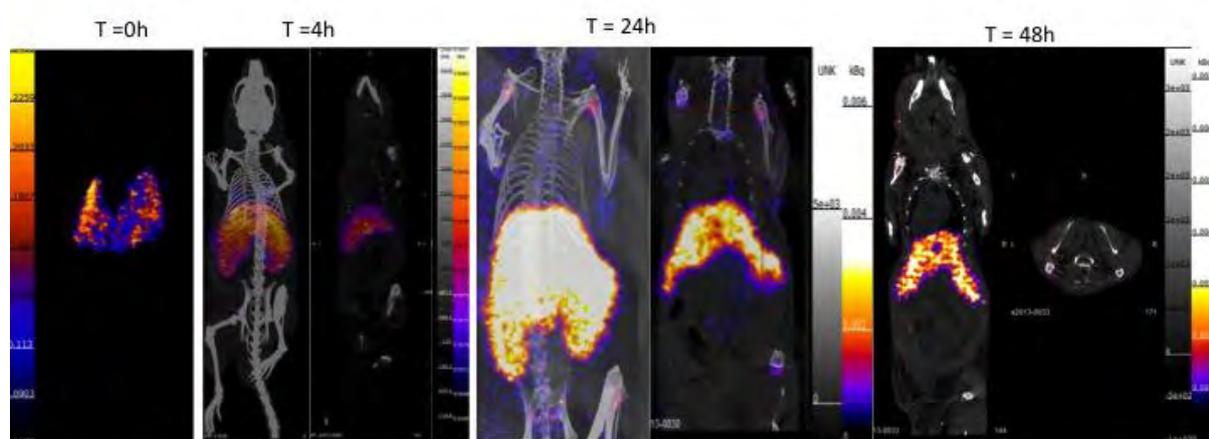
Chacune des distributions étudiées miment celles retrouvées chez l'homme. Ces expériences chez la souris saine ont donc permis de mettre en place un modèle murin de biodistribution de  $\text{LT}\gamma\delta$  humain radiomarqués. Ceci était la première étape indispensable avant l'étude du recrutement tumoral de ces cellules chez une souris greffée d'un lymphome humain.

L'inconvénient du  $^{99m}\text{Tc}$  est sa période de 6h qui ne permet pas de réaliser des images au delà de 24h à la différence de l'Indium 111 qui autorise des acquisitions sur 48 à 72h. La disponibilité récente dans notre groupe de la caméra nanoSPECT/CT permet de réaliser des acquisitions plus résolutes et plus sensibles avec l'indium 111.

**(b) Biodistribution des  $LT\gamma\delta$  marqués l'oxinate d'indium 111**

L'injection IV par la veine caudale de 30 millions de  $LT\gamma\delta$  radiomarqués (activité = 8 MBq) montre une distribution immédiate dans les poumons et une redistribution rapide dans le tractus digestif (dès 4h). L'indium 111 ayant une période de 2,8 j, l'étude de la biodistribution des cellules peut se faire sur 48 à 72h si besoin. Ainsi des acquisitions tardives et le comptage des organes après sacrifice de l'animal à 48h ont permis de montrer que les  $LT\gamma\delta$  s'accumulent préférentiellement dans la rate, les os, le foie, les poumons, l'intestin, le cœur et le sang ce qui n'était pas visible avec le  $^{99m}Tc$ -HMPAO (Figure 61 et 62).

L'indium 111 élué des cellules s'élimine par voie urinaire.

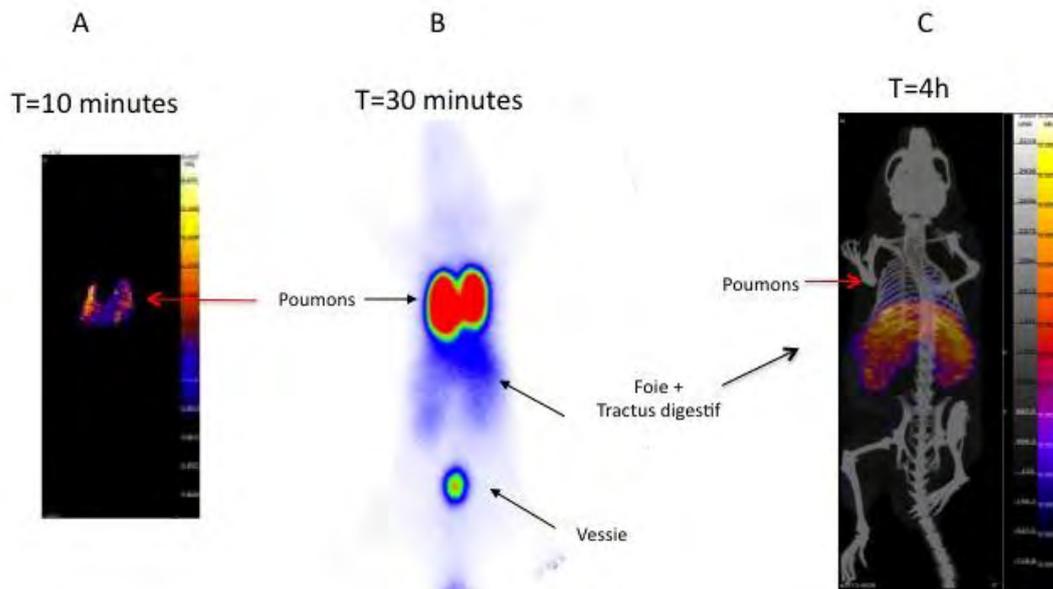


**Figure 61** : Etude de la biodistribution chez la souris SCID Beige des  $LT\gamma\delta$  pendant 48h

Les acquisitions sont réalisées sur la caméra nanoSPECT/CT Biospace.

Injection intraveineuse de 30 millions de cellules marquées avec 8 MBq d'oxinate d'Indium111.

Immédiatement après l'injection, les cellules se localisent dans les poumons puis ils se répartissent rapidement dans le foie et les os.



**Figure 62** : Biodistribution chez la souris SCID Beige des  $LT\gamma\delta$  marqués.

A : Image obtenue immédiatement après l'injection intraveineuse de 30 millions de  $LT\gamma\delta$  marqués avec 8 MBq d'oxinate d'Indium111 avec la caméra nanoSPECT/CT Biospace

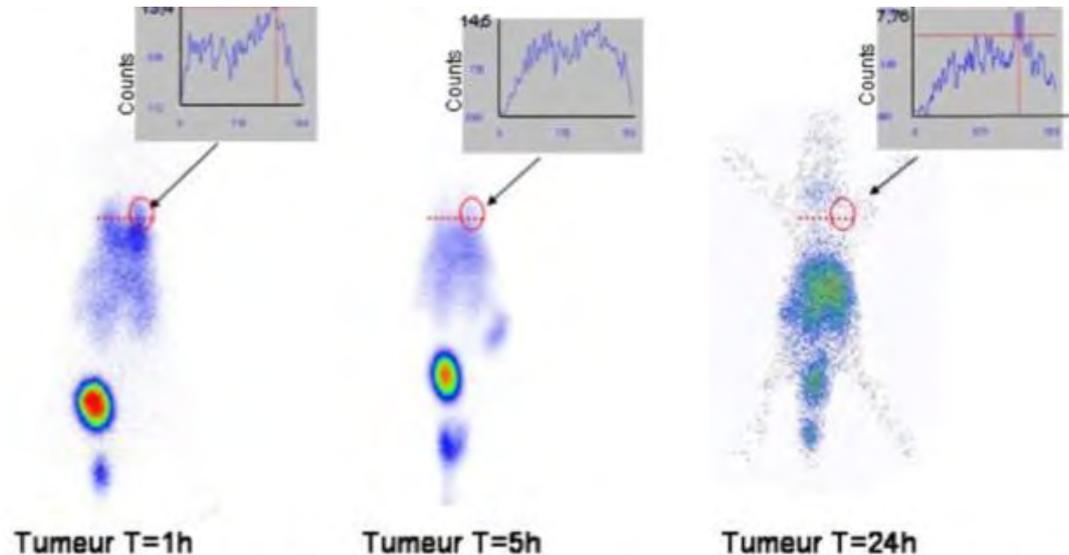
B : Image obtenue 30 minutes après l'injection intraveineuse de 10 millions de  $LT\gamma\delta$  marqués avec 37 MBq de  $^{99m}Tc$ -HMPAO avec la caméra Biospace  $\gamma$  imager

C : Image obtenue 4h après l'injection intraveineuse de 30 millions de  $LT\gamma\delta$  marqués avec 8 MBq d'oxinate d'Indium111 avec la caméra nanoSPECT/CT Biospace

### (c) Souris xéno greffée d'un lymphome RAJI ou DAUDI

#### (1er) Biodistribution des $LT\gamma\delta$ marqués avec le $^{99m}Tc$ -HMPAO chez une souris greffée du lymphome RAJI

L'étude *in vivo* de la distribution cellulaire de 1,5 millions de  $LT\gamma\delta$  marqués avec 37MBq de  $^{99m}Tc$ -HMPAO chez des souris porteuses du lymphome a mis en évidence leur absence de recrutement tumoral lorsque l'étude a été réalisée sur 24h. En effet, la tumeur, visible à l'œil, est représentée par un cercle rouge. Le trait en pointillé permet d'évaluer graphiquement le nombre de coups enregistrés. Ainsi, chaque animal est son propre témoin. Nous pouvons comparer la distribution tumorale des cellules marquées (cercle) à une zone témoin dépourvue (symétrique à gauche). Nous observons donc qu'il n'y a pas d'augmentation significative du nombre de coups au niveau de la tumeur représentée par l'intersection des traits rouges sur le graphe (Figure 63). En effet, le nombre de coups enregistrés est sensiblement égal à celui retrouvé dans l'organisme.



**Figure 63** : Etude de la biodistribution tumorale des  $LT\gamma\delta$  marqués avec du  $^{99m}Tc$ -HMPAO chez la souris SCID Beige xenogreffée d'un lymphome

Les acquisitions sont réalisées sur la caméra Biospace  $\gamma$ -imager.

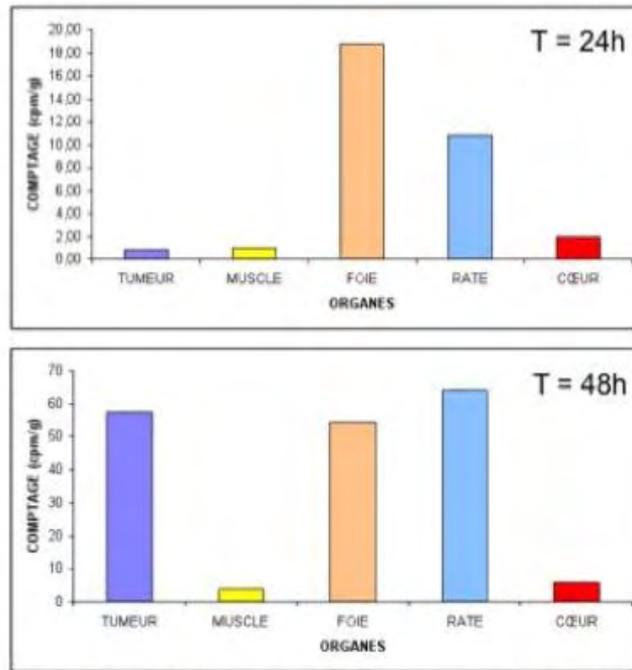
Pour visualiser une éventuel recrutement tumoral, 1,5 million de  $LT\gamma\delta$  marqués avec 3,7 MBq de  $^{99m}Tc$ -HMPAO sont injectés par voie intraveineuse.

Le trait en pointillé rouge permet de quantifier le nombre de coups présents le long de cette ligne. Il est représenté sous forme d'un graphique : les ordonnées étant le nombre de coups et l'abscisse la longueur du trait. L'origine de l'axe des abscisses correspond au côté gauche sans tumeur (témoin négatif) et la fin de l'axe des abscisses correspond au côté droit où se trouve la tumeur (cercle rouge).

A 24h, la localisation tumorale des cellules est indétectable.

Les faibles quantités de radioactivité utilisées et la courte période du  $^{99m}Tc$  ne permettent pas de faire des images au-delà de 24 heures. Pour observer la distribution des  $LT\gamma\delta$  radiomarqués avec le  $^{99m}Tc$ -HMPAO, sur une période plus longue, nous avons sacrifié les animaux et compté, grâce à un compteur  $\gamma$  plus sensible.

Les comptages ont montré une accumulation des cellules à 48 heures. Ces résultats sont encourageants mais ils n'ont été observés que chez un seul animal (Figure 64).



**Figure 64 :** Cinétique de distribution des LT $\gamma\delta$  marqués chez la souris SCID Beige xéno greffée d'un lymphome RAJI

Après injection IV de 7,4 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO LT $\gamma\delta$  (n=1) , les animaux sont sacrifiés à 24h et 48h et les organes sont comptés dans un compteur gamma.

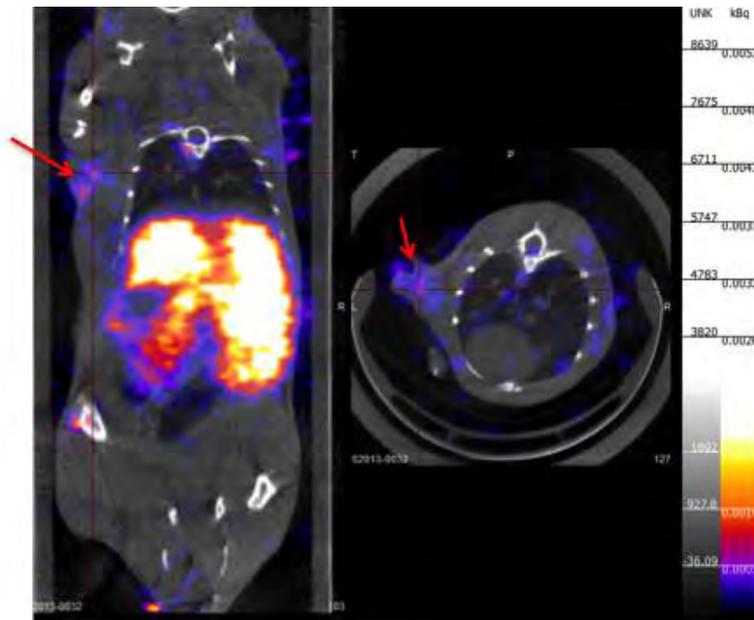
A 24h, les cellules se localisent essentiellement dans le foie et la rate.

A 48h, on les retrouve toujours dans le foie, la rate et la tumeur.

Pour observer ce recrutement tumoral tardif, nous avons donc choisi de marquer les LT $\gamma\delta$  avec de l'oxinate d'indium 111.

**(2e) Biodistribution des LT $\gamma\delta$  marqués avec l'oxinate d'indium 111 chez une souris greffée du lymphome DAUDI**

L'étude *in vivo* de la distribution cellulaire de 30 millions de LT $\gamma\delta$  marqués avec 8 MBq d'oxinate d'indium 111 chez des souris porteuses du lymphome a mis en évidence un faible recrutement tumoral lorsque l'étude a été réalisée sur 48h. En effet sur la figure 65, nous observons un faible signal qui se situe au niveau de la tumeur à sa surface. Après 48h, l'animal a été sacrifié et ces organes ont été comptés au compteur  $\gamma$ . La distribution présentée dans le tableau 7 montre une distribution tumorale importante avec un signal tumeur/muscle = 4 à 48h.



**Figure 65 :** Etude de la biodistribution tumorale des LT $\gamma\delta$  marqués avec 8 MBq d'oxinate d'indium 111 chez la souris SCID Beige xenogreffée d'un lymphome.

Les acquisitions sont réalisées sur la caméra nanoSPECT/CT Biospace

Pour visualiser un éventuel recrutement tumoral, 30 millions de LT $\gamma\delta$  marqués sont injectés par voie rétroorbitale.

Le recrutement tumoral des cellules est visible 48h après l'injection (flèche rouge).

	CPM/gramme d'organe	Rapport au muscle
RATE	22065823	44,9
REINS	15954216	32,4
OS	4169037	8,5
POUMONS	3243028	6,6
FOIE	3079514	6,3
TUMEUR	2127452	4,3
INTESTIN	1868465	3,8
CŒUR	1262656	2,6
SANG	667577	1,4
MUSCLE	491820	

**Tableau 7 :** Biodistribution de LT $\gamma\delta$  48h après l'injection rétroorbitale de 8 MBq de cellules marquées à l'oxinate d'indium 111

Les animaux sont sacrifiés 48h après l'injection des cellules et les organes sont comptés dans un compteur gamma.

A 48h, on les retrouve essentiellement dans la rate, les os, les poumons, le foie, la tumeur, l'intestin, le cœur et dans

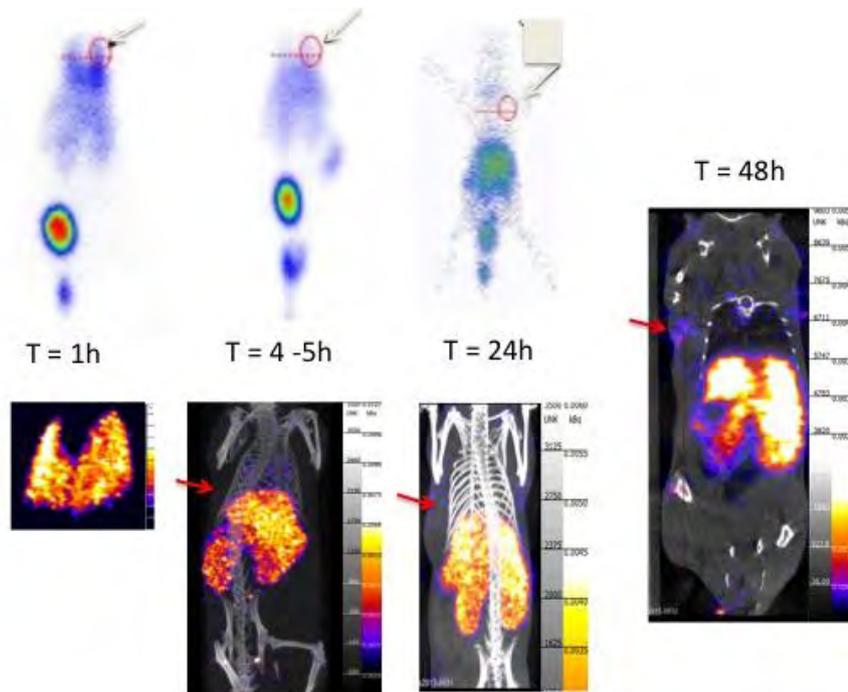
Le signal tumeur/sang = 3 et le ratio tumeur/muscle est de 4.

**(d) Comparaison de la biodistribution des lymphocytes T $\gamma\delta$  marqués au  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO ou à l'oxinate d'indium 111**

La biodistribution des LT $\gamma\delta$  est la même qu'ils soient marqués avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO ou l'oxinate d'indium 111. Cependant, l'intérêt de l'utilisation l'indium 111 est sa période. Il permet de réaliser des images sur 48h à 72h. Ainsi, tardivement il y a une diminution significative du bruit de fond qui se traduit par une visualisation de la

distribution tumorale des cellules avec un signal tumeur/bruit de fond=3 non visualisable à 24h avec le technétium 99 métastable.

Aussi, la caméra Biospace  $\gamma$ -imager donne une image planeaire qui ne permet pas visualiser l'anatomie de l'animal et de la localisation précise des cellules. Grâce à l'arrivée de la  $\gamma$ -caméra nanoSPECT/CT, les études de biodistribution allient donc les données anatomiques et fonctionnelles. Elle a entre autre permis de visualiser distinctement la localisation osseuse de ces cellules (Figure 66).



**Figure 66** : Comparaison de la biodistribution tumorale des  $LT\gamma\delta$  marqués avec la caméra  $\gamma$ -imager Biospace et la nano SPECT/CT Biospace

A : Image obtenue pendant 24h après injection intraveineuse de 1,5 million de  $LT\gamma\delta$  marqués avec 3,7 MBq de  $^{99m}Tc$ -HMPAO avec la caméra Biospace  $\gamma$  imager. La tumeur est représentée par le cercle rouge. Elle n'est pas visualisée.

B : Image obtenue pendant 48h après l'injection rétroorbitale de 30 millions de  $LT\gamma\delta$  marqués avec 8 MBq d'oxinate d'Indium111 avec la caméra nanoSPECT/CT Biospace. La tumeur est représentée par la flèche rouge.

Ainsi, nous avons marqué de lymphocytes T $\gamma\delta$  humains, matures et fonctionnels produits par cultures *in vitro* de PBMC en présence de PAg grâce au  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO. Nous avons ensuite suivi leur distribution dans une souris saine puis une souris xénogreffée d'un lymphome humain et nous avons suivi leur devenir à court terme (24h). Dans ce modèle, les LT $\gamma\delta$  s'accumulent initialement dans les poumons avant de se redistribuer dans le foie et le tractus digestif. Le  $^{99m}\text{Tc}$  n'ayant pas une période adaptée à la distribution cellulaire, nous avons utilisé l'Indium 111 qui possède un période plus longue.

Au terme de cette partie, nous avons essayé de montrer différentes applications de l'imagerie fonctionnelle sur petit animal au travers de la mise en place d'un radio traceur tumoral et du marquage cellulaire de lymphocytes d'intérêt dans le lymphome. Pour cela nous avons marqué le Rituximab, anticorps utilisé dans le traitement de la plupart des lymphomes et nous l'avons complexé avec le cœur technétié tricarbonyle. La méthode de marquage est simple et rapide, le radio traceur est stable et le ciblage tumoral est visible dès 5h mais un meilleur signal/bruit est obtenu à 24h. Un isotope de période adaptée à la distribution d'un anticorps comme le  $^{89}\text{Zr}$  pourrait être intéressant.

Par la suite, nous avons marqué avec une méthode classique les lymphocytes T $\gamma\delta$  qui présentent un intérêt antitumoral. Nous avons ainsi pu mettre en place un modèle murin de biodistribution de ces cellules. L'utilisation de l' $^{111}\text{In}$  a permis de visualiser les données ex-vivo trouvées avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO après sacrifice de l'animal.

# DISCUSSION

L'imagerie chez le petit animal est un domaine qui s'est beaucoup développé ces dernières années. Il est maintenant possible de visualiser les grandes étapes de la cancérogénèse en passant de l'échelle moléculaire avec la microscopie confocale à l'échelle tissulaire avec les méthodes anatomiques (CT, radiographie, échographie, IRM) ou les méthodes métaboliques comme la scintigraphie, la TEP ou l'IRM. Dans ce travail, il nous a paru intéressant de nous focaliser sur des techniques d'imagerie fonctionnelles utilisables à la fois en pré-clinique chez le petit animal et en clinique chez l'homme. Nous avons choisi pour cela, la scintigraphie, méthode d'imagerie nucléaire reposant sur l'émission de rayonnements gamma dans le domaine de l'hématologie et plus précisément du lymphome, maladie où l'imagerie métabolique joue un rôle essentielle dans la prise en charge des patients. Pour cela nous avons voulu montrer deux aspects de ces techniques à savoir la mise en place d'un radio traceur spécifique du lymphome et la marquage cellulaire de lymphocytes possédant des propriétés antitumorales intéressantes.

Dans la première partie des expériences, nous avons donc élaboré un radio traceur spécifique du lymphome. Pour cela, nous avons utilisé le Rituximab, anticorps anti CD 20 présent dans le traitement de la plupart des lymphomes car la molécule CD 20 est exprimée par plus de 90% des cellules lymphomateuses. Le marquage a été réalisé avec le cœur technétié tricarbonyle sans ajouter d'étape de réduction spécifique de l'anticorps. En effet, les dernières publications sur le marquage du Rituximab contiennent deux étapes de réduction, l'une pour la réduction du  $^{99m}\text{Tc}$  par le tricarbonyle et l'autre ciblant spécifiquement l'anticorps soit par photoactivation [6], soit en utilisant du 2-mercaptoéthanol [36, 43, 83]. Cette étape permet de générer des groupements thiols. Dans notre étude, la méthode décrite pour marquer l'anticorps n'a pas besoin de la deuxième étape de réduction. En effet, l'addition de 50  $\mu\text{l}$  de  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$  peut induire une réduction des anticorps grâce à la présence de boranocarbonate. Toutefois, cette réduction reste limitée car des études ont montré une courte demi-vie du boranocarbonate dans ces conditions (environ 10 min) [27-29]. Après formation du noyau tricarbonyle, le seul produit contenant du bore est du borate  $[\text{BH}_3]$ , un autre agent réducteur qui est incapable de réduire les liaisons disulfure. Notre méthode n'ajoutant pas d'étape de réduction spécifique de l'anticorps est donc plus simple, plus rapide et moins agressive pour la protéine. En effet, une réduction supplémentaire peut être délétère pour l'intégrité de la protéine

en raison de la présence des ponts disulfure dans la structure de l'anticorps. Le Rituximab est une IgG qui est constituée de 2 chaînes légères et de 2 chaînes lourdes, divisés en domaines, 2 pour les chaînes légères et 4 pour les chaînes lourdes. Les ponts disulfures sont présents pour stabiliser la structure de la molécule. Il en existe un dans chaque domaine (6 x2), un qui lie la chaîne lourde à la chaîne légère (soit 1 x 2) et de 1 à 4 qui relie les chaînes lourdes de la région charnière. Ainsi, l'utilisation du 2-mercaptoéthanol pourrait réduire les liaisons disulfures en groupe thiol et désorganiser la structure et la reconnaissance des cellules CD 20 positives par l'anticorps. Un grand nombre de publications utilise cette étape de réduction supplémentaire pour créer un groupe thiol libre à partir des liaisons disulfures ou pour rendre accessible des acides aminés comme l'histidine et la cystéine [36, 43, 83]. D'un côté, l'augmentation du nombre d'histidine est un avantage, car il est le meilleur acide aminé pour la liaison [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ ] avec sa fonction N-hétérocyclique qui représente un ligand tridenté lorsque l'acide aminé est en position N-terminale [30-32]. Mais, de l'autre côté, la réduction des liaisons disulfure, même si le nombre de thiol créé est faible, pourrait diminuer la stabilité de l'anticorps ou altérer sa fonction si la réduction se produit sur des ponts disulfure situés entre la chaîne lourde et la chaîne légère. Ceci est illustré par l'hétérogénéité des immunoréactivités retrouvées dans les publications utilisant le 2-ME [36, 43]. Notre méthode de marquage ne possède pas cette étape de réduction spécifique de l'anticorps. Elle est donc simple, douce pour l'anticorps et rapide. Les résultats retrouvés montrent un  $K_d = 4,57 \text{ nM}$  proche de celui du Rituximab ( $K_d = 5 \text{ nM}$ ) [34] et une immunoréactivité de 96 % indiquant que l'intégrité de la protéine est conservée comme le prouve les l'étude *in vivo* qui montrent un ciblage tumoral dès 5h avec un ratio tumeur / muscle de 2,75 ( $p = 0,005$ ) à 24h. Le traceur s'accumule dans les reins, la rate, le foie, les poumons, le cœur, l'intestin, l'estomac, la tumeur ainsi que les muscles et les os. Une activité circulante est également présente.

L'étude par autoradiographie peut être complémentaire à toutes ces manipulations car elle permettrait de savoir si l'anticorps marqué est internalisé par la tumeur où s'il reste à sa surface. Cependant l'animal doit être sacrifié 6h après l'injection pour obtenir une activité détectable.

Cette distribution pourrait s'expliquer par la nature des ligands du [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ ]. En effet il est impossible de savoir où se lie le cœur technété tricarbonyle mais des études ont montré que la biodistribution du complexe technété pouvait être influencée par la nature du ligand se complexant [30, 31]. Ainsi, des

ligands bidentés augmentent l'excrétion par le foie et les reins à la différence des ligands tridentés. On peut supposer que notre méthode pour marquer le Rituximab avec l'isolink® engage des ligands bidentés comme l'histidine qui ne se trouve pas dans la partie N-terminale de la protéine.

Enfin, nos travaux montrent que la réaction de complexation est plus rapide (30 minutes à 1 heure contre 2 heures) et le complexe créé est stable dans le plasma. Le rendement de marquage est supérieur à 95% ce qui n'implique pas de purification supplémentaire. Nous avons donc réussi à élaborer un radiotraceur spécifique du lymphome grâce à une méthode simple, rapide et reproductible utilisant le cœur technétium tricarbonyle.

L'inconvénient majeur du Rituximab marqué au technétium 99 métastable est sa persistance dans le sang et son élimination hépatique. Ceci n'est pas lié au radiomarquage mais à l'anticorps. Le Rituximab est une IgG entière qui possède le fragment Fc responsable de son maintien dans la circulation sanguine [84]. Il pourrait être intéressant de réaliser le même marquage mais sur les fragment  $F(ab')_2$  qui constituent les parties de l'anticorps qui reconnaissent spécifiquement l'antigène.

Ainsi, les protéines ayant une taille inférieure à 60 kDa sont éliminés rapidement par voie rénale ce qui peut être intéressant pour une application diagnostique. Une autre manière de limiter la circulation sanguine de l'anticorps marqué et donc la persistance du bruit de fond est la mise au point d'un modèle diagnostique de pré-ciblage de la tumeur. A l'heure actuelle cette approche est très étudiée dans le cadre de la radioimmunothérapie. Son principe repose sur la séparation entre l'injection de l'anticorps et l'administration du radionucléide qui n'est plus chélaté à l'anticorps. Dans un premier temps, une quantité saturante d'anticorps spécifique d'une tumeur est administrée, il va lentement aller se lier sur son site tumoral (entre 2 et 4 jours). Quand sa concentration est maximum, on injecte le radionucléide chélaté à une petite molécule qui reconnaît spécifiquement l'anticorps injecté quelques jours plus tôt. Trois approches sont actuellement étudiées pour la thérapeutique : une utilisant la forte liaison entre la streptavidine et la biotine, la méthode « Dock and Lock » utilisant un anticorps monoclonal bispécifique et la méthode utilisant les oligomères (MORF). La première est la plus ancienne [85]. Il est possible de marquer l'anticorps soit avec la streptavidine soit avec la biotine. Dans le premier cas, on obtient une molécule de grosse taille qui est lentement éliminée du compartiment sanguin. Ainsi, avant l'administration du radionucléide lié à la biotine, il est nécessaire d'injecter une molécule qui va éliminer l'excès sanguin d'anticorps-streptavidine. Lorsque c'est la

biotine qui est liée à l'anticorps, il faut injecter de l'avidine seule un ou 2 jours après l'injection d'anticorps biotinilé. En effet, l'avidine étant glycosylée, elle est rapidement éliminée par le foie. En se liant à l'anticorps biotinilé resté dans le compartiment sanguin, elle va favoriser son élimination hépatique. Trente minutes après l'administration d'avidine, a lieu l'injection du radionucléide lié à la streptavidine qui va aller se lier à l'anticorps biotinilé présent au niveau de la tumeur. La streptavidine étant non glycosylée, elle n'est pas éliminée par voie hépatique. Cette approche permet un fort ratio tumeur/tissu normal [86].

La deuxième approche est appelée la stratégie du « Dock and Lock » [84]. Elle repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal bispécifique. Une partie de l'anticorps reconnaît spécifiquement la tumeur et l'autre partie de l'anticorps est un anti chélate qui reconnaît le chélate liant le radionucléide comme le DTPA (acide diethylene triamine pentaacétique) pour l'indium 111 ou HSG (histamine-succinyl-glycine) pour l'yttrium 90 ou le lutétium 177 en thérapeutique. Comme pour la première approche, on injecte en premier lieu l'anticorps bispécifique qui va se lier à la tumeur, quatre jours après est administré le radionucléide chélaté ainsi que l'anticorps bispécifique. Cette double injection est effectuée pour éviter l'élimination trop rapide du radionucléide chélaté. La liaison sanguine de l'anticorps bispécifique au radionucléide chélaté est monovalente. Une fois que ce complexe arrive au voisinage de la tumeur où la concentration en anticorps bispécifique est plus importante, il va y avoir un déplacement du radionucléide chélaté sur les anticorps liés à la tumeur. Cette méthode permet de visualiser des métastases hépatiques et d'obtenir un ratio tumeurs/foie important.

Enfin, la dernière méthode utilise des oligomères appelés MORF (phosphorodiamidate morpholinos) [87]. C'est une méthode en 3 temps. Il faut d'abord injecter l'anticorps froid conjugué au MORF. La deuxième injection est un polymère conjugué avec de multiples copies du MORF complémentaire (cMORF) se liant aux MORF accrochés à l'anticorps d'une part et aux MORF qui seront liés au radionucléides d'autre part. Enfin, vient l'administration du MORF lié au radionucléide. Ainsi, en ajoutant la deuxième étape avec l'introduction de nombreuses copies du cMORF accrochés sur la tumeur via la liaison à l'anticorps, le nombre de radionucléide-MORF se liant à la tumeur sera plus important.

Ainsi, toutes ces approches étudiées pour le domaine thérapeutique sont envisageables pour le diagnostic car elles ont l'avantage de la diminuer la distribution hépatique et le bruit de fond sanguin. Grâce à une prochaine collaboration avec une

équipe de chimistes de l'université Paul Sabatier (Equipe UMR 506) nous envisageons de développer ce type d'approche.

La deuxième partie du travail consistait à établir un modèle murin de biodistribution des lymphocytes  $T\gamma\delta$ , cellules possédant des propriétés antitumorales. Pour cela nous les avons marquées avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO dans un premier temps puis avec l'oxinate d'indium 111. L'étude s'est faite en 2 temps, une première partie a eu lieu chez le petit animal sain pour évaluer la distribution physiologique de ces cellules humaines puis la deuxième partie s'est intéressée à la distribution des lymphocytes  $T\gamma\delta$  chez la souris porteuse d'un lymphome humain xéno greffé. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que les  $LT\gamma\delta$  s'accumulent initialement dans les poumons avant de se redistribuer dans le foie et le tractus digestif chez la souris saine. Une étude similaire portant sur la biodistribution de cellules NK humaines chez un autre modèle de souris immunodéficientes ( $\text{RAG}^{-/-}\gamma\text{C}^{-/-}$ ) xéno greffées après leur injection intraveineuse a également mise en évidence l'accumulation initiale de cette autre population lymphoïde dans les poumons [88]. Il semble donc que l'accumulation pulmonaire précoce de cellules lymphoïdes ne soit pas une caractéristique des  $LT\gamma\delta$  mais plutôt la résultante physiologique du passage de ces cellules par la veine cave immédiatement après leur injection par voie intraveineuse caudale. Aussi, le nombre élevé de  $LT\gamma\delta$  injectés (18 millions) a pu provoquer une stase pulmonaire chez les souris qui possède physiologiquement moins de cellules. Nous avons recommencé les mêmes expériences avec 1,5 million de cellules et nous avons retrouvé les mêmes résultats.

Cette étude démontre une relocalisation secondaire des  $LT\gamma\delta$  humains xéno greffés dans le foie et le tractus digestif des souris receveuses. Ces deux sites sont connus pour être particulièrement riches en  $LT\gamma\delta$  chez l'homme, à la fois au cours des stades de développement fœtal (tout particulièrement de l'organogenèse hépatique) et chez l'adulte.

Il est important de noter qu'en clinique, la distribution pulmonaire puis le passage rapide dans le foie et la rate est un signe de viabilité cellulaire.

De plus, les images immédiates des lymphocytes injectés passant par la veine cave puis leur redistribution tardive donnant un très fort signal de fond réparti sur l'ensemble de l'animal sont fortement suggestives d'une importante localisation systémique. Comme les  $LT\gamma\delta$  à  $\text{TCRV}\gamma 9$  sont principalement retrouvés dans le sang

circulant humain, le modèle utilisé dans cette étude semble donc « mimer » correctement la distribution tissulaire observée chez l'homme.

Quand nous sommes passés à l'étude chez l'animal porteur d'un lymphome humain, aucun recrutement tumoral des lymphocytes n'a été détecté au bout de 24h avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO malgré la présence d'une forte masse lymphomateuse chez plusieurs souris.

Trois types d'explications peuvent être invoquées :

- Le faible pourcentage de  $\text{LT}\gamma\delta$  humains infiltrant la tumeur ( $\gamma\delta\text{TILs}$ ) qui serait non détectable par la technique utilisée. Il faudrait donc recommencer les mêmes expériences en injectant des quantités supraphysiologiques de  $\text{LT}\gamma\delta$ .

C'est pour cela que nous avons utilisé 30 millions de cellules quand nous avons marqué les lymphocytes avec de l'oxinate d'indium 111.

- La localisation tumorale chez ces animaux, en partie superposée aux poumons, zone de forte bioaccumulation physiologique des  $\text{LT}\gamma\delta$  humains réduit la sensibilité de leur détection. En effet, la première  $\gamma$ -caméra utilisée donnait une image en 2 dimensions ne permettant d'apprécier les volumes.

Nous avons pu pallier à ce problème grâce à l'arrivée de la nanoSPECT/CT donnant des images anatomiques et fonctionnelles en 3 dimensions ;

- Les conditions expérimentales et cinétiques, notamment imposées par le radiomarqueur (24 heures), pourraient s'avérer insuffisantes pour la cinétique de recrutement/infiltration tumorale du lymphome CD 20. En effet, le comptage des organes sur un seul animal a montré une accumulation cellulaire dans la tumeur à 48 heures.

Toutes ces suggestions nous ont conduit à utiliser un autre isotope radioactif qui est l'Indium 111. Ainsi, le radiomarquage des cellules avec cet isotope, en utilisant une caméra plus performante a permis de visualiser un faible recrutement tumoral à 48h et la localisation osseuse des cellules.

Enfin, la visualisation de la cinétique de distribution tumorale des  $\text{LT}\gamma\delta$  chez le petit animal est difficile car le recrutement spontané de ces cellules aux lymphomes Daudi et RAJI s'avère particulièrement faible sans stimulus exogène. Une publication de Tokuyama et al [89] a montré que la stimulation de  $\text{LT}\gamma\delta$  par du zoledronate en présence d'IL2 favorisée la prolifération de  $\text{LT}\gamma\delta$  CD16+, molécule de surface capable de reconnaître la partie Fc des immunoglobulines. *In vitro*, ces lymphocytes CD16+ reconnaissent et éliminent plus efficacement les cellules lymphomateuses ou

les tumeurs du sein en présence de Rituximab ou de trastuzumab. (43). Les mêmes expériences pourraient donc être refaites chez les modèles murins mis en place en injectant un nombre plus important de cellules et en évaluant s'il existe une différence dans la cinétique de recrutement tumorale des  $LT\gamma\delta$  avec ou sans infusion de Rituximab préalable.

# CONCLUSION

Ces travaux ont donc montré l'intérêt que pouvait apporter l'imagerie fonctionnelle dans le domaine de la cancérologie. Le but de cette thèse était d'une part, d'acquérir des connaissances dans la chimie du technétium 99m et du zirconium 89 pour l'élaboration de radiotraceurs tumoraux spécifiques. Ainsi, nous avons développé une méthode de marquage au technétium 99m simple et rapide du Rituximab avec le cœur tricarbonyle. Le radio traceur synthétisé possède un  $K_d = 4,57$  nM proche de celui du Rituximab ( $K_d = 5$  nM) [34] et une immunoréactivité de 96 %. Cela indique que l'intégrité de la protéine est conservée. L'étude *in vivo* montre un ciblage tumoral dès 5h avec un ratio tumeur / muscle de 2,75 à 24h. Le traceur s'accumule dans les reins, la rate, le foie, les poumons, le cœur, l'intestin, l'estomac, la tumeur ainsi que les muscles et les os. Une activité circulante est également présente. L'utilisation d'un isotope TEP comme le zirconium 89 est envisagée car il allie la sensibilité de cette méthode d'imagerie à une période adaptée à distribution d'un anticorps. D'autre part, elle nous a permis de maîtriser les différentes techniques de radiomarquage cellulaire permettant par exemple, la mise en place de modèles murins de distribution d'une population cellulaire dans une pathologie bien décrite comme le lymphome. Pour cela nous avons utilisé le  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO dans un premier temps puis l'oxinate d'indium 111 dans un deuxième temps pour visualiser la biodistribution cellulaire sur une période plus longue. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que les  $\text{LT}\gamma\delta$  s'accumulent initialement dans les poumons avant de se redistribuer dans le foie, la rate et les os. Un ciblage tumoral est apparu à 48h.

Ces radiotraceurs et ces cellules marquées nous ont permis d'aborder différentes problématiques de l'imagerie préclinique.

Toutes ces connaissances pourraient maintenant s'appliquer à d'autres pathologies cancéreuses où l'apport de l'imagerie métabolique reste encore limité comme le myélome.

# PERSPECTIVES

Au terme de ce travail, nous avons essayé de montrer l'intérêt de l'imagerie métabolique dans le domaine de l'oncologie en abordant 2 domaines : un plutôt diagnostique avec la mise au point d'un traceur spécifique de tumeur et l'autre plutôt thérapeutique dans le contexte « la cellule médicament ». En effet, en visualisant le comportement de cellules d'intérêt, cette technique de marquage cellulaire peut permettre de sélectionner des patients éligibles à ce type de thérapie en évaluant le comportement d'une petite quantité de cellules prélevées. Pour cela l'utilisation d'une pathologie bien décrite et bien connue comme lymphome, nous a permis de mettre au point 2 techniques de marquage distinctes en se reposant sur certains modèles déjà existants. L'expérience et les compétences acquises au cours de ce travail pourront être mis à profit dans d'autres pathologies tumorales où l'utilisation de l'imagerie métaboliques est moins répandue. Une de ces maladies pourrait être le myélome multiple.

Après le lymphome, le myélome multiple est la deuxième hémopathie maligne. Il est aussi appelé maladie de Kahler. Au niveau épidémiologique, environ 5 000 nouveaux cas de myélome multiple sont diagnostiqués en France avec une prédominance masculine. Il s'agit plutôt d'une pathologie du sujet âgé avec un âge médian de diagnostic de 70 ans chez les hommes et de 74 ans chez les femmes. En 2005, la survie relative à 5 ans était environ de 40 % mais l'utilisation de nouvelles molécules (thalidomide, lénelidomide, bortezomib) a amélioré cette survie ces dernières années.

Le diagnostic de myélome multiple est posé en fonction de deux critères :

- la présence d'une immunoglobuline monoclonale dans le sérum ou les urines, quelle que soit sa concentration
- la présence d'une plasmocytose médullaire supérieure à 10 %.

L'indication du traitement repose sur le caractère symptomatique de la maladie définie par au moins un des critères du CRAB :

C : hypercalcémie

R : insuffisance rénale

A : anémie

B : atteinte osseuse (*Bone*)

Le dernier critère repose sur les données fournies par l'imagerie. En effet afin d'évaluer l'atteinte osseuse, des examens d'imagerie doivent être réalisés. Ils serviront à établir le bilan d'extension, à envisager l'attitude thérapeutique à adopter ainsi qu'à évaluer la réponse au traitement. Parmi tous les examens d'imagerie disponibles, la radiographie classique reste le standard pour la stadification et le suivi des patients. Il s'agit de réaliser un bilan radiographique du squelette. Les atteintes osseuses touchent préférentiellement les os qui sont impliqués dans la production des cellules hématologiques à savoir rachis (65 %), les côtes (45 %), le crâne (40 %), le bassin (30 %) avec le sacrum (10 %) et les os longs (25 %) dont l'humérus et les fémurs [90].

De nouvelles études se sont focalisées sur les techniques d'imagerie modernes. Elles ont conduit à modifier la classification de Durie-Salmon datant de 1975. Cette dernière permettait de stadifier la maladie en fonction de critères biologiques et des atteintes osseuses apportées par la radiographie conventionnelle. Depuis 2006, ces critères ont été revus et ils prennent en compte les techniques d'imagerie modernes. Ainsi, selon 2 publications de Delorme *et al* [91, 92], bien que la radiographie conventionnelle reste le standard. Elle devrait se faire remplacer par le scanner ou l'IRM. En effet, la radiographie de corps entier effectuée au diagnostic est fastidieuse car elle est réalisée chez des patients souvent âgés et algiques et elle sous évalue dans de nombreux cas le nombre de lésions osseuses par son manque de sensibilité. Dans le cas de la stadification de la maladie, étape clé dans la prise en charge du patient, une méthode sensible est préconisée dans la mesure où suivant le résultat obtenu, la mise en place d'une chimiothérapie sera envisagée (stade 2 et 3). Pour cette étape de la prise en charge du patient, l'IRM paraît la méthode la plus adaptée surtout lorsque il y a une suspicion de compression médullaire, le scanner est retenu quand l'IRM n'est pas disponible. Pour le suivi du traitement, la TEP/CT au [<sup>18</sup>F]FDG a montré son efficacité ainsi que l'IRM.

Une étude récente de Walker *et al* [93] a comparé les différentes techniques d'imagerie disponibles et en a conclu que l'imagerie métabolique apportait un intérêt dans la prise en charge du myélome. En effet, au moment du diagnostic et de l'élaboration du stade de la maladie, l'IRM et la TEP/CT au [<sup>18</sup>F]FDG étaient capables de détecter des lésions focales intra médullaires avant tout changement anatomique permettant une prise en charge thérapeutique précoce des lésions osseuses. Ces techniques sont aussi capables de visualiser une infiltration médullaire diffuse. Ainsi il a montré que c'est le nombre de lésions focales et non la

taille qui est corrélé au résultat. Plus le nombre de lésions décelées en IRM ou en TEP/CT est élevé plus la survie est réduite. En ce qui concerne la réponse au traitement, il semble que ce soit la TEP/CT au [<sup>18</sup>F]FDG qui donne les résultats les plus rapides. Enfin, la TEP semble la technique la plus appropriée pour évaluer la rechute. Il est conseillé de le pratiquer à plus de 4 semaines après la fin du traitement. Des études récentes ont aussi montré que l'obtention d'une rémission complète en TEP/CT au [<sup>18</sup>F]FDG avant la transplantation des cellules souches était corrélée à une rémission plus durable et à une survie prolongée même chez les patients avec un risque génétique prouvée [94]. Nous pouvons donc constater que les techniques d'imagerie métaboliques sont aujourd'hui les plus étudiées dans cette pathologie.

Ainsi, la mise au point d'un radio traceur tumoral spécifique des cellules myélomateuses pourrait être intéressant pour détecter la présence de cellules myélomateuses ou étudier l'environnement tumoral. Le marquage d'un anticorps monoclonal (CD138 ou CD38) [95-97] avec les techniques développées dans cette thèse permettrait de valider les modèles animaux de myélome émergents [98]. Cependant, l'imagerie TEP étant la plus sensible, la mise au point de radiotracer TEP pourrait être plus pertinent quand on sait qu'une lésion myélomateuse est parfois formée à partir d'un petit nombre de cellules. Le marquage d'un anticorps avec un traceur TEP pourrait être une alternative. Sachant qu'un anticorps met du temps à se fixer sur sa cible, l'utilisation d'un traceur TEP sensible et spécifique de période longue comme le Zirconium 89 (T = 3 jours) permettrait d'assurer le suivi sur une semaine [44, 99, 100] .

Enfin, la cellule médicament présente à ce jour un intérêt grandissant dans le domaine de la thérapie antitumorale. Une publication récente de Glick *et al* vient de montrer que certains lymphocytes T lorsqu'ils sont issus de souris jeunes assurent une défense efficace contre le développement d'une pathologie myélomateuse [101]. Le marquage de telles cellules comme décrit dans ce travail pourrait être une seconde approche dans l'évaluation de la prise en charge thérapeutique.

Ainsi au terme de cette thèse, nous avons essayé de montrer l'intérêt de l'imagerie nucléaire métabolique dans la recherche en oncologie. Les modèles et la maladie choisie nous ont permis d'acquérir une compétence unique applicable à d'autres pathologies cancéreuses dans le but de s'orienter vers une prise en charge adaptée et individuelle à chaque patient.

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] OMS CidRslC. GLOBOCAN 2008. 2011.
- [2] Weissleder R and Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 2008;452:580-9.
- [3] Nishino M, Jackman DM, Hatabu H, Yeap BY, Cioffredi LA, Yap JT, et al. New Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) guidelines for advanced non-small cell lung cancer: comparison with original RECIST and impact on assessment of tumor response to targeted therapy. *AJR. American journal of roentgenology* 2010;195:W221-8.
- [4] Juweid ME, Stroobants S, Hoekstra OS, Mottaghy FM, Dietlein M, Guermazi A, et al. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: consensus of the Imaging Subcommittee of International Harmonization Project in Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:571-8.
- [5] Fletcher JW, Djulbegovic B, Soares HP, Siegel BA, Lowe VJ, Lyman GH, et al. Recommendations on the use of 18F-FDG PET in oncology. *J Nucl Med* 2008;49:480-508.
- [6] Saboury B, Torigian DA, and Alavi A. Comment on: "FDG PET and PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour PET imaging, version 1.0". *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:1430-1; author reply 2-3.
- [7] <http://www.francelymphomeespoir.fr/acces-MG/les-lymphomes>.
- [8] Condeelis J and Weissleder R. *In vivo* imaging in cancer. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2010.
- [9] Liu G, Swierczewska M, Niu G, Zhang X, and Chen X. Molecular imaging of cell-based cancer immunotherapy. *Molecular bioSystems* 2011;7:993-1003.
- [10] [http://sfa.univpoitiers.fr/imageup/sites/sfa.univpoitiers.fr@imageup/IMG/pdf/Principe\\_Confocal-2.pdf](http://sfa.univpoitiers.fr/imageup/sites/sfa.univpoitiers.fr@imageup/IMG/pdf/Principe_Confocal-2.pdf). PRINCIPE MICROSCOPIE CONFOCALE.
- [11] Cochard P. Introduction à un type de microscopie adapté à l'imagerie du petit animal 2009.
- [12] [http://w3.cie.u-tlse2.fr/fr/3-1\\_La%20recherche/doc/CF\\_Principe.pdf](http://w3.cie.u-tlse2.fr/fr/3-1_La%20recherche/doc/CF_Principe.pdf). Toulouse Rio Imaging.
- [13] Ntziachristos V. Fluorescence molecular imaging. *Annual review of biomedical engineering* 2006;8:1-33.
- [14] Paganin-Gioanni A. Imagerie de fluorescence du petit animal : Visualisation d'événements moléculaires et cellulaires dans l'animal vivant. STAL 2009.
- [15] Busson M. Imagerie du petit animal par bioluminescence : applications à la cancérologie et à l'endocrinologie. 2009.
- [16] Pesnel S. Développement de modalités d'imagerie in vivo pour l'oncologie expérimentale 2010.
- [17] Black PC, Shetty A, Brown GA, Esparza-Coss E, Metwalli AR, Agarwal PK, et al. Validating bladder cancer xenograft bioluminescence with magnetic resonance imaging: the significance of hypoxia and necrosis. *BJU international* 2010;106:1799-804.
- [18] code de la santé publique-.
- [19] Du Moulinet D'Hardemare A. Radiopharmaceutiques- Chimie des radiotraceurs et applications biologiques Presse universitaire de Grenoble 1998.
- [20] Dewannjee. The chemistry of 99mTc labelled radiopharmaceuticals. . *Semin. Nucl. Med* 1990.
- [21] ARDISSON V. Evaluation de nouveaux radiopharmaceutiques : Synthèse, évaluation et biodistribution de nouveaux radioligands peptidiques VCAM-1 et avb3.
- [22] ANSM. RCP ELUMATIC 2-50 GBq générateur radiopharmaceutique. 2011.

- [23] Nowotnick. Practical and physicochemical aspects of the preparation of  $^{99m}\text{Tc}$  labelled radiopharmaceuticals. Textbook of radiopharmacy : theory and practice 1999.
- [24] Abrams MJ, Juweid M, tenKate CI, Schwartz DA, Hauser MM, Gaul FE, et al. Technetium- $^{99m}$ -human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J Nucl Med* 1990;31:2022-8.
- [25] Liu S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chemical Society reviews* 2004;33:445-61.
- [26] Alberto R. OK, Wheatley N., Schibli R., Schubiger AP. Synthesis and properties of boranocarbonate: a convenient in situ co source for the aqueous preparation of  $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ . *J. Am. Chem. Soc.* 2001 123::3135– 6.
- [27] Alberto R. SR, Egli A., Schubiger APA. Novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of  $[\text{99mTc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  from  $[\text{99mTcO}_4^-]$  in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *J. Am. Chem. Soc.* 1998;120.
- [28] Alberto R. SR, Schubiger AP. application of fac-  $[\text{99mTc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  in bioorganometallic chemistry: design, structure, and in vitro affinity of a 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligand labeled with  $^{99m}\text{Tc}$ . *J. Am. Chem. Soc.* 1999;121:6076– 7.
- [29] Schibli R, Alberto R, Abram U, Abram S, Egli A, Schubiger PA, et al. Structural and  $^{99}\text{Tc}$  NMR Investigations of Complexes with fac- $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  Moieties and Macrocyclic Thioethers of Various Ring Sizes: Synthesis and X-ray Structure of the Complexes fac- $[\text{Tc}(\text{9-ane-S}(3))(\text{CO})_3]\text{Br}$ , fac- $[\text{Tc}(2)(\text{tosylate})(2)(18\text{-ane-S}(6))(\text{CO})_6]$ , and fac- $[\text{Tc}(2)(20\text{-ane-S}(6)\text{-OH})(\text{CO})_6][\text{tosylate}(2)]$ . *Inorg Chem* 1998;37:3509-16.
- [30] Schibli R, Katti KV, Higginbotham C, Volkert WA, and Alberto R. In vitro and in vivo evaluation of bidentate, water-soluble phosphine ligands as anchor groups for the organometallic fac- $[\text{99mTc}(\text{CO})_3]^+$ -core. *Nucl Med Biol* 1999;26:711-6.
- [31] Schibli R, La Bella R, Alberto R, Garcia-Garayoa E, Ortner K, Abram U, et al. Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of  $(^{99m}\text{Tc})$ -tricarbonyl complexes: a hint for the future functionalization of biomolecules. *Bioconjug Chem* 2000;11:345-51.
- [32] Egli A, Alberto R, Tannahill L, Schibli R, Abram U, Schaffland A, et al. Organometallic  $^{99m}\text{Tc}$ -aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity. *J Nucl Med* 1999;40:1913-7.
- [33] Waibel R, Alberto R, Willuda J, Finfern R, Schibli R, Stichelberger A, et al. Stable one-step technetium- $^{99m}$  labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel  $\text{Tc}(\text{I})$ -carbonyl complex. *Nat Biotechnol* 1999;17:897-901.
- [34] Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 2003;22:7359-68.
- [35] Olafsen T, Betting D, Kenanova VE, Salazar FB, Clarke P, Said J, et al. Recombinant anti-CD20 antibody fragments for small-animal PET imaging of B-cell lymphomas. *J Nucl Med* 2009;50:1500-8.
- [36] Dias CR, Jeger S, Osso JA, Jr., Muller C, De Pasquale C, Hohn A, et al. Radiolabeling of rituximab with  $(^{188}\text{Re})$  and  $(^{99m}\text{Tc})$  using the tricarbonyl technology. *Nucl Med Biol* 2011;38:19-28.
- [37] Gmeiner Stopar T, Fettich J, Zver S, Mlinaric-Rascan I, Hojker S, Socan A, et al.  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled rituximab, a new non-Hodgkin's lymphoma imaging agent: first clinical experience. *Nucl Med Commun* 2008;29:1059-65.
- [38] Stopar TG, Mlinaric-Rascan I, Fettich J, Hojker S, and Mather SJ.  $(^{99m}\text{Tc})$ -rituximab radiolabelled by photo-activation: a new non-Hodgkin's lymphoma imaging agent. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33:53-9.
- [39] Liu. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev* 2004;33.
- [40] ASN. Elimination des effluents et des déchets contaminés par des radionucléides produits dans les installations autorisées au titre du Code de la Santé Publique Guide n°18 2012.

- [41] Forrer F, Chen J, Fani M, Powell P, Lohri A, Muller-Brand J, et al. In vitro characterization of (177)Lu-radiolabelled chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and a preliminary dosimetry study. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2009;36:1443-52.
- [42] D'Alessandria C, Malviya G, Viscido A, Aratari A, Maccioni F, Amato A, et al. Use of a 99mTc labeled anti-TNFalpha monoclonal antibody in Crohn's disease: in vitro and in vivo studies. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2007;51:334-42.
- [43] Malviya G, Anzola KL, Podesta E, Lagana B, Del Mastro C, Dierckx RA, et al. (99m)Tc-labeled Rituximab for Imaging B Lymphocyte Infiltration in Inflammatory Autoimmune Disease Patients. *Mol Imaging Biol* 2011.
- [44] Zhang Y, Hong H, and Cai W. PET tracers based on Zirconium-89. *Current radiopharmaceuticals* 2011;4:131-9.
- [45] Deri MA, Zeglis BM, Francesconi LC, and Lewis JS. PET imaging with (8)(9)Zr: from radiochemistry to the clinic. *Nucl Med Biol* 2013;40:3-14.
- [46] Verel I, Visser GW, Boellaard R, Stigter-van Walsum M, Snow GB, and van Dongen GA. 89Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of 89Zr-labeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 2003;44:1271-81.
- [47] Perk LR, Vosjan MJ, Visser GW, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:250-9.
- [48] Meijs WE, Haisma HJ, Klok RP, van Gog FB, Kievit E, Pinedo HM, et al. Zirconium-labeled monoclonal antibodies and their distribution in tumor-bearing nude mice. *J Nucl Med* 1997;38:112-8.
- [49] Meijs WE, Haisma HJ, Van der Schors R, Wijbrandts R, Van den Oever K, Klok RP, et al. A facile method for the labeling of proteins with zirconium isotopes. *Nucl Med Biol* 1996;23:439-48.
- [50] Tinianow JN, Gill HS, Ogasawara A, Flores JE, Vanderbilt AN, Luis E, et al. Site-specifically 89Zr-labeled monoclonal antibodies for ImmunoPET. *Nucl Med Biol* 2010;37:289-97.
- [51] Bonneville M. Lymphocytes : Gamma Delta. . *Encyclopedia of life science* 2001.
- [52] Fournié J.J. A la frontière de l'immunité inée et de l'immunité adaptative: les lymphocytes T gamma delta. . *Revue Immunologie Clinique et allergologie : les Lymphocytes T gamma delta* 2003.
- [53] O'Brien RL. gammadelta T-cell receptors: functional correlations. . *Immunol Rev.*, 2007;215:p. 77-88.
- [54] Casetti R and Martino A. The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy. *Cellular & molecular immunology* 2008;5:161-70.
- [55] Belmant. Phosphoantigens ans aminobiphosphonates : New leads targeting gammadelta T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Drug discovery Today : Therapeutic strategies* 2006;3.
- [56] Chien YH and Konigshofer Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunological reviews* 2007;215:46-58.
- [57] Salot S, Laplace C, Saiagh S, Bercegeay S, Tenaud I, Cassidanius A, et al. Large scale expansion of gamma 9 delta 2 T lymphocytes: Innacell gamma delta cell therapy product. *Journal of immunological methods* 2007;326:63-75.
- [58] Viey E, Fromont G, Escudier B, Morel Y, Da Rocha S, Chouaib S, et al. Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* 2005;174:1338-47.
- [60] Li J, Herold MJ, Kimmel B, Muller I, Rincon-Orozco B, Kunzmann V, et al. Reduced expression of the mevalonate pathway enzyme farnesyl pyrophosphate synthase unveils recognition of tumor cells by Vgamma9Vdelta2 T cells. *J Immunol* 2009;182:8118-24.

- [61] Vantourout P, Mookerjee-Basu J, Rolland C, Pont F, Martin H, Davrinche C, et al. Specific requirements for Vgamma9Vdelta2 T cell stimulation by a natural adenylated phosphoantigen. *J Immunol* 2009;183:3848-57.
- [62] Fiore F, Castella B, Nuschak B, Bertieri R, Mariani S, Bruno B, et al. Enhanced ability of dendritic cells to stimulate innate and adaptive immunity on short-term incubation with zoledronic acid. *Blood* 2007;110:921-7.
- [63] Fournié JJ. A la frontière de l'immunité inée et de l'immunité adaptative: les lymphocytes T gamma delta. *Revue Immunologie Clinique et allergologie : les Lymphocytes T gamma delta* 2003.
- [64] Schultze JL and Nadler LM. T cell mediated immunotherapy for B cell lymphoma. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 1999;77:322-31.
- [65] Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T, et al. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003;102:200-6.
- [66] Yi Q, Szmania S, Freeman J, Qian J, Rosen NA, Viswamitra S, et al. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy in multiple myeloma: intranodal injections of idiotype-pulsed CD40 ligand-matured vaccines led to induction of type-1 and cytotoxic T-cell immune responses in patients. *British journal of haematology*;150:554-64.
- [67] Kato Y, Tanaka Y, Hayashi M, Okawa K, and Minato N. Involvement of CD166 in the activation of human gamma delta T cells by tumor cells sensitized with nonpeptide antigens. *J Immunol* 2006;177:877-84.
- [68] Tanaka Y. Human gamma delta T cells and tumor immunotherapy. *J Clin Exp Hematop* 2006;46:11-23.
- [69] Kabelitz D, Wesch D, and He W. Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. *Cancer research* 2007;67:5-8.
- [70] Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, Devilder MC, Allain-Maillet S, Fournie JJ, et al. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunological reviews* 2007;215:123-35.
- [71] Girlanda S, Fortis C, Belloni D, Ferrero E, Ticozzi P, Sciorati C, et al. MICA expressed by multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance plasma cells Costimulates pamidronate-activated gammadelta lymphocytes. *Cancer research* 2005;65:7502-8.
- [72] Girardi M. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *The Journal of investigative dermatology* 2006;126:25-31.
- [73] Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennouna J, Mosnier JF, Scotet E, et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol* 2005;175:5481-8.
- [74] Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, Todaro M, Buccheri S, Cicero G, et al. In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clinical and experimental immunology*;161:290-7.
- [75] Sturm E, Braakman E, Fisch P, Vreugdenhil RJ, Sondel P, and Bolhuis RL. Human V gamma 9-V delta 2 T cell receptor-gamma delta lymphocytes show specificity to Daudi Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol* 1990;145:3202-8.
- [76] L'Faqihi FE, Guiraud M, Dastugue N, Brousset P, Le Bouteiller P, Halary F, et al. Acquisition of a stimulatory activity for Vgamma9/Vdelta2 T cells by a Burkitt's lymphoma cell line without loss of HLA class I expression. *Human immunology* 1999;60:928-38.
- [77] Hebbeler AM, Cairo C, Cummings JS, and Pauza CD. Individual Vgamma2-Jgamma1.2+ T cells respond to both isopentenyl pyrophosphate and Daudi cell stimulation: generating tumor effectors with low molecular weight phosphoantigens. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:819-29.
- [78] Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, et al. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood* 2005;105:251-8.

- [79] Riganti C, Massaia M, Davey MS, and Eberl M. Human gammadelta T-cell responses in infection and immunotherapy: common mechanisms, common mediators? *European journal of immunology* 2012;42:1668-76.
- [80] Braza MS and Klein B. Anti-tumour immunotherapy with Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. *British journal of haematology* 2013;160:123-32.
- [81] Abe Y, Muto M, Nieda M, Nakagawa Y, Nicol A, Kaneko T, et al. Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated Vgamma9gammadelta T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Experimental hematology* 2009;37:956-68.
- [82] Botti C, Negri DR, Seregini E, Ramakrishna V, Arienti F, Maffioli L, et al. Comparison of three different methods for radiolabelling human activated T lymphocytes. *Eur J Nucl Med* 1997;24:497-504.
- [83] Mather SJ and Ellison D. Reduction-mediated technetium-99m labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 1990;31:692-7.
- [84] Sharkey RM, Rossi EA, McBride WJ, Chang CH, and Goldenberg DM. Recombinant bispecific monoclonal antibodies prepared by the dock-and-lock strategy for pretargeted radioimmunotherapy. *Semin Nucl Med* 2010;40:190-203.
- [85] Hnatowich DJ, Virzi F, and Rusckowski M. Investigations of avidin and biotin for imaging applications. *J Nucl Med* 1987;28:1294-302.
- [86] Frampas E, Rousseau C, Bodet-Milin C, Barbet J, Chatal JF, and Kraeber-Bodere F. Improvement of radioimmunotherapy using pretargeting. *Front Oncol* 2013;3:159.
- [87] He J, Liu G, Gupta S, Zhang Y, Rusckowski M, and Hnatowich DJ. Amplification targeting: a modified pretargeting approach with potential for signal amplification-proof of a concept. *J Nucl Med* 2004;45:1087-95.
- [88] Cesano A, Visonneau S, Tran T, and Santoli D. Biodistribution of human MHC non-restricted TALL-104 killer cells in healthy and tumor bearing mice. *International journal of oncology* 1999;14:245-51.
- [89] Tokuyama H, Hagi T, Mattarollo SR, Morley J, Wang Q, Fai-So H, et al. V gamma 9 V delta 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs--rituximab and trastuzumab. *International journal of cancer* 2008;122:2526-34.
- [90] HAS. Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique : myélome multiple. Décembre 2010.
- [91] Delorme S and Baur-Melnyk A. Imaging in multiple myeloma. *European journal of radiology* 2009;70:401-8.
- [92] Delorme S and Baur-Melnyk A. Imaging in multiple myeloma. Recent results in cancer research. *Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* 2011;183:133-47.
- [93] WALKER RC. Imaging of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *The journal of nuclear medicine* 2012;53:1091-100.
- [94] BARTEL T. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging technique and prognostic factors in multiple myeloma. *BLOOD*.
- [95] Allegra A, Penna G, Alonci A, Russo S, Greve B, Innao V, et al. Monoclonal antibodies: potential new therapeutic treatment against multiple myeloma. *European journal of haematology* 2013.
- [96] van de Donk NW, Kamps S, Mutis T, and Lokhorst HM. Monoclonal antibody-based therapy as a new treatment strategy in multiple myeloma. *Leukemia* 2012;26:199-213.
- [97] van der Veer MS, de Weers M, van Kessel B, Bakker JM, Wittebol S, Parren PW, et al. The therapeutic human CD38 antibody daratumumab improves the anti-myeloma effect of newly emerging multi-drug therapies. *Blood cancer journal* 2011;1:e41.
- [98] Fryer RA, Graham TJ, Smith EM, Walker-Samuel S, Morgan GJ, Robinson SP, et al. Characterization of a novel mouse model of multiple myeloma and its use in preclinical therapeutic assessment. *PloS one* 2013;8:e57641.

- [99] Perk LR, Visser OJ, Stigter-van Walsum M, Vosjan MJ, Visser GW, Zijlstra JM, et al. Preparation and evaluation of (89)Zr-Zevalin for monitoring of (90)Y-Zevalin biodistribution with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33:1337-45.
- [100] Severin GW, Engle JW, Barnhart TE, and Nickles RJ. 89Zr radiochemistry for positron emission tomography. *Medicinal chemistry* 2011;7:389-94.
- [101] Glick AF, Song YS, Hwang B, Lillvis J, Zanzonico P, Fuchs C, et al. Age matters: Young T lymphocytes offer better protection from myeloma proliferation. *Immunity & ageing* : I & A 2013;10:5.

## LYMPHOMA IMAGING IN SMALL ANIMAL: DEVELOPMENT OF TUMOR RADIOTRACER AND STUDY OF CELL BIODISTRIBUTION

This work was to study lymphoma following two approaches based on imaging in small animals. The first was to develop a tumor radiotracer: the rituximab labeled with technetium 99 metastable. A radiolabeling method based on the use of the tricarbonyl compound without specific reduction of the antibody has been selected. *In vitro* and *in vivo* experiments in mice xenografted with human lymphoma showed tumor detection at 24h. To visualize a later tumor recruitment, studies with Zirconium 89, a  $\beta +$  emitter was started. The second approach focused on the biodistribution study of T cells gamma delta which have antitumor properties. After radiolabeling with technetium -99m HMPAO or oxinate indium 111 distribution in mice revealed bioaccumulation in the lungs, liver, spleen, bones and a tumor recruitment at 48h.

**AUTEUR : CHARLOTTE FONTAN**

**TITRE :**

**IMAGERIE DU LYMPHOME CHEZ LE PETIT ANIMAL : MISE EN PLACE DE  
RADIOTRACEURS TUMORAUX ET ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION CELLULAIRE**

**DIRECTEUR DE THESE : MATHIEU TAFANI**

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : TOULOUSE LE 23 SEPTEMBRE 2013**

---

**RESUME en français**

Ce travail a consisté à étudier le lymphome suivant 2 approches reposant sur l'imagerie chez le petit animal. La première a consisté à développer un radio traceur tumoral : le rituximab marqué avec l'isotope radioactif de référence, le technetium 99 métastable. Une méthode de radiomarquage reposant sur l'utilisation du cœur tricarbonyle sans étape de réduction spécifique de la molécule a été choisie. Des expériences *in vitro* et *in vivo* chez des souris greffées avec des lymphomes humains ont montré une détection tumorale à 24h. Pour visualiser un recrutement tumoral tardif, le marquage avec le zirconium 89, émetteur  $\beta^+$  a été débuté. La seconde approche a étudié la biodistribution des cellules aux propriétés anti tumorales, les lymphocytes T gamma delta. Après radiomarquage avec du technetium 99m HMPAO ou avec de l'oxinate d'indium 111, la distribution chez les souris a révélé une bioaccumulation dans les poumons, le foie, la rate et les os. et un recrutement tumoral à 48h.

---

**MOTS-CLES**

**Imagerie métabolique, lymphome, radiotraceur tumoral, rituximab, lymphocyte T gamma delta composé tricarbonyle technétii, technétium 99m métastable, zirconium 89, indium 111, gamma caméra petit animal**

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE**

**ED GEET : Génie Electrique**

---

**Unité INSERM U 825 : Imagerie cérébrale et handicaps neurologique (UPS Toulouse III)**

**CHU PURPAN - Pavillon BAUDOT- Place du Dr Baylac 31024 TOULOUSE CEDEX 3**