



HAL
open science

Radiomarquage au ^{99m}Tc des IgA et IgG : optimisation du marquage, étude in vitro, biodistribution chez l'animal sain et sur modèle tumoral

Hélène Carpenet Guéry

► **To cite this version:**

Hélène Carpenet Guéry. Radiomarquage au ^{99m}Tc des IgA et IgG : optimisation du marquage, étude in vitro, biodistribution chez l'animal sain et sur modèle tumoral. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2015. Français. NNT : 2015LIMO0074 . tel-01423871

HAL Id: tel-01423871

<https://theses.hal.science/tel-01423871>

Submitted on 1 Jan 2017

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

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

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

Equipe de recherche EA 3842 Homéostasie et Pathologies Cellulaires

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Biologie Santé

présentée et soutenue par

Hélène Carpenet Guery

le 10 Décembre 2015

Radiomarquage au ^{99m}Tc des IgA et IgG: optimisation du marquage, étude *in vitro*, biodistribution chez l'animal sain et sur modèle tumoral

Thèse dirigée par Pr Jacques Monteil et Dr Isabelle Quelven-Bertin

JURY :

Pr. André Pèlerin, DR, IRCM, Université de Montpellier - Rapporteur

Dr. Jean-André Mathieu Tafani, MCU-PH, UMR 825, Université de Toulouse - Rapporteur

Pr. Marie-Odile Jauberteau, PU-PH, EA 3842, Université de Limoges - Examineur

Pr. Jean-Claude Aldigier, PU-PH, CRIBL UMR CNRS 7276, Université de Limoges - Examineur

Pr. Jacques Monteil, PU-PH, EA 3842, Université de Limoges - Directeur de thèse

Dr. Isabelle Quelven-Bertin, MCU-PH, EA 3842, Université de Limoges - Directeur de thèse

Remerciements

A nos rapporteurs,

Monsieur le Professeur André PÈLEGRIN,

Recevez, Monsieur, tous mes remerciements pour m'avoir fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être rapporteur. Je tiens à vous exprimer ma plus sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Jean-André Mathieu TAFANI,

Recevez, Monsieur, tous mes remerciements pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et d'en être rapporteur. Je tiens à vous exprimer tout mon profond respect.

A nos Juges,

Madame le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN,

Recevez, Madame, tous mes remerciements pour l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de faire partie du jury, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et avoir été accessible durant ces années de thèse. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Jean-Claude ALDIGIER,

Recevez, Monsieur, tous mes remerciements pour l'honneur que vous me faites d'être présent dans ce jury. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

A nos Directeurs,

Monsieur le Professeur Jacques MONTEIL,

Je tiens à vous exprimer ici toute ma gratitude d'avoir codirigé mon travail au cours de ces cinq années de thèse. Je vous suis particulièrement reconnaissante, non seulement pour votre aide, votre accessibilité, et la confiance que vous m'avez accordée dès mon arrivée dans le service, mais aussi pour avoir su garder une atmosphère de travail stimulante et chaleureuse aussi bien en français qu'en anglais !

Madame le Docteur Isabelle QUELVEN BERTIN,

Ça y est nous y sommes !!! Je pense que ces quelques mots ne suffiront pas à exprimer toute la gratitude que j'ai pour toi. Je suis fière d'avoir été ta première thésarde et d'avoir pu mener à bien ce que j'appelle maintenant une folie ! Ça n'a pas été facile d'arriver à ce moment... Une bien longue route avec des hauts et des bas. Au cours de ces années avec nos nombreuses

soirées « manip » ou « anglais », nous avons pu nous découvrir et nous apprécier. J'espère pouvoir continuer à travailler à tes côtés. Je tenais à t'exprimer toute mon amitié et mon admiration.

A toute l'équipe de l'EA 3842,

Je tiens à remercier toute l'équipe - Homéostasie cellulaire et Pathologies -, pour m'avoir accueillie durant ma thèse et permis de faire ce travail dans de bonnes conditions. Je tiens à remercier tout particulièrement Aurélie Perraud, Aurélie Lacroix, Carole Mélin et Romain Bibes pour vos compétences scientifiques, votre gentillesse et votre enthousiasme. Merci pour la « culture cellulaire » et pour toutes les « manips d'Anapath ».

A toute l'équipe du Service de Médecine Nucléaire,

Merci beaucoup. Et en particulier aux préparateurs qui m'ont aidée pour mes nombreuses « manips » et aux manipulateurs, qui ont réalisé les jolies scintigraphies des souris.

A mes co-internes de Radiopharmacie,

Merci à Anne-So, Sophie et Charlène... Nous avons passé tellement de bons moments dans ce service!

A toute l'équipe du Laboratoire B Cell Design,

Merci pour avoir fourni notre précieux matériel. Merci pour vos enseignements et votre disponibilité. Je tiens à remercier notamment Armelle Cuvillier pour ses compétences, ses précieux conseils et sa disponibilité malgré un emploi du temps bien chargé.

A M. François Dalmay (INSERM UMR-S 1094 NET),

Merci de nous avoir beaucoup aidé pour réaliser les nombreuses statistiques.

Au laboratoire Covidien,

Pour nous avoir fourni nos kits d'Isolink® si importants pour notre radiomarquage.

Je tiens finalement à remercier tous mes proches.

Mes parents,

Enfin !!! Je vais pouvoir vous dire « c'est fini !!! ». Tout simplement merci de m'avoir toujours soutenue et encouragée. Je vous aime.

Mes deux « petits » frères, Misa et Mes grands parents,

Merci de m'avoir toujours écoutée et épaulée. Je mesure la chance que j'ai de vous avoir.

Ma famille, ma belle famille et toute notre bande de copains.

Mes copines présentes tous les jours pour écouter mes galères : Flo, Gaw, Ju, Sonia...

A Louisa et Paul,

Merci d'être là mes petits amours...

A Nico,

Juste merci pour tout ce que tu m'apportes. Sans toi, cette thèse n'aurait certainement jamais vu le jour, j'aurais craqué avant ! Je t'aime plus que tout.

Résumé

Depuis leur découverte en 1975 par Köhler et Milstein, le monde des Ac monoclonaux a beaucoup évolué. Ils occupent actuellement une place prépondérante dans la prise en charge de nombreux cancers. De nos jours, les Ac monoclonaux, ayant une AMM ou en essai clinique, sont tous de classe IgG voire IgG1. Cette classe d'Ac a cependant montré des limites à son utilisation, et l'étude d'autres isotypes d'Ac, comme les IgA, pourrait être intéressante. Les IgA, isotype d'Ac particulier en raison notamment de leur hétérogénéité dans les formes moléculaires, demeurent peu étudiées à l'instar des IgG. Dans ce travail, nous proposons un radiomarquage des IgA monomériques, polymériques et sécrétoires, avec le ^{99m}Tc par une méthode indirecte impliquant le 2-iminothiolane et le cœur tricarbonyl. Par le biais de ce radiomarquage, la biodistribution des IgA monomériques et polymériques après administration i.v. a été évaluée chez l'animal sain et chez l'animal porteur de tumeur à localisation muqueuse. Ces études nous ont permis d'entrevoir le potentiel diagnostique des IgA, mais aussi leur intérêt en thérapie ciblée de tumeurs à localisation muqueuse. D'autre part, grâce à leur résistance enzymatique et au phénomène de retranscytose, une nouvelle voie d'administration des Ac monoclonaux pourrait être développée. Dans cette optique, des IgA sécrétoires ont été administrées par voie orale lors d'études préliminaires de biodistribution.

Abréviations

Ac : Anticorps
ADCC : Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps
ACE : Antigène CarcinoEmbryonnaire
AcM : Anticorps monoclonaux
Ag : Antigène
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ARA : Arachide
ATCC : American Type Culture Collection
ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation
ASGP-R : Asialoglycoprotein Receptor
B ou Bound : Concentration en récepteurs occupés par le ligand
BCA : BiCinchoninic Acid assay
BCR : Récepteur pour l'antigène des lymphocytes B
BFCA : BiFunctional Chelate Agent
Bmax : Capacité maximale de liaison de récepteurs
Bq : Becquerel
BNS : Fixation non spécifique
BS : Fixation spécifique
BSA : Albumine from Bovine Serum
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CCR : Cancer Colorectal
CD : Cluster de Différenciation
CDC : Cytotoxicité Dépendante du Complément
CDR : région déterminant la complémentarité avec l'Ag
Ci : Curie
DCI : Dénomination Commune Internationale
DTNB : Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque ou réactif d'Ellman
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EMA : European Medicines Agency
¹⁸F : Fluor 18
F ou Free: concentration en ligand libre
Fab : Fragment antigen-binding
Fc : Fragment cristallisable
FDA : Food and Drug Administration
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
Fr : Framework
GAMMAPRIM : Transgenic mice for the C Gamma Gene Human Class-G Immunoglobulins
HAMA : Human Anti-Mouse Antibodies
HAMIGA : Humanised Antibody Made Up Of Monoclonal Immunoglobulin A
HAS : Haute Autorité de Santé
HNPCC : Cancer colorectal héréditaire sans polypose ou Syndrome de Lynch
HSA : Albumine Sérique Humaine
¹²³I : Iode 123

^{131}I : Iode 131

Ig : Immunoglobuline

dIgA : Immunoglobuline A dimérique

mIgA : Immunoglobuline A monomérique

pIgA : Immunoglobuline A polymérique

SIgA : Immunoglobuline A sécrétoire

IgG : Immunoglobuline G

IRF : Fraction ImmunoRéactive

IL : Interleukine

^{111}In : Indium 111

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

IV : Intraveineuse

2-IT : 2-Iminothiolane

ITLC-SG : Instant Thin-Layer Chromatography-Gel de Silice

Kd : Constante de dissociation

kDa : kilodalton

keV : kiloélectronvolt

LNH : Lymphome Non Hodgkinien

M : mole par litre

MRP : Médicament RadioPharmaceutique

NK : Cellule Natural Killer

PAF : Polypose Adénomateuse Familiale

PBS : Phosphate Buffer Alkaline

PEG : Polyéthylène Glycol

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase

pIgR : Récepteur d'Immunoglobulines Polymériques

PRC : Pureté RadioChimique

PVDF : Polyvinylidène Fluoride

REA : Radioélément Artificiel

RIS : RadioImmunoScintigraphie

RIT : RadioImmunoThérapie

RIV : Radiothérapie Interne Vectorisée

S : Svedberg

SH : thiol (groupement)

T : concentration totale en ligand ajoutée

TAA : Antigènes Associés aux Tumeurs

$^{99\text{m}}\text{Tc}$: Technétium 99 métastable

TDM : Tomodensitométrie

TEL : Transfert Linéique d'Energie

TEMP : Tomographie par Emission MonoPhotonique (ou SPECT en Anglais)

TEP : Tomographie par Emission de Positron (ou PET en Anglais)

TfR : Récepteur de la Transferrine

TNF : Facteur de Nécrose Tumorale

TNM : Tumor, Node, Metastasis

^{90}Y : Yttrium 90

Sommaire

Remerciements	2
Résumé	5
Abréviations	6
Sommaire	8
Introduction générale	10
Chapitre 1: Revue bibliographique	13
I. Les immunoglobulines et leurs applications	13
A. Les immunoglobulines.....	13
B. Les anticorps monoclonaux.....	23
C. L'immunoglobuline G.....	27
D. Les anticorps optimisés.....	36
E. L'immunoglobuline A.....	41
II. Les pathologies et les antigènes ciblés	56
A. Les Lymphomes non Hodgkiniens.....	56
B. Le Cancer colorectal.....	63
III. Radiomarquage des anticorps et applications	70
A. Rappels de radioactivité.....	71
B. Applications des radioisotopes en thérapie et principaux REA utilisés pour le radiomarquage des Ac.....	76
C. Applications des radioisotopes en imagerie et principaux REA utilisés pour le radiomarquage des Ac.....	80
D. Radiomarquage au technétium 99m	88
Chapitre 2: Travail personnel	103
I. Premier partie : Radiomarquage des immunoglobulines G anti-CD20 avec le ^{99m}Tc-Tricarboxyl : évaluations <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	104
A. Introduction.....	104
B. Etudes préliminaires.....	105

C. Article : « Anti-CD20 immunoglobulin G radiolabeling with a ^{99m} Tc-tricarbonyl core: <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> evaluations »	113
D. Principaux résultats et discussion de l'article	131
II. <u>Deuxième partie : Radiomarquage des Immunoglobulines A anti-ACE par le ^{99m}Tc et études de biodistribution</u>	134
A. Introduction.....	134
B. Etudes préliminaires.....	135
C. Article : “ ^{99m} Tc radiolabeling of anti-CEA IgA: biodistribution and tumor uptake studies”	138
D. Résultats et discussion du deuxième article	167
E. Résultats complémentaires : radiomarquage des IgA sécrétoires anti-ACE et étude préliminaire de biodistribution après administration orale	169
Chapitre 3: Discussion générale et perspectives	174
I. <u>Optimisation d'une technique de radiomarquage des anticorps</u>	174
II. <u>Etude de biodistribution des IgA versus IgG chez l'animal sain</u>	175
III. <u>Etude de biodistribution des IgA versus IgG chez l'animal porteur de tumeur</u>	176
IV. <u>Perspectives et limites des IgA</u>	177
Conclusion	179
Bibliographie	180
Table des matières	194
Table des illustrations	199
Table des tables	201

Introduction générale

Les anticorps monoclonaux (AcM) ont été découverts en 1975 par César Milstein et Georges Köhler, qui ont développé la technique de fusion cellulaire et de sélection des cellules hybrides appliquées aux lymphocytes B primaires d'animaux immunisés. La synthèse des hybridomes a permis tout d'abord de générer des anticorps monoclonaux à des fins de recherche fondamentale et de diagnostic. Ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard, en 1986, que le premier anticorps monoclonal à visée thérapeutique, le muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3[®]) a été mis sur le marché. Depuis ce jour, le monde des anticorps monoclonaux n'a cessé d'évoluer avec le développement d'anticorps monoclonaux de moins en moins immunogènes et de plus en plus spécifiques d'une cible d'intérêt. En 2013, 338 anticorps monoclonaux sont en développement et une trentaine ont une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), dont deux dans des indications à visée diagnostique en Médecine Nucléaire. Les anticorps monoclonaux utilisés aujourd'hui sont tous de classe immunoglobuline G (IgG), voire de sous-classe IgG1. En effet, cette sous-classe d'Ig possède des caractéristiques particulièrement intéressantes pour des indications en thérapie : lyse due au complément, cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, apoptose...

Cependant, malgré leur principe séduisant, le monopole de l'IgG sur le marché des AcM ainsi que les nombreuses recherches sur cette classe ont laissé entrevoir certaines limites concernant leur utilisation, comme de faibles capacités de diffusion cellulaire ou une longue demi-vie sérique. La connaissance de ces limitations encourage le développement de variants d'anticorps mais aussi l'exploration des autres classes d'anticorps. Les Immunoglobulines A (IgA) suscitent aujourd'hui un regain d'intérêt en particulier dans des indications concernant des tumeurs à localisation muqueuse. Leurs particularités fonctionnelles, comme leur tropisme naturel vers les muqueuses, pourraient faire espérer de nouvelles applications en diagnostic comme en thérapie dans certains types de tumeurs moins accessibles aux IgG. Les connaissances sur les IgA et leurs applications sont beaucoup plus restreintes compte tenu de la difficulté de les produire. Peu de données sont disponibles sur leur pharmacocinétique. Aucune immunoglobuline A n'est utilisée chez l'homme en thérapie. Enfin, les IgA n'ont jamais été utilisées en imagerie isotopique, chez l'homme ou chez l'animal.

Récemment, un modèle de souris humanisées permettant la production d'IgA a été breveté : il s'agit de la technologie HAMIGA (Humanised Antibody Made Up Of Monoclonal Immunoglobulin A). Ce brevet est exploité par la société B-Cell Design avec qui nous avons collaboré pour ce projet. Il permet de produire l'IgA en quantité exploitable et donc d'envisager d'étudier plus précisément l'intérêt des IgA en thérapie et en diagnostic.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous proposons de radiomarquer les IgA à partir d'une méthode mise au point et optimisée sur les IgG, puis dans un second temps d'étudier ces molécules radiomarquées *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. L'intérêt du radiomarquage des IgA est double :

- Etudier la biodistribution des IgA afin notamment de la comparer à celle des IgG. Comme nous l'avons dit, aucune étude de pharmacocinétique n'a été réalisée sur les IgA. L'imagerie isotopique permet de pouvoir suivre avec précision la distribution d'une molécule radiomarquée dans l'organisme d'un animal au cours du temps.
- Etudier la capacité de ciblage des tumeurs par les IgA et en particulier des tumeurs à localisation muqueuse. Ces résultats pourraient permettre d'envisager des applications de ces Ac monoclonaux en thérapie ou en diagnostic.

Pour ce projet, nous avons décidé de cibler deux antigènes, le CD20 et l'Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE) :

- Le CD20 est un marqueur tumoral du lymphome non hodgkinien. Il a été choisi comme cible car actuellement les immunoglobulines G anti-CD20 sont très appliquées en immunothérapie et en RIT et ont fait preuve de leur efficacité dans cette indication. L'anticorps commercial, le rituximab (Mabthera®) a été utilisé pour la mise au point du radiomarquage et les études *in vitro* et *in vivo* de la molécule radiomarquée.
- L'ACE est un marqueur tumoral du cancer colorectal. Il a été choisi comme cible en particulier pour exploiter le tropisme des immunoglobulines A vers les épithéliums muqueux. Une IgA et une IgG de même antigénicité ont été synthétisées par la société B Cell Design afin de pouvoir comparer le comportement des deux classes d'anticorps.

Après une revue bibliographique sur les immunoglobulines et leurs applications, nous présenterons les antigènes d'intérêt et plus largement les pathologies exprimant ces antigènes. La dernière partie bibliographique sera consacrée au radiomarquage et aux applications des radiotraceurs, en détaillant plus particulièrement les marquages au ^{99m}Tc , radioélément que nous avons choisi d'utiliser dans ce projet.

Notre travail sera ensuite présenté à partir de deux publications. La première publication porte sur la mise au point du radiomarquage de l'IgG anti-CD20 au ^{99m}Tc . Ces immunoglobulines radiomarquées ont été évaluées *in vitro* (intégrité, immunoaffinité) et *in vivo* (biodistribution chez l'animal sain, ciblage tumoral chez l'animal porteur de tumeur) afin de s'assurer que le radiomarquage est stable et n'altère pas les propriétés de l'anticorps.

La seconde publication présente l'optimisation et l'évaluation *in vitro* du radiomarquage de l'IgA anti-ACE au ^{99m}Tc . Les comportements des IgA monomériques, polymériques et des IgG de même antigénicité ont ensuite été comparés par des études de biodistribution chez l'animal sain. Finalement, le potentiel des IgA anti-ACE à cibler des tumeurs à localisation muqueuse a été évalué chez l'animal porteur de tumeur colorectale (après greffe orthotopique dans le caecum).

Une discussion générale de ce travail cloturera ce manuscrit et présentera les perspectives envisageables.

Chapitre 1: Revue bibliographique

Cette revue bibliographique est divisée en trois parties. La première partie a pour objet la présentation des immunoglobulines et de leurs applications en s'attardant plus particulièrement sur les, immunoglobulines G et A. La seconde partie s'intéresse, à deux cancers exprimant les antigènes que nous avons choisis de cibler dans notre étude. La dernière partie présente les principaux radioéléments utilisés en thérapie et diagnostic, en se focalisant sur le ^{99m}Tc et la stratégie de radiomarquage des anticorps.

I. Les immunoglobulines et leurs applications

A. Les immunoglobulines

1. *Structure des immunoglobulines*

C'est en 1939, que Tiselius et Kabat ont séparé par différence de migration électrophorétique à partir d'un sérum, l'albumine, et les différentes fractions de globulines : alpha globuline, bêta globuline, et gammaglobuline (Schroeder et Cavacini, 2010). On distingue ainsi les alpha (1 et 2), les bêta (1 et 2) et les gamma-globulines dans l'ordre des vitesses de migration décroissantes.

Les immunoglobulines produites par les cellules B, sont retrouvées en majorité dans la fraction sérique des gammaglobulines. Chez l'homme cinq classes d'immunoglobuline (Ig) existent : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Les Ig peuvent être liées à la membrane du lymphocyte B, dans ce cas elles jouent le rôle de structure de reconnaissance du lymphocyte B ou BCR spécifique de l'antigène (immunoglobulines de surface) ou être sécrétées par ces lymphocytes différenciés en plasmocytes, dans ce cas les Ig sont appelées anticorps (Ac). Qu'elles soient exprimées à la surface ou excrétées, les Ig possèdent une structure générale voisine.

La structure primaire des Ig a pu être précisée par des protéolyses partielles enzymatiques ou chimiques et par des réductions douces des ponts disulfures. Les Ig sont des glycoprotéines (2 à 14% de sucre selon le type d'Ig) constituées de deux chaînes lourdes (H pour Heavy) et de deux chaînes légères (L pour Light) identiques deux à deux. Seules les chaînes lourdes sont glycosylées. Chaque chaîne (lourde ou légère) comprend plusieurs domaines de 110 acides aminés environ constituant ainsi une région constante C et une région

variable V. Alors que les chaînes légères comprennent un domaine variable et un domaine constant seulement, les chaînes lourdes sont constituées par un domaine variable et de trois à quatre domaines constants en fonction de la classe d'Ig (Schroeder et Cavacini, 2010). Il existe 5 types de chaînes lourdes γ , α , μ , δ , et ϵ qui correspondent aux cinq classes d'Ig. Les chaînes lourdes sont unies entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures ; les chaînes légères sont reliées aux chaînes lourdes par un pont disulfure proche de leur extrémité carboxy terminale (Figure 1.A).

Les domaines variables des chaînes L et H comprennent de courts fragments d'une extrême variabilité qualifiés de régions hypervariables ou CDR (Complementary Determining Region). Ils sont au nombre de 3 par chaîne et sont entrecoupés de « tronçons » relativement bien conservés appelés Fr (Framework). Les domaines variables VH et VL associés participent à la constitution du site de fixation de l'antigène, où les CDR correspondent aux zones de contact entre l'Ac et le déterminant antigénique correspondant.

La structure secondaire et la structure tertiaire des Ig sont en partie dues à la présence de ponts disulfures intrachaînes en nombre variable selon la classe (Figure 1.B). Ces ponts se trouvent entre deux cystéines séparées de 60 acides aminés et sont au centre d'une portion polypeptidique appelée domaine. Les domaines sont constitués d'environ 110 acides aminés et présentent une grande homologie. Chaque domaine forme deux ensembles de feuillets Bêta antiparallèles formant une structure tridimensionnelle cylindrique au cœur hydrophobe (Figure 1.C). Cette structure tridimensionnelle répond à la définition de la superfamille des Ig. Chaque domaine est porteur d'une fonction biologique. Les régions constantes des chaînes lourdes s'organisent en plusieurs domaines de nombre variable selon les types et les sous-types d'Ig numérotés CH1 à CH4, CH1 faisant suite à la partie carboxyterminale de VH (Ballot, 2007).

Finalement, la structure quaternaire des Ig est assurée par les ponts disulfure interchaîne. Ces ponts sont situés dans une zone très riche en cystéine, appelée zone charnière.

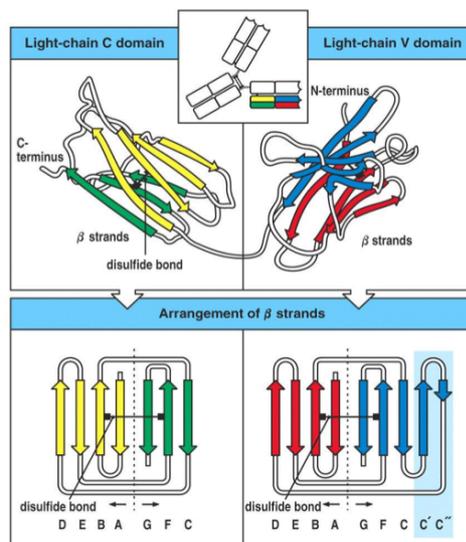
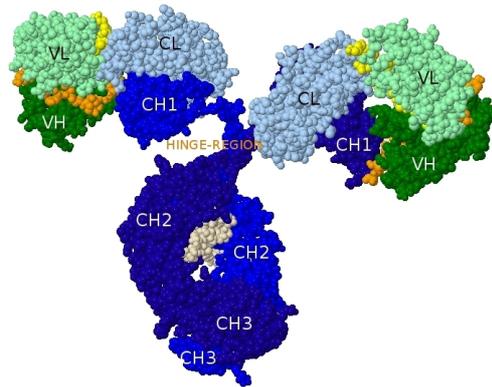
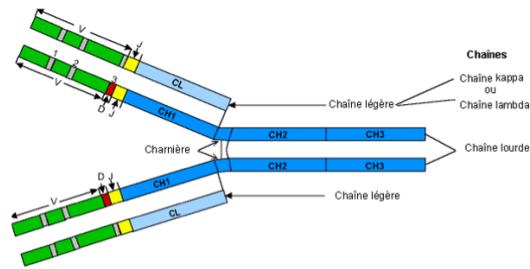


Figure 1 : Structure des Immunoglobulines (Ig)

A. Représentation bi-dimensionnelle d'une Ig

B. Représentation tri-dimensionnelle d'une IgG

VH, VL: régions variables des chaînes lourdes et légères ; CH, CL: régions constantes des chaînes lourdes et légères ; Hinge: région charnière (Site *IMGT*)

C. Représentation en feuillets (Strands) β d'un domaine constant et d'un domaine variable de chaîne légère d'une Ig (Immunobiology Garland Science 2005)

2. Les différentes classes d'anticorps

Les Ig se répartissent en différentes (cinq) classes en fonction de leurs propriétés physicochimiques, leurs structures, leurs concentrations sériques et leurs comportements en tant qu'Ag (Figure 2). Pour cette dernière caractéristique, on parle de déterminant antigénique. Il existe trois niveaux de diversité de déterminant antigénique : isotypie, allotypie et idiotypie. L'isotypie définit les caractères communs à tous les individus d'une même espèce, localisés sur le domaine constant des chaînes lourdes (classe et sous-classe) ou des chaînes légères (type). L'allotypie représente les variations comme des différences structurales ponctuelles sur des acides aminés ou des séquences oligosaccharidiques, situées sur le domaine constant des chaînes lourdes et légères (exemple : locus Am définissant 2 variants sur la chaîne α). L'idiotypie, quant à elle, définit les variations associées au site de liaison à l'antigène, liées à la partie variable des chaînes lourdes et légères des Ig (zones hypervariables).

Les anticorps sont répartis en cinq isotypes, en fonction de leur chaîne lourde c'est à dire IgA : alpha, IgD : delta, IgE : epsilon, IgG : gamma et IgM : mu. Chaque chaîne lourde est associée à une chaîne légère kappa ou lambda. Les IgG, IgD et IgE sont des formes dites monomériques, les IgA et les IgM existent quant à elles, soit sous forme monomérique soit sous forme multimérique. On trouve des formes circulantes, les IgG, A, M et E, mais aussi des formes membranaires, les IgM et D.

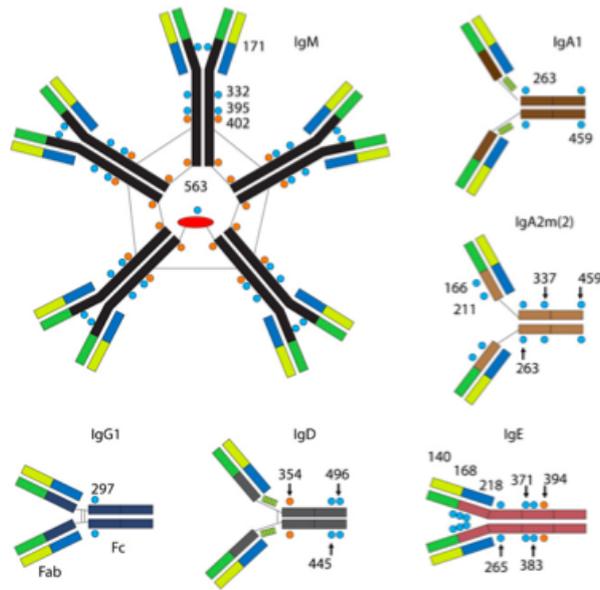


Figure 2 : Les cinq classes d'Ig (d'après Schroeder et Cavacini, 2010)

3. Ontogénèse B et production physiologique des anticorps (Figure 3)

Les Ig sont formées de chaînes lourdes et de chaînes légères, codées par des familles multigéniques séparées, localisées sur des chromosomes différents : 2 (chaînes légères kappa), 14 (chaînes lourdes) et 22 (chaînes légères lambda) (Tonegawa, 1983). Les domaines variable et constant composant ces chaînes sont eux-mêmes, codés par des gènes indépendants : C pour les parties constantes, V, D, J et V, J pour les parties variables des chaînes lourdes et des chaînes légères respectivement. Les Ig sont donc le fruit de l'association aléatoire des différents gènes codant pour les parties variables et constantes des chaînes lourdes et légères. Ainsi, les chaînes légères proviennent de l'association V-J-C tandis que les chaînes lourdes résultent de l'association V-D-J-C (Dudley, 2005). Le système immunitaire possède la capacité de produire jusqu'à 10^{12} Ig différentes, permettant la formation d'Ac contre des Ag jamais rencontrés par l'hôte. Cette extraordinaire diversité est due au nombre important de gènes fonctionnels (environ 150), aux multiples combinaisons possibles, mais aussi à des mutations survenant au niveau des jointures, majoritairement lors du réappariement des gènes VDJ (Meek, 1990).

La biosynthèse des Ig est un processus hiérarchisé. La différenciation B débute dès le stade embryonnaire, se poursuit toute la vie et fait intervenir une phase indépendante et une phase dépendante des Ag.

La phase indépendante des Ag se déroule dans la moelle osseuse et correspond à la différenciation de cellules précurseurs hématopoïétiques en cellules B matures immunocompétentes. C'est au cours de cette phase que les cellules B traversent différents stades de maturation et acquièrent une Ig de surface spécifique le BCR. Cette différenciation se déroule en 3 stades :

- le stade Progéniteur B ou Pro-B, permettant les réarrangements des gènes codant pour les chaînes lourdes des Ig en exprimant 2 enzymes de recombinaison, RAG1/2 et TdT (Terminal deoxyribonucleotidyl Transférase). La 1^{ère} entraîne l'appariement des chaînes lourdes et la 2^{ème} est responsable de l'ajout de nucléotides aux jonctions V-D-J assurant ainsi la diversité des chaînes lourdes (Benedict, 2000).
- le stade Précurseur B ou Pré-B faisant intervenir l'expression d'un Pré-BCR. Si son expression est normale, le Pré-BCR permet aux cellules pré-B d'interagir physiquement avec les niches des cellules stromales, d'y recevoir un signal de survie et de prolifération qui conditionne la poursuite de la maturation. Toute cellule incapable d'assembler son pré-BCR ou d'associer et de transporter à la membrane une chaîne lourde avec une chaîne légère sera éliminée (Kitamura, 1991). L'expression du Pré-BCR permet également l'induction des réarrangements des gènes des chaînes légères.
- le stade B immature est caractérisé par l'expression à la surface de la cellule d'une IgM composée de la chaîne lourde μ et d'une chaîne légère kappa ou lambda. C'est à ce stade qu'un processus de sélection négative aboutit à l'élimination de 40 à 60% des lymphocytes B reconnaissant le soi (Melchers, 1995). Les lymphocytes B deviennent matures lorsqu'ils expriment à leur surface des IgM et des IgD comprenant les mêmes parties variables. Ces lymphocytes B matures immunocompétents dits naïfs peuvent quitter la moelle osseuse et gagner les organes lymphoïdes périphériques tels la rate et les ganglions lymphatiques.

La phase de maturation des lymphocytes B dans ces organes lymphoïdes est désormais dépendante des Ag. En effet, la durée de vie des lymphocytes B va dépendre de leur rencontre ou non avec un Ag : les lymphocytes non stimulés par un Ag vont mourir en quelques jours par apoptose tandis que les cellules activées par un Ag vont recevoir des signaux de survie, proliférer, subir des phénomènes de commutation de classe (switch isotypique) et d'hypermutation somatique. Ces phénomènes, survenant avec l'intervention des lymphocytes TCD4⁺ (environnement cytokinique), permettent la production de tous les isotypes d'Ac et

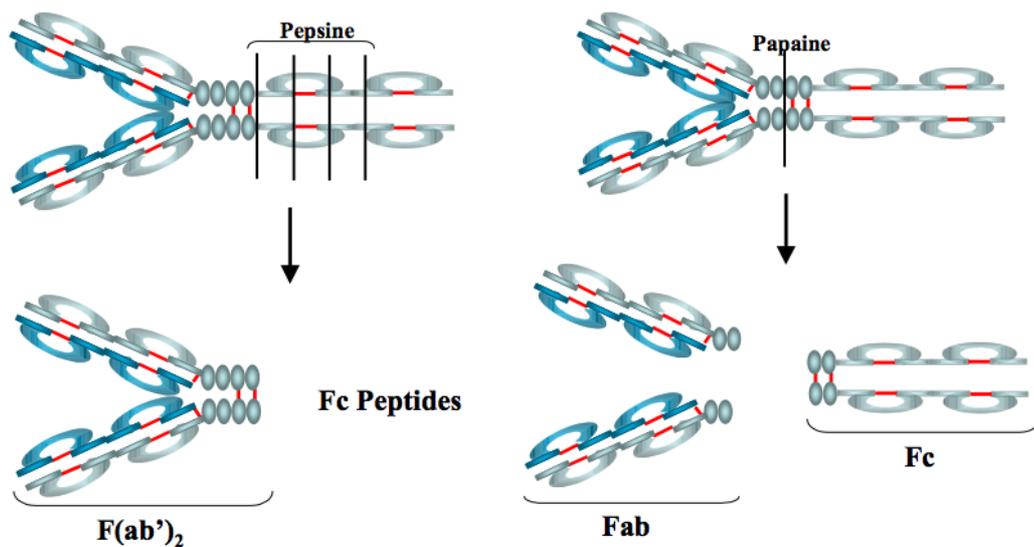


Figure 4 : Hydrolyse enzymatique des immunoglobulines par la papaïne et la pepsine

Ces hydrolyses ont permis de définir trois types de fragments Fab, Fc et F(ab')₂.

Les Ig possèdent une dualité fonctionnelle expliquant leurs propriétés :

- Le fragment Fab : responsable de la liaison à l'antigène
- Le fragment Fc : porteur des fonctions effectrices des Ig

a. Le fragment Fab est responsable de la liaison à l'antigène :

Le paratope sur l'Ac est complémentaire de l'épitope de l'Ag. Cette liaison Ag-Ac est non covalente, elle fait intervenir des liaisons hydrogène, électrostatiques, ou hydrophobes. Elle est caractérisée par une affinité et une avidité que nous détaillerons dans le paragraphe suivant.

b. Le fragment Fc définissant l'isotype et la sous-classe d'Ig est porteur des fonctions effectrices des Ig :

- Liaison du fragment Fc avec le C1q du complément : cette liaison permet d'activer la Cytotoxicité Dépendante du Complément (CDC), voie cytotoxique dépendante du complément (Figure 5). La CDC comprend trois voies : classique, alterne et la voie des lectines. L'activation par le fragment Fc correspond à la voie classique. La cascade du complément aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire et à la lyse de la

cellule cible. La glycosylation des Ig joue un rôle prépondérant dans l'activation de cette fonction.

- Activation de la voie classique après liaison à l'Ag : IgM > IgG1 > IgG3 > IgG2
- Activation de la voie alterne : IgG1, 2, 3 et 4 ou IgA agrégées
- Liaison à des récepteurs spécifiques du Fc, notamment les FcγRs présents sur de nombreuses cellules immunitaires (cellules Natural Killer (NK), monocytes). La liaison de Fc avec ces récepteurs entraîne une activation et une réponse cellulaire comme une phagocytose, un phénomène d'ADCC (Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity). L'ADCC est une autre voie cytotoxique, elle sera abordée plus en détail dans le paragraphe I.C.2. Chaque classe d'Ig possède des récepteurs, ils seront décrits pour les IgG et les IgA.

Le fragment Fc intervient également dans la traversée du placenta et le catabolisme des Ig.

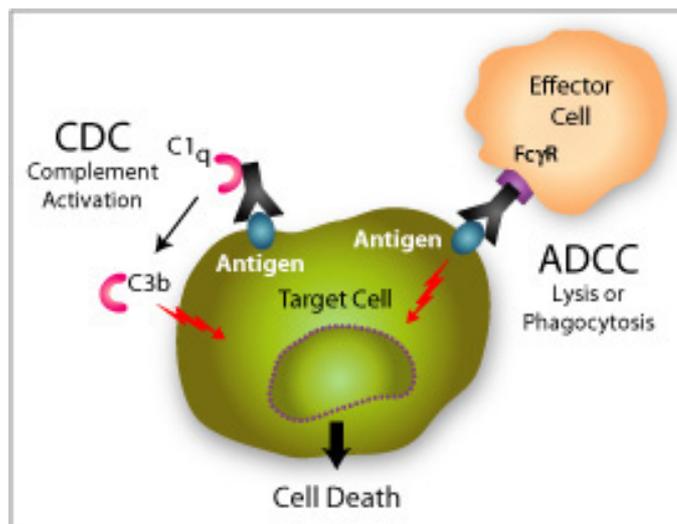


Figure 5 : Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps (ADCC) et Cytotoxicité Dépendante du Complément (CDC)

Deux types de phénomène peuvent permettre d'éradiquer des pathogènes (Target Cell) : un mécanisme faisant intervenir des effecteurs cellulaires (Effector Cell), l'ADCC et un mécanisme faisant intervenir des effecteurs moléculaires (le système du complément), le CDC en activant le C1q. (Site Invivogen)

5. Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques des anticorps

a. Affinité et avidité

La force de l'interaction Ag/Ac se mesure par un paramètre appelé Affinité, pouvant se définir comme la résultante des forces attractives et répulsives établies entre un Ac et un épitope de son Ag (Anthony, 2008). L'affinité quantifiée par la constante de dissociation K_d , correspond au ratio entre la vitesse de dissociation (k_{off}) et la vitesse d'association (k_{on}) d'un paratope pour un épitope lorsque l'interaction Ag/Ac atteint un équilibre. Ce ratio représente la concentration molaire d'Ag nécessaire pour occuper 50% des paratopes. Elle est influencée par les conditions physiologiques du milieu comme la température, la force ionique, l'osmolarité et le pH mais également la maturation de la réponse immunitaire.

Le terme avidité ou affinité fonctionnelle est utilisée lorsque des Ag multivalents sont mis en réaction avec des Ac polyclonaux. Cette notion, dans des conditions physiologiques est préférée à l'affinité puisqu'elle est plus représentative de la réalité : les Ac et les Ag étant le plus souvent multivalents. L'avidité correspond à la combinaison des affinités de chaque liaison paratope/épitope sur un antigène ou l'interaction globale de l'ensemble bivalent ou multivalent de l'Ac avec les différents épitopes de l'Ag (Hornick, 1972). La relation affinité/avidité n'est pas linéaire en fonction de la valence. L'avidité est toujours supérieure à la somme des affinités individuelles notamment grâce à l'influence de la multivalence.

b. Métabolisme et physiologie des immunoglobulines

Les plasmocytes à IgG et IgM sont rencontrés dans tous les organes lymphoïdes secondaires, surtout la rate et les ganglions. Ceux à IgD sont rares et disséminés. Les plasmocytes à IgE sont quant à eux localisés au niveau des muqueuses. Enfin, les plasmocytes à IgA existent dans les ganglions, la rate, mais surtout au niveau de la lamina propria de la muqueuse digestive, dans le chorion des muqueuses respiratoires, des glandes mammaires et salivaires.

Les IgM sont les premières à apparaître après primo-immunisation par voie parentérale, avant d'être progressivement remplacées par des IgG et des IgA. D'importantes quantités d'IgA sécrétoires sont produites en cas d'immunisation par voie digestive ou respiratoire (intérêt de la vaccination par voie orale).

Les IgG ont une demi-vie d'environ 3 semaines (sauf IgG3), comme nous le détaillerons dans le paragraphe concernant les IgG. Les autres classes ont une demi-vie plus courte : de 5 à 7 jours pour les IgA et IgM, et seulement de 2 à 3 jours pour les IgD et IgE.

B. Les anticorps monoclonaux

1. Définition / découverte

Les Ig sont synthétisées *in vivo* par les plasmocytes issus de la différenciation terminale des lymphocytes B. En réaction à une agression, la réponse immunitaire produit des Ac dits polyclonaux. Ces Ac sont d'une grande hétérogénéité, puisqu'il existe un recrutement de nombreux clones lymphocytaires différents. Ils sont de différentes classes, peuvent être de deux allotypes différents chez un sujet hétérozygote. Ils sont capables de reconnaître l'ensemble des déterminants antigéniques avec une affinité plus ou moins importante.

Au contraire les Ac monoclonaux sont de mêmes classe, sous-classe, allotype et possèdent les mêmes idiotypes (variations associées au site de liaison de l'Ag). Köhler et Milstein en 1975, ont synthétisé les premiers Ac monoclonaux, en immortalisant des plasmocytes. Ils ont appliqué la technique de fusion cellulaire et de sélection des cellules hybridomes : après immunisation d'une souris contre un Ag (globule rouge de mouton), les lymphocytes B sains sont mis en culture avec des cellules de myélome de souris non sécréteurs d'Ig (Köhler et Milstein, 1975). La fusion lymphocytes-cellules myélomateuses est assurée par du polyéthylène glycol (Pontecorvo, 1975). Les hybridomes produits présentent les caractéristiques des deux types cellulaires. Les cellules myélomateuses apportent l'immortalité en se multipliant indéfiniment. Les lymphocytes apportent quant à eux, l'information génétique nécessaire et permettent de produire *in vitro* de grandes quantités d'Ac strictement identiques issus d'un clone unique : les Ac monoclonaux (Prin-Mathieu, 2003). Seuls les hybridomes survivent car les lymphocytes normaux, isolés de la rate ou des ganglions vont disparaître au bout de quelques jours en étant effectivement incapables de se répliquer *in vitro*. Les cellules myélomateuses non fusionnées vont quant à elles mourir car elles sont déficientes en une enzyme nécessaire à leur survie dans le milieu de sélection.

Les Ac monoclonaux présentent d'importants avantages par rapport aux Ac polyclonaux du sérum. Les hybridomes qui les produisent, peuvent être cultivés *in vitro* pendant des années et congelés sans modification de l'Ac qu'ils produisent, avec la même

affinité et les mêmes propriétés physicochimiques (Siberil, 2005). Les Ac monoclonaux sont tous dénommés avec la même terminaison caractérisée par le suffixe *-mab*.

2. Des anticorps monoclonaux chimériques aux anticorps monoclonaux humains

L'obtention des Ac monoclonaux murins désignés par le suffixe *-omab* a permis des avancées considérables en recherche fondamentale et clinique, et a suscité de grands espoirs thérapeutiques. Néanmoins leur utilisation a été restreinte chez des patients suite à l'apparition de certaines limites et notamment par la production d'Ac humains anti-souris (HAMA : Human Anti-Mouse Antibodies). Les Ac chimériques ont été développés dans les années 1980, en corrélation avec l'apparition de la PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase). Les Ac chimériques (70% humains) sont des Ac hybrides souris–homme constitués de domaines variables murins et de domaines constants humains et sont désignés par le suffixe *-ximab* (Figure 6). Ces nouveaux types d'Ac dits recombinants ont eu pour conséquence de réduire la réponse HAMA et d'augmenter la cytotoxicité en raison d'une interaction de meilleure affinité avec les récepteurs FcγR présents sur les cellules effectrices des patients car le fragment Fc est humain (Baty, 2006). Ces Ac sont moins immunogènes, et certains patients développent encore une réponse contre ces Ac chimériques (Ac humains dirigés contre les Ac chimériques). La construction d'Ac monoclonaux humanisés a alors été nécessaire, et a consisté à substituer les zones hypervariables (appelées région déterminant la complémentarité avec l'Ag ou « CDR ») d'une IgG humaine par celles de l'Ac monoclonal de souris conférant à l'IgG humaine la spécificité de l'Ac murin parental. Ces Ac sont entre 85 et 90% humains. Ils sont beaucoup moins immunogènes que les précédents, et sont désignés par le suffixe *-zumab* (Figure 7).

Dans les années 1990, pour obtenir des Ac totalement humains, deux approches ont été développées. La première est celle de la construction de banques combinatoires de régions VH et VL humaines, exprimées à la surface de phages (Bourel, 2006). Cette approche a été notamment rendue possible en utilisant des techniques de sélection *in vitro* comme le phage display. Après une sélection par phage display, les domaines VH–VL spécifiques contre l'antigène d'intérêt sont fusionnés aux régions constantes d'IgG humaines pour générer des anticorps humains complets. Une autre approche, visant à l'obtention d'AcM humains se fonde sur l'utilisation de souris transgéniques. Celle-ci a pu être développée grâce à

l'apparition des techniques de transgénèse. Ces souris comportent dans leur génome une grande partie des gènes d'Ac humains (loci des gènes d'Ig de souris remplacés par les loci équivalents humains). Après immunisation avec l'Ag choisi, ces animaux sont capables de produire des Ac humanisés pour tout ou partie de leurs séquences, avec la possibilité de dériver aussi bien des Ac monoclonaux par la technique des hybridomes que des polyclonaux à partir du sérum des animaux (Pascal, 2009). Ces AcM sont désignés par le suffixe *-umab*.

Cette dernière approche impliquant l'utilisation de souris transgéniques a amené l'équipe de recherche du Professeur Cogné à développer deux modèles brevetés : GAMMAPRIM (Transgenic mice for the C Gamma Gene Human Class-G Immunoglobulins) et HAMIGA (Humanised Antibody Made Up Of Monoclonal Immunoglobulin A). Leur génome a été modifié au niveau du locus de la chaîne lourde par introduction d'un gène constant humain ($\alpha 1$ pour HAMIGA et $\gamma 1$ pour GAMMAPRIM). Les Ac produits par ces animaux sont majoritairement des IgA humaines (HAMIGA) ou IgG1 humaines (GAMMAPRIM); ils ne contiennent pas d'IgM et seulement de très faibles quantités des autres classes d'Ig endogènes (Duchez, 2010). B Cell Design, une start-up de Limoges exploite aujourd'hui ce brevet et produit des Ac monoclonaux d'isotype IgA. Les IgA appartiennent à une classe d'Ig qui a été jusque là peu étudiée, et c'est dans ce cadre que notre équipe collabore avec B Cell Design.

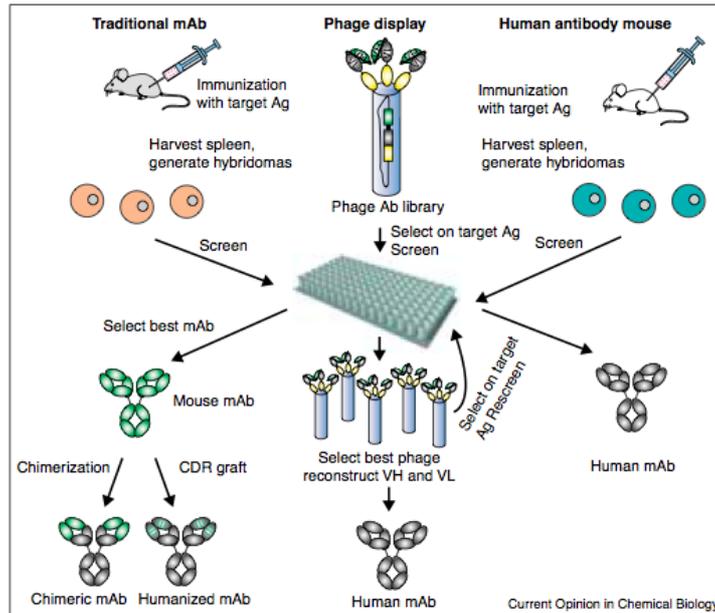


Figure 6 : Génération d'anticorps monoclonaux humains

Trois techniques d'obtention d'Ac monoclonaux avec réduction de l'immunogénicité sont représentées. A gauche, la procédure d'obtention d'Ac chimériques et humanisés est décrite. La procédure d'obtention des Ac humains par Phage Display est représentée au centre et celle par utilisation de souris transgéniques est montrée à droite (van Dijk et van de Winkel, 2001).

Des anticorps murins...

...aux anticorps humains

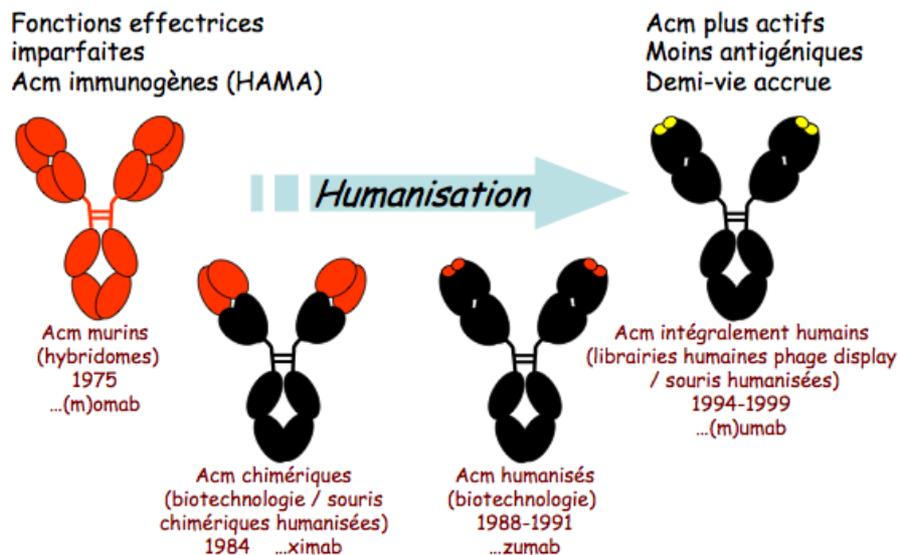


Figure 7 : Evolution de l'humanisation des anticorps monoclonaux (d'après Cogné, 2009)

D'une manière générale, les Ac monoclonaux peuvent être vus comme les « *magic bullets* » imaginées par l'immunologiste Paul Ehrlich au début du XX^{ème} siècle. Celui-ci avait évoqué la création de molécules capables de viser directement, au sein d'un organisme, un certain type de bactérie ou de virus pour le détruire spécifiquement, en épargnant les autres éléments. Les Ac monoclonaux apparaissent ainsi séduisants pour la thérapie et l'imagerie ciblées des cancers, en raison de leur capacité de ciblage hautement spécifique. Les Ac monoclonaux utilisés actuellement sont pour la plupart des IgG ou des variants de celles-ci.

C. L'immunoglobuline G

1. Structure

Toutes les IgG sont monomériques. Ce sont les plus petites Ig avec une masse moléculaire d'environ 150 kiloDaltons (kDa). Ces Ig sont peu glycosylées (3%). En microscopie électronique, elles apparaissent sous la forme d'un Y. Des différences de séquences en acides aminés des chaînes lourdes γ (80% d'homologie) permettent de définir quatre sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Ces sous-classes ont été nommées ainsi en fonction de la concentration sérique de chacune d'entre elles : IgG1>IgG2>IgG3>IgG4 (Schroeder et Cavacini, 2010). Les chaînes lourdes possèdent toutes, qu'elle que soit la sous-classe, de N vers C terminal : un domaine constant $C\gamma$, une région charnière et deux autres domaines constants $C\gamma_2$ et $C\gamma_3$.

2. Propriétés

a. Pharmacocinétique :

Les IgG constituent l'isotype le plus abondamment rencontré dans le sérum (85% des Ig) et ont une demi-vie sérique relativement longue (23 jours), à l'exception des IgG3 qui ne persistent pas plus d'une semaine. La masse des IgG est d'une part suffisante pour échapper à une filtration et une élimination par les glomérules rénaux. D'autre part leur recyclage grâce au récepteur FcRn (n pour néonatal) favorise leur maintien dans la circulation sanguine. En effet, le récepteur FcRn est exprimé par l'endothélium vasculaire, les monocytes et les

macrophages. Le renouvellement de toute protéine sérique implique un phénomène de pinocytose cellulaire non spécifique en particulier par les monocytes et les cellules épithéliales, suivi d'une dégradation par acidification dans les compartiments endosomaux. C'est à l'intérieur de ces vésicules d'endocytose, à pH acide (< 6,5) que les IgG circulantes se fixent au FcRn par interaction au niveau de l'interface des domaines constants CH2 et CH3. Le FcRn reconduit l'IgG vers la membrane cellulaire et le sérum où il la libère sous la brusque augmentation du pH (Roopenian, 2007).

b. Fonctions physiologiques :

Les IgG sont produites en grande quantité dans les réponses secondaires. L'un des mécanismes les plus importants provoqués par les IgG est celui impliquant l'immunité à médiation cellulaire par des interactions entre le fragment Fc des IgG et les récepteurs à ce dernier FcγR, comme nous l'avons préalablement présenté à propos des fonctions effectrices du fragment Fc. La famille de ces récepteurs humains compte six membres répartis en trois sous-groupes : FcγRI (CD64), FcγRIIa,b,c (CD32a,b,c) et FcγRIIIa,b (CD16a,b). Ils sont exprimés par diverses cellules effectrices du système immunitaire, dont les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les cellules dendritiques et les cellules NK. Ces différents récepteurs présentent des affinités variables envers les IgG et des fonctions activatrices ou inhibitrices. Le récepteur FcγRI est celui présentant l'affinité la plus haute pour les IgG. Seul le récepteur FcγRIIb est inhibiteur. Cette fixation des Ig à des récepteurs de surface par leur fragment Fc explique les phénomènes d'ADCC (Chames, 2009). Ces phénomènes sont généralement médiés par les cellules NK grâce au récepteur FcγRIIIa, qui lorsqu'il est activé entraîne le relargage de médiateurs cytotoxiques induisant la mort de la cellule cible.

Une autre fonction effectrice des IgG1, 2 et 3 est la Cytotoxicité Dépendante du Complément ou CDC. Les IgG1, 2 et 3 activent la voie classique du complément. Les IgG4 peuvent elles activer la voie alterne du complément.

Les IgG pourraient également intervenir dans la régulation de la réponse à médiation humorale via une liaison aux récepteurs FcγRs.

Enfin, les IgG possèderaient une activité anti-inflammatoire via le récepteur DC-SIGN, récepteur spécifique des IgG riches en acide sialique exprimé abondamment par les cellules dendritiques (Allard, 2012).

3. Utilisation des anticorps monoclonaux d'isotype G

Les Ac monoclonaux représentent un des outils majeurs des biothérapies, dans divers domaines cliniques, particulièrement grâce à une ingénierie moléculaire remarquable. Les Ac monoclonaux d'isotype G, plus spécifiquement IgG1, représentent la plupart des Ac trouvés dans des spécialités approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) et l'EMA (European Medicines Agency), notamment grâce à leurs caractéristiques fonctionnelles particulièrement intéressantes. La plupart des Ac monoclonaux recombinants sur le marché sont nus « naked antibodies », c'est-à-dire qu'ils ne sont pas couplés à un agent anti-mitotique, à un radio-isotope ou à une toxine. L'action thérapeutique résulte donc des propriétés des Ac eux-mêmes. Ils peuvent être utilisés en immunothérapie en particulier en thérapie anticancéreuse. En effet, ces Ac agissent par des mécanismes indirects en provoquant une cytotoxicité cellulaire ciblée par des mécanismes indirects (ADCC, CDC) entraînés par leur liaison à des domaines constants d'effecteur moléculaire ou cellulaire (Figure 8). Outre ces mécanismes d'action indirects, il existe les mécanismes directs médiés par les régions variables de l'Ac. Les Ac monoclonaux vont interagir avec des antigènes associés aux tumeurs (TAA). Ces TAA spécifiques des tumeurs humaines ont été mis en évidence depuis les années 1980, ils apparaissent lorsque les cellules tumorales subissent de nombreuses altérations génétiques et épigénétiques aboutissant à une modification de leur profil d'expression génique (Pardoll, 2003). Les plus communs de ces TAA sont les récepteurs de facteurs de croissance surexprimés à la surface des cellules tumorales. Sans traitement, leur activation entraîne une croissance tumorale, une augmentation de la survie tumorale, et l'apparition d'une résistance aux anticancéreux. Les Ac monoclonaux en se fixant sur ces récepteurs peuvent bloquer leur signalisation et inhiber le développement cellulaire, induire une apoptose et diminuer la production de facteur de croissance. Une nouvelle approche pour optimiser l'action de ces Ac monoclonaux est de les coupler à des molécules telles que des agents anti-cancéreux, des toxines, des enzymes ou encore des radioéléments.

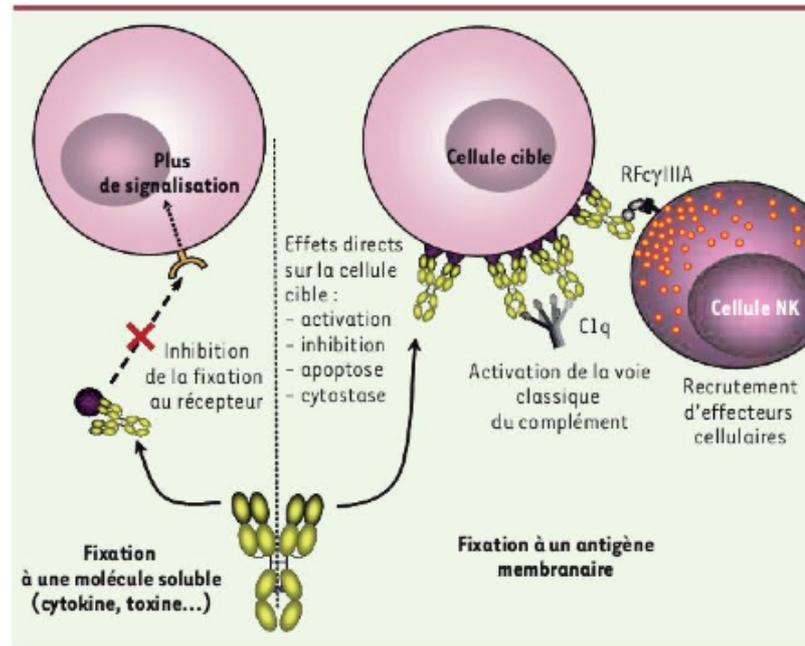


Figure 8 : Mécanismes d'action des principaux anticorps

Les Ac peuvent éliminer les antigènes de manière directe, fixés ou non à une molécule soluble en bloquant les récepteurs d'antigènes associés aux tumeurs, ou de manière indirecte : ils peuvent reconnaître des Ag plus gros (Ag membranaires de pathogènes) et les éradiquer par l'intermédiaire d'effecteurs cellulaires (cellules cytotoxiques) ou moléculaires (le système du complément) (Abès, 2009).

Depuis 1986, année où le premier Ac monoclonal, le muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3[®]) a été mis sur le marché, le monde des Ac monoclonaux a beaucoup évolué (Table 1). En effet en 2009, 22 Ac monoclonaux avaient été approuvés par la FDA aux Etats-Unis et plus de 200 étaient évalués dans des essais cliniques (Teillaud, 2009). En outre, les Ac monoclonaux sont considérés comme des biomédicaments, qui ont la caractéristique d'être produits à partir d'organismes vivants ou de leurs composants cellulaires par des approches cellulaires et/ou des approches technologiques issues du génie génétique. Parmi les biomédicaments, on trouve les vaccins, les protéines thérapeutiques et les Ac monoclonaux. Suivant la dernière étude du LEEM parue en 2014, 826 biomédicaments dont 338 Ac monoclonaux et 250 vaccins sont en développement en 2013. En France, en mai 2014, 173 biomédicaments étaient commercialisés dont les classes les plus représentées sont les vaccins (35%) et les Ac monoclonaux (17%). De mai 2013 à 2014, le chiffre d'affaires total des biomédicaments est supérieur à 5,5 milliards d'euros, les Ac monoclonaux apparaissant prédominants avec plus de 2,7 milliards d'euros. Les biomédicaments ont révolutionné la prise en charge thérapeutique des patients notamment dans les domaines de

l'infectiologie et de l'onco-hématologie depuis les années 2000. Cependant, malgré une forte croissance du nombre de biomédicaments au début, avec un doublement du nombre tous les 5 ans, l'évolution semble plafonner ces dernières années avec seulement 6 nouveaux biomédicaments, dont 2 Ac monoclonaux commercialisés en France en 2014 (représentant seulement 10% des molécules enregistrées). Aujourd'hui, les industriels essaient de développer de nouvelles armes thérapeutiques en associant les Ac monoclonaux à des molécules ou des isotopes afin de décupler leur efficacité. Certains Ac monoclonaux sont donc couplés à un radioisotope à visée thérapeutique comme le Zevalin[®], le Bexxar[®], et le Licartin[®] d'autres sont couplés à un agent cytotoxique agissant au niveau des microtubules tel que l'auristatine dans la spécialité Adcetris[®] ou l'emtansine dans la spécialité Kadcylla[®].

Des Ac monoclonaux ont également été développés à des fins diagnostiques, et certains sont ou ont été exploités en imagerie, ils sont dans ce cas couplés à un isotope radioactif émetteur γ le plus souvent. Aujourd'hui, seulement deux possèdent l'AMM en France, le Leukoscan[®] et le Scintimun[®] (Table 2).

DCI	Spécialité pharmaceutique	Type	Antigène	Pathologie	Autorisation
ANTICORPS MURINS					
Muromonab	Orthoclone OKT3®	Murin IgG2a	CD3	Prévention des rejets aigus d'allogreffe	Retiré en 2013
Ibritumomab	⁹⁰ Y Zevalin®	Murin, IgG1	CD20	Lymphome non Hodgkinien à cellule B CD20 positive	AMM
Tositumomab	¹³¹ I Bexxar®	Murin, IgG2a	CD20	Lymphome non Hodgkinien à cellule B CD20 positive	AMM aux Etats Unis seulement
ANTICORPS CHIMÉRIQUES					
Abciximab	ReoPro®	Chimérique, IgG1	GPIIb/IIIa r	Intervention coronarienne percutanée, angor instable	AMM
Basiliximab	Simulect®	Chimérique, IgG1	CD25	Prévention des rejets aigus d'allogreffe	AMM
Brentuximab	Adcetris®	Chimérique IgG1	CD30	Lymphome de Hodgkin en rechute	AMM
Catumaxomab	Removab®	Hybride rat/souris IgG2	CD3	Ascite maligne chez les patients atteints d'un carcinome EpCAM-positif	AMM
Cetuximab	Erbix®	Chimérique, IgG1	EGFR	Cancer colorectal métastatique, carcinome épidermoïde de la tête et du cou	AMM
Infliximab	Remicade®	Chimérique, IgG1	TNFα	Maladie de Crohn et polyarthrite rhumatoïde	AMM
Rituximab	Mabthera®	Chimérique, IgG1	CD20	Lymphome non Hodgkinien à cellule B CD20 positive	AMM
ANTICORPS HUMANISÉS					
Alemtuzumab	Mabcampath®	Humanisé, IgG1	CD52	Leucémie lymphoïde chronique à cellules B	Retiré en 2012
Bevacizumab	Avastin®	Humanisé, IgG1	VEGF ou Vascular endothelial growth factor	Cancer colorectal métastatique, du sein métastatique, bronchique non à petites cellules, du rein avancé ou métastatique, de l'ovaire	AMM

				avancé	
Certolizumab	Cimzia®	Humanisé, IgG1	TNF α	Polyarthrite rhumatoïde	AMM
Daclizumab	Zenapax®	Humanisé, IgG1	CD25 (Il2r)	Prévention des rejets aigus d'allogreffe	Retiré en 2009
Eculizumab	Soliris®	Humanisé, IgG2/4	C5	Hémoglobinurie paroxystique nocturne	AMM
Efalizumab	Raptiva®	Humanisé, IgG1	CD11a	Psoriasis en plaque	Abrogée en 2009
Gemtuzumab	Mylotarg®	Humanisé, IgG4	CD33	Leucémie myéloïde aigue CD33 positive	ATU
Omalizumab	Xolair®	Humanisé, IgG1	IgE	Traitement de l'asthme	AMM
Natalizumab	Tysabri®	Humanisé, IgG4	Integrine-a4	Sclérose en plaque formes sévères	AMM
Palivizumab	Synagis®	Humanisé, IgG1	Protéine F	Prévention des infections respiratoires dues au Virus Respiratoire Syncytial	AMM
Pembrolizumab	Keytruda®	Humanisé	PD-1	Mélanome à un stade avancé	ATU
Pertuzumab	Perjeta®	humanisé		Cancer du sein métastatique	AMM
Ranibizumab	Lucentis®	Humanisé, IgG1	VEGF-A	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	AMM
Tocilizumab	Roactemra®	Humanisé, IgG1	IL6	Polyarthrite rhumatoïde	AMM
Trastuzumab	Herceptin®	Humanisé, IgG1	HER2/Neu	Cancer du sein précoce et métastatique HER2 positif	AMM
ANTICORPS HUMAINS					
Adalimumab	Humira®	Humain, IgG1	TNF α	Maladie de Crohn et polyarthrite rhumatoïde	AMM
Belimumab	Benlysta®	Humain, IgG1	BLyS	Lupus systémique	AMM
Canakinumab	Ilaris®	Humain, IgG1	IL1 β	Maladie génétique (Syndromes périodiques associés à la cryopyrine)	AMM
Dénosumab	Prolia®	Humain, IgG2	RANKL	Ostéoporose post-ménopausique	AMM
Denozumab	Xgeva®	Humain, IgG2	RANKL	Prévention complication osseuse chez patients atteints de tumeurs solides	AMM
Evolocumab	Repatha®	Humain, IgG2	PCSK-9	Hypercholestérolémie ou	AMM aux

				dyslipidémie mixte qui ne répondent pas aux traitements existants	Etats Unis seulement
Golimumab	Simponi [®]	Humain, IgG1	TNF α	Polyarthrite rhumatoïde, rhumatisme psoriasique, spondylarthrite ankylosante, maladie de Crohn	AMM
Ipilimumab	Yervoy [®]	Humain, IgG1	CTLA-4	Mélanome avancé non résecable ou métastatique	AMM
Nivolumab		Humain, IgG4	PD-1	Cancer du poumon non à petites cellules	ATU
Ofatumumab	Arzerra [®]	Humain, IgG1	CD20	Leucémie lymphoïde chronique	AMM
Panitumumab	Vectibix [®]	Humain, IgG2	EGFR	Cancer colorectal métastatique	AMM
Ustékinumab	Stelara [®]	Humain, IgG1	IL2, IL3	Psoriasis en plaque	AMM
IMMUNOADHÉSINES (ou protéines de fusion-Fc)					
Abatacept	Orencia [®]	CTLA-4Fc	CD80-CD86	Polyarthrite rhumatoïde	AMM
Aflibercept	Zaltrap [®]	huFcγ1 / VEGFR	VEGF 1 et 2, PIGF	Cancer du côlon métastatique	AMM
Aflibercept	Eylea [®]	huFcγ1 / VEGFR	VEGF 1 et 2, PIGF	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	AMM
Belatacept	Nulojix [®]	CTLA-4Fc	CD80-CD86	Prévention du rejet du greffon (rein)	AMM
Etanercept	Enbrel [®]	huFcγ1 / TNFr	TNF α et β	Maladie auto-immune comme spondylarthrite ankylosante	AMM
Romiplostim	Nplate [®]	huFcγ1 / TGO	TGO	Purpura thrombopénique auto-immun	AMM

Table 1 : Liste des anticorps monoclonaux utilisés en thérapie (Liste non exhaustive)

DCI : Dénomination Commune Internationale

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

IL : Interleukine

TNF : Facteur de Nécrose Tumorale

CD : Cluster de Différenciation

DCI	Spécialité pharmaceutique	Type	Antigène	Pathologie
Satumomab	¹¹¹ In Oncoscint [®]	Murin IgG	TAG-72	Cancer colorectal et ovaires
Arcitumomab	^{99m} Tc CEA-Scan [®]	Murin F(ab') ₂	CEA	Cancer colorectal
Imciromab	¹¹¹ In Myoscint [®]	Murin Fab	Myosin	Nécroses myocarde
Nofetumomab	^{99m} Tc Verluma [®]	Murin Fab	TAG-40	Cancer poumon à petites cellules
Capromab	¹¹¹ In Prostascint [®]	Murin IgG	PSMA	Cancer prostate
Sulesomab	^{99m} Tc LeukoScan [®]	Murin Fab'	NCA	Ostéomyélite
Fanolesomab	^{99m} Tc NeutroSpec [®]	Murin IgM	CD15	Appendicite et ostéomyélite
Bectomumab	^{99m} Tc LymphoScan [®]	Murin IgG2a Fab'	CD22	Lymphome non Hodgkinien
Votumumab	^{99m} Tc HumaSPECT [®]	Humain IgG3	Cytokeratins	Cancer colorectal, ovaires, sein
Igovomab	(¹¹¹ In) Indimacis-125 [®]	Murin IgG1 F(ab') ₂	CA-125	Cancer ovaire
Besilesomab	^{99m} Tc Scintimun [®]	Murin IgG1	NCA-95 (non specific cross-reacting antigen 95)	Ostéomyélite

Table 2 : Liste des anticorps monoclonaux utilisés en diagnostic (Liste non exhaustive)

4. Intérêts et limites des anticorps monoclonaux d'isotype G

Malgré des mécanismes de liaison et d'action séduisants et l'existence de nombreux Ac monoclonaux de type IgG maintenant disponibles, le développement de ces méthodes immunologiques et radioimmunologiques s'est heurté à divers facteurs limitants :

- La difficulté de trouver un antigène tumoral d'intérêt : la plupart des antigènes tumoraux ont une spécificité imparfaite, sont exprimés de manière hétérogène par les tumeurs, peuvent avoir une localisation intracellulaire, et être libérés (Ag circulants) ou être internalisés (dégradation).
- L'affinité entre le fragment Fc des Ac monoclonaux et ses récepteurs peut être modifiée :
 - 80% de la population exprime un variant de ce récepteur de basse affinité.

- Les IgG1 sont des molécules glycosylées sur le domaine CH2 de la région Fc. Cette glycosylation peut être modifiée, elle est extrêmement importante et permet une modulation de l'affinité du fragment Fc pour le récepteur FcγRIIIa. Ainsi, elle peut provoquer une modification de l'efficacité de l'Ac. La nature des sucres est dépendante des enzymes exprimées par les lignées cellulaires qui permettent de produire les Ac monoclonaux.
- Les Ac monoclonaux entrent en compétition avec les IgG du patient qui sont présentes en concentration sérique importante. Pas plus de 20% de la dose administrée en Ac monoclonaux se fixe réellement sur la tumeur (Beckman, 2007).
- Les Ac monoclonaux peuvent présenter une affinité pour des récepteurs type FcγRIIb présents sur les macrophages, les cellules dendritiques, et les polynucléaires neutrophiles entraînant des réactions d'inhibition sur le système immunitaire (Chames, 2009).
- De faibles capacités de diffusion dans les tissus limitent l'accessibilité aux tumeurs solides de taille importante (due notamment à leur haut poids moléculaire, de l'augmentation des pressions intra-tissulaires et des modifications de la vascularisation intra-tumorale).
- Le développement de réactions inhibitrices type HAMA vis-à-vis de ces Ac par les patients.
- Enfin, leur utilisation en tant que sonde en imagerie a été réduite en raison de leur longue demi-vie sérique.

Ces limitations encouragent aujourd'hui le développement de nouvelles formes d'Ac capables de relever ces défis.

D. Les anticorps optimisés

Comme nous avons pu le noter, dans les années 1990-2000, la préoccupation majeure était d'obtenir des Ac monoclonaux thérapeutiques bien tolérés chez l'homme. Ce défi a été relevé en partie grâce au développement d'Ac humanisés ou humains, même si des réactions de type HAHA (Human Anti-Human Antibodies) peuvent encore apparaître (Allard, 2012). Depuis, les essais d'optimisation des Ac monoclonaux ont porté sur la modulation de leur propriétés biochimiques et/ou fonctionnelles telles que l'affinité, la spécificité, les fonctions effectrices, la pharmacocinétique, la biodistribution, l'immunogénicité et la toxicité globale.

Ainsi, l'objectif est aujourd'hui de produire de manière rationnelle des Ac monoclonaux dits « optimisés » qui s'adaptent à la pathologie et à la stratégie thérapeutique engagée. Il est possible de distinguer trois grands groupes d'Ac « optimisés », les fragments d'Ac, les Ac bispécifiques et les nanobodies.

1. Les fragments d'anticorps (Figures 9 et 10):

L'obtention d'un fragment Fab (50 kDa contre 150 kDa pour l'Ac entier) responsable de l'activité de liaison était possible depuis de nombreuses années grâce à la digestion protéique. L'ingénierie des Ac et en particulier le fait de pouvoir cloner les gènes des Ig a permis de développer de nouveaux formats d'anticorps possédant des caractéristiques thérapeutiques innovantes.

a. Les fragments scFv

Ils sont constitués par les domaines variables d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère reliés par un peptide de liaison comprenant 12 à 25 résidus protéiques. Le poids moléculaire de ces scFv est de 25 kDa. Ils possèdent un site de liaison à l'Ag. En raison de leur petite taille (1/6 de la taille d'un Ac entier), ces fragments vont pénétrer beaucoup plus efficacement dans la tumeur. Cependant, cet avantage est contrecarré par leur courte demi-vie sérique qui n'excède pas 5 h (Hu, 1996). Celle-ci diminue leur capacité d'accession et de rétention aux tumeurs. En imagerie RIS, ce temps de rétention court se traduit par des images de mauvaise qualité et en thérapie par une activité anti-tumorale insuffisante. Néanmoins en RIT elle peut être améliorée par le radioisotope auquel il est couplé. L'addition chimique de résidus type polyéthylène glycol (PEG) a été proposée par des équipes universitaires et pharmaceutiques pour augmenter la taille de ces fragments, et donc leur demi-vie sérique de 100 fois (Yang, 2003). En thérapie, l'un des meilleurs exemples de ces fragments fusionnés est celui du Certolizumab pegol (Cimzia®) aujourd'hui commercialisé comme Ac monoclonal anti-TNF α . La demi-vie sérique de ce dernier atteint 14 jours.

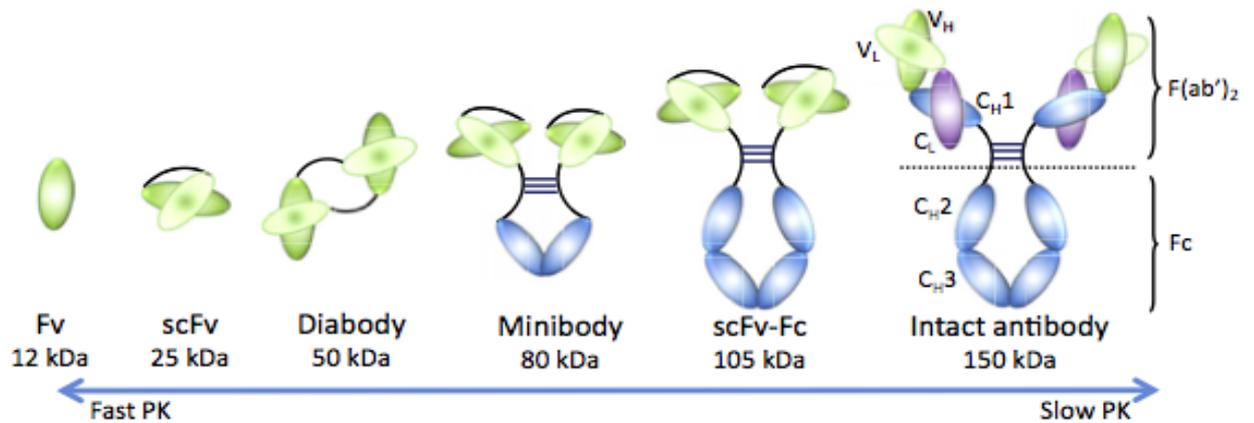


Figure 9 : Représentation schématique d'un anticorps conventionnel (Intact antibody), et de fragments d'anticorps

Les fragments d'Ac conçus à partir de cet Ac conventionnel sont : un fragment d'un domaine variable seulement (Fv), un fragment d'une chaîne Fv (scFv), un diabody, un minibody, et un Ac de petit poids moléculaire constitué de la partie Fc et d'une chaîne Fv. Les poids moléculaires sont indiqués en dessous de chaque fragment. Les domaines variables des chaînes légères sont en vert clair, les domaines variables des chaînes lourdes en vert foncé, les domaines constants des chaînes légères en violet foncé et les domaines constants des chaînes lourdes en bleu (Olafsen, 2010).

b. Les Minibodies

Les fragments précédents de petits poids moléculaires ayant une clairance très importante, des molécules de poids moléculaire intermédiaire (80 kDa) appelées « minibodies » ont été conçues. Ils sont composés de fragments scFvs (un domaine variable de chaîne lourde et un domaine variable de chaîne légère) bivalents fusionnés au domaine CH3 d'une IgG1 humaine. La fusion est obtenue soit grâce à un « linker » de 2 acides aminés, on parle de LD minibody, qui forme un dimère non covalent, soit grâce à la région charnière de l'IgG1 associée à un peptide de liaison souple, on parle alors de FLEX minibody qui forme un dimère covalent. Ce sont des composés stables notamment en raison de la forte interaction entre les scFvs et le domaine CH3. Hu et son équipe ont développé des « minibodies » LD et FLEX anti-ACE, qu'ils ont marqué à l'iode 123. En raison de leur temps de séjour plus long dans le sang, l'accumulation au niveau de la tumeur est plus élevée avec ces fragments, et les études d'imagerie ont montré des images de bonne qualité. Ils ont observé que la clairance des « minibodies » LD était plus rapide que celle des « minibodies » FLEX qui se trouve être intermédiaire entre celle des Ac entiers et celle des fragments. Ils ont montré qu'ils

permettaient d'obtenir une fixation tumorale importante, celle des « minibodies » FLEX étant supérieure (33% ID/g pour les « minibodies » FLEX versus 17% pour les « minibodies » LD) (Hu, 1996).

c. Les fragments multivalents scFvs (diabodies et triabodies)

En utilisant les fragments scFv comme unité de production, et des petits peptides de liaison (inférieur à 10 résidus), des dimères (diabodies) de 50 kDa voire des trimères (triabodies) ont été produits. Ces dérivés ont des demi-vies sériques deux à trois fois plus longues que les fragments précédents. Yazaki et son équipe ont travaillé sur ces diabodies en créant un anti-ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) recombinant du T84.66 (Yazaki, 2001). Malgré des résultats prometteurs en terme de fixation tumorale, des limites à leur utilisation persistent : des études ont montré une forte rétention rénale (30%) et une réponse immune non désirée due au peptide de liaison sensible à la coupure protéolytique dans le sérum (Olafsen, 2010).

d. Les anticorps fusionnés scFv- fusion proteins (105 kDa)

Les Ac fusionnés scFv-fusion proteins sont des fragments d'Ac liés à des protéines ou à des cytokines. Ces fragments sont petits et aisés à produire dans des bactéries comme *Escherichia coli* ou des levures. Comme ils sont petits, il est intéressant de prolonger leur demi-vie d'élimination en les fusionnant avec des protéines telles l'albumine sérique humaine (HSA). Ces Ac fusionnés ont été générés par conjugaison chimique ou recombinaison de scFv avec des molécules d'HSA. Yazaki et son équipe ont ainsi fusionné un fragment scFv anti-ACE T84.66 avec de l'HSA, ce fragment recombiné qu'ils ont radiomarqué à des fins d'imagerie leur a ainsi permis d'augmenter de façon significative le rapport signal/bruit (Yazaki, 2008).

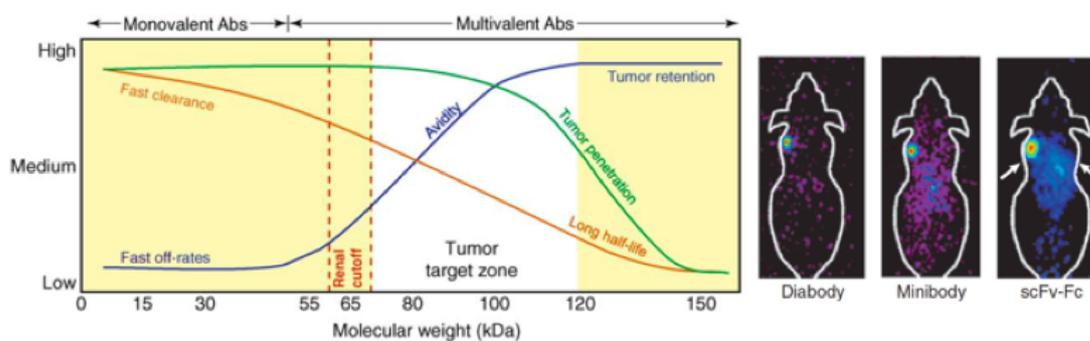


Figure 10 : Optimisation de la biodistribution intratumorale des anticorps

Le poids moléculaire, la pharmacocinétique, la valence et l'avidité des Ac sont des paramètres qui peuvent permettre de définir une zone optimale de ciblage tumoral (Tumor target zone). Un compromis entre taille et avidité de l'Ac doit être trouvé pour pouvoir utiliser celui-ci en imagerie ou en thérapie. Un Ac de petite taille monovalent pénètre efficacement dans la tumeur, cependant le ciblage tumoral n'est pas optimum notamment à cause de l'élimination rénale rapide et de la faible avidité de l'Ac. Au contraire, des Ac entiers ont une taille trop importante pour avoir une pénétration tumorale efficace. Un Ac multivalent de taille intermédiaire (70 à 120 kDa) semble être le format le mieux adapté à un ciblage tumoral performant (Cuesta, 2010). Ce constat peut être illustré par les trois images de TEP se trouvant à droite : elles ont été obtenues avec un diabody, un minibody et un fragment scFv-Fc anti-ACE marqués à l'iode 124 (Holliger, 2005).

2. Les nanobodies et intrabodies

Les nanobodies sont des fragments dits de troisième génération, appelés ainsi en raison de leur petite taille. Ces fragments sont également connus sous le terme *single domain antibodies* dAb car constitués d'un seul domaine et sont considérés comme les plus petits fragments d'Ac actifs. Les dAb sont exprimés naturellement chez tous les camélidés, notamment le chameau et le lama (Chames, 2009). Des Ac similaires ont également été décrits chez certains types de requins et sont appelés Ig-NAR (*new antigen receptor*). Ils sont produits très efficacement par *E. coli* et les levures. Les nanobodies étant de petite taille sont capables de cibler des Ag cryptiques, inaccessibles aux Ac entiers comme les enzymes ou certaines protéines virales. Lorsque ces nanobodies possèdent une bonne solubilité, on parle d'intrabodies car il serait possible de cibler des Ag pathologiques intracellulaires et de neutraliser ces cibles dans des compartiments comme le cytosol, le noyau, les mitochondries

(Weisser, 2009). Une autre application possible de ces fragments serait qu'ils pourraient constituer une charpente pour construire des molécules plus complexes (Chames, 2009).

3. *Les anticorps bispécifiques*

Les Ac bispécifiques possèdent deux paratopes dirigés contre deux Ag différents sur une même molécule conduisant à une meilleure sélectivité. Ils sont monovalents. Ces Ac peuvent être produits dans le but de fixer deux épitopes différents sur un même Ag ou de lier deux Ag distincts ouvrant ainsi le champ à de nombreuses applications et fonctions comme le recrutement localisé d'effecteurs cellulaires ou moléculaires (toxines, drogues cytotoxiques, radionucléides). Différentes techniques de production ont été imaginées au cours des 20 dernières années. La première est celle par couplage chimique à partir d'Ac monoclonaux initiaux ou de fragments. Par exemple, l'Ac bispécifique F6-734 de la société Immunotech a été obtenu à partir de deux fragments Fab' (un anti-ACE et un anti-diethylene-triamine pentaacétate-indium) couplés à l'aide d'o-phenylène-bismaléimide (Barbet, 2007).

La deuxième approche consiste à fusionner deux variétés d'hybridomes : la fusion des deux hybridomes aboutit à la formation de cellules, double hybride, ou quadromes. Cette fusion peut être réalisée entre cellules d'espèces identiques sécrétant le même isotype, entre cellules d'espèces différentes (rat et souris) sécrétant des isotypes différents, ou une combinaison des deux. Les propriétés des Ac obtenus seront alors différentes. Cette combinaison spécifique confère aux Ac obtenus des propriétés essentielles pour leur production et leur purification. On obtient après criblage une nouvelle souche cellulaire sécrétant indéfiniment l'Ac recherché (Carosella, 1990). Cette dernière technique a pour limite la purification des Ac bispécifiques obtenus.

E. L'immunoglobuline A

Pour contourner les limites présentées, d'autres classes d'Ig comme les IgA pourraient s'avérer intéressantes. Après avoir décrit leur structure et leur production, nous nous attarderons sur leurs fonctions effectrices et leurs intérêts potentiels.

1. Caractéristiques structurales des IgA

a. Généralités

L'immunoglobuline de classe A est découverte, à la fin des années 50, par les équipes de Gugler et d'Heremans ([Gugler, 1958](#)), lors de l'isolement dans des échantillons de lait et de sérum humain d'une protéine de type β -globuline en électrophorèse possédant une glycosylation importante ([Heremans, 1959](#)). Chez l'homme, l'IgA est l'Ac le plus abondamment synthétisé dans l'organisme : production approximative de 3 à 5 g par jour. Il existe deux sous-classes d'IgA, IgA1 et IgA2 avec deux types de chaînes lourdes α 1 et α 2 ([Figure 11](#)). L'IgA2 existe sous deux formes dites allotypiques A2m (1) et A2m (2).

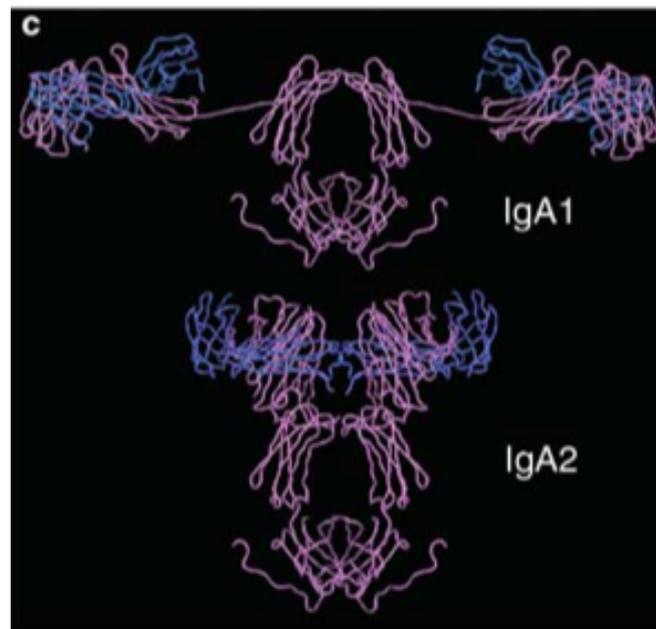


Figure 11 : Modèle moléculaire des IgA1 et des IgA2m(1) humaines

Les chaînes légères sont en bleu, les chaînes lourdes en violet (d'après [Woof, 2011](#))

Les IgA sont largement présentes dans un sérum humain normal à raison d'un taux de 2-3 g/l. Elles représentent quantitativement la deuxième classe d'Ig sérique, c'est à dire 15 à 20% ([van Egmond, 2001](#)). Plus de 80% des IgA sériques humaines sont sous forme monomérique IgA1, il est aussi possible de trouver des IgA di ou trimériques possédant alors une chaîne J. Elles sont catabolisées cinq fois plus vite que les IgG.

Les IgA représentent aussi la classe d'Ig prédominante dans les sécrétions muqueuses. Ici, la proportion d'IgA2 est beaucoup plus importante. Elles sont essentiellement sous forme dimérique associée à une autre protéine, le composant sécrétoire, pour constituer l'IgA sécrétoire. L'IgA sécrétoire est l'Ig principale des sécrétions nasales, bronchiques, gastro-intestinales et urogénitales, de la salive et du lait, elle semble ainsi être l'Ig dominante dans l'immunité humorale des muqueuses.

Les IgA sont rencontrées sous trois formes que nous allons maintenant détailler (Figure 12).

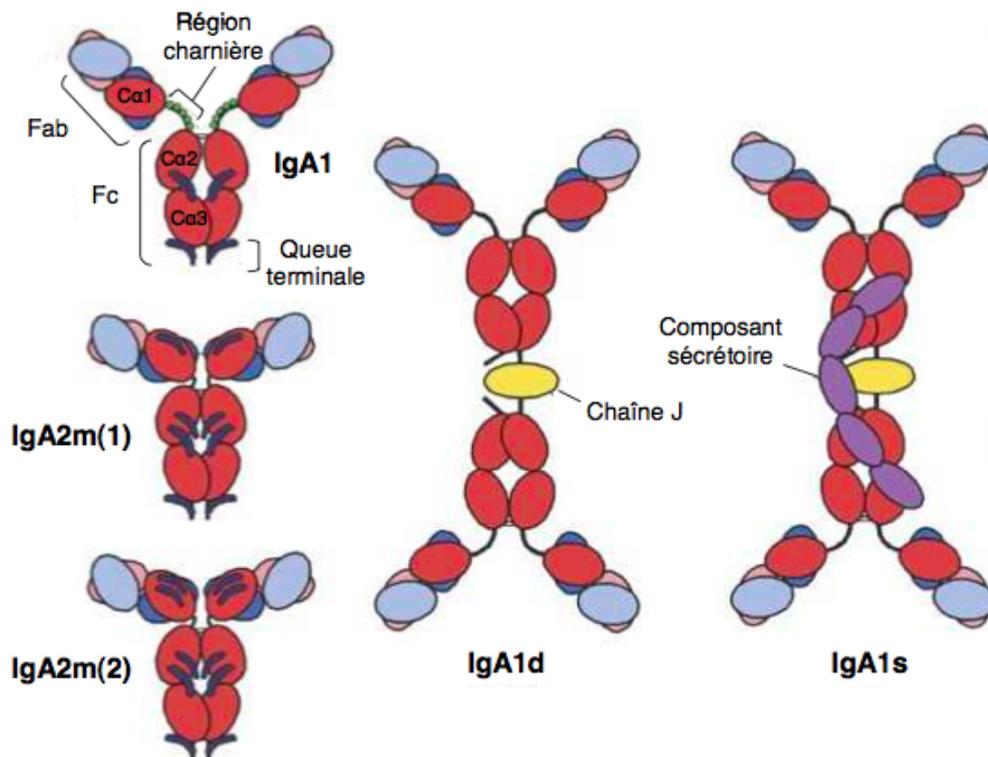


Figure 12: Représentation schématique des différentes formes monomériques, dimériques (dIgA1) et sécrétoires (sIgA1) d'IgA humaine

Les régions constantes de la chaîne lourde sont indiquées en rouge et les domaines variables des chaînes lourdes en rose. Pour les chaînes légères, les régions constantes apparaissent en bleu foncé et les régions variables en bleu pâle. Sur les formes monomériques, les glycanes sont représentés par des cercles. (D'après [Woof, 2006](#))

b. Structure des IgA

IgA monomérique (mIgA)

Les IgA sous forme monomérique ont un poids moléculaire de 160 kDa et une constante de sédimentation de 7S (Svedberg). Comme pour les autres Ig, les mIgA sont constituées de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères identiques entre elles, disposées en deux régions Fab et une région Fc, séparées par une région charnière. Chez l'homme, comme précisé dans les généralités, deux sous-classes d'IgA existent qui diffèrent notamment par le nombre d'acides aminés qui constituent la région charnière : 26 pour IgA1 (région très riche en proline) et 13 pour IgA2. Les chaînes lourdes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ possèdent trois domaines constants et un domaine variable. Les chaînes lourdes et légères des IgA1 sont reliées par des ponts disulfures. Les ponts disulfures permettent de distinguer deux variants allotypiques d'IgA2 : en effet, le variant A2m(1) ne possède pas de pont disulfure, l'association entre les chaînes lourdes et les chaînes légères est assurée par des liaisons non covalentes (Woof, 2006). Les mIgA représentent la forme majoritaire dans le sérum produite par la moelle osseuse (Kerr, 1990). En comparaison aux IgG, les IgA présentent un fort niveau de glycosylation, qui est d'ailleurs une limite à leur production.

IgA dimérique (dIgA)

Contrairement aux IgA sériques, les cellules plasmocytaires de la *lamina propria* des muqueuses intestinale, pulmonaire, uro-génitale, des glandes salivaires et des glandes associées (sein, prostate) produisent principalement des dIgA. Ces dimères résultent de l'association de deux molécules d'IgA monomérique, qui se lient de façon covalente par deux ponts disulfures (reliant les domaines C $\alpha 2$ d'un monomère et C $\alpha 3$ de l'autre monomère) et qui se lient aussi à une petite protéine de jonction appelée chaîne J. La chaîne J est un polypeptide de 15 kDa composé de 137 acides aminés dont 8 résidus cystéine. Elle est reliée par un pont disulfure à chaque monomère, elle est également présente sur les IgM pentamériques. Ces dimères ont un poids moléculaire de 390 kDa et une constante de sédimentation de 11S.

IgA sécrétoire (SIgA)

Les dIgA peuvent être sécrétées vers la lumière des organes, en se liant spécifiquement au récepteur d'Ig polymériques (pIgR), exprimé au pôle basal des cellules épithéliales des muqueuses (Figure 13). Le complexe pIgR/dIgA traverse la cellule par endocytose et est sécrété au pôle apical dans la lumière de l'organe par exocytose. Cette libération s'accompagne du clivage protéolytique du récepteur. La partie extracellulaire du récepteur est clivée et reste associée à l'IgA relarguée et prend le nom de pièce sécrétoire. Ce peptide supplémentaire et l'IgA forme l'IgA sécrétoire (SIgA) (Mostov, 1994).

La pièce sécrétoire est une glycoprotéine de masse moléculaire 60 à 80 kDa. Elle est constituée d'une chaîne riche en glucides, divisée en cinq domaines avec des homologies entre eux et avec les domaines des Ig. Ce composant présente une affinité particulière pour la chaîne J. Il se lie en partie à la chaîne J et en partie de façon covalente avec le dimère d'IgA. La pièce sécrétoire protégerait les IgA contre les sécrétions acides et l'action des protéases.

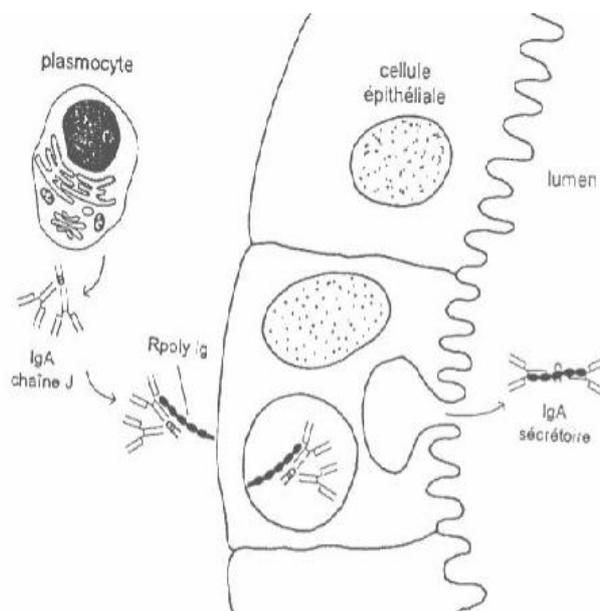


Figure 13 : Synthèse des IgA sécrétoires

Les IgA sécrétoires sont produites au niveau des cellules épithéliales des muqueuses. Les IgA dimériques se lient spécifiquement au récepteur d'Ig polymériques exprimé au pôle basal des cellules. Le complexe récepteur/IgA dimérique traverse ensuite la cellule par endocytose. Au pôle apical, le récepteur est clivé, sa partie extracellulaire devient alors la pièce sécrétoire. L'ensemble pièce sécrétoire et IgA dimérique forme l'IgA sécrétoire sécrétée dans la lumière de l'organe.

3. Production des IgA

a. Switch α et site de synthèse de l'IgA

L'IgA est l'immunoglobuline sécrétoire principale des muqueuses et sa production est fortement induite par la présence de microbes commensaux dans l'intestin. Pour produire les IgA, les cellules B subissent une commutation de classe vers l'isotype α dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, les ganglions lymphatiques mésentériques et les plaques de Peyer, à travers deux voies T-dépendante et T-indépendante. Les cellules B IgA⁺ appelées plasmablastes rejoignent ensuite la circulation sanguine pour s'implanter au niveau des muqueuses intestinales et se différencier en cellules plasmocytaires productrices d'IgA (Macpherson, 2012).

b. Technologie HAMIGA

L'une des méthodes exploitées pour la production des Ac humanisés est la production par des lymphocytes B provenant de souris génétiquement modifiées, dans le génome desquelles, ont été intégrés des gènes codants pour des parties constantes des Ac humains. Cependant, même si les IgA s'avèrent être les Ac les plus produits chez l'homme et la deuxième classe d'Ac dans le sang en quantité, les lymphocytes B les sécrétant sont peu nombreux. Il est ainsi difficile d'isoler un lymphocyte B sécrétant une IgA et, à plus forte raison, un lymphocyte sécrétant une IgA spécifique d'une cible donnée. Ce verrou technologique, concernant l'isolement, la caractérisation, les propriétés et la production des IgA (Woof, 2005) est ainsi la raison pour laquelle les IgA ont largement été délaissées au profit d'autres classes d'Ig notamment les IgG. C'est pour lever ce verrou technologique que le modèle de souris HAMIGA (Humanised Antibody Made Up Of Monoclonal Immunoglobulin A) a été développé et fait l'objet d'un Brevet (Cogné, 2005). Cette souris permet la production de lymphocytes B sécrétant uniquement des Ac monoclonaux IgA chimériques humains.

Les IgA spécifiques sont obtenus selon les étapes suivantes :

- Immunisation des souris HAMIGA
- Détection des IgA spécifiques
- Immortalisation des cellules B

- Sélection, entretien et suivi des hybridomes
- Purification par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) et titrage des IgA

4. Propriétés des IgA

a. Récepteurs aux IgA (Table 3)

Les fonctions biologiques des IgA vont dépendre du type de récepteurs avec lesquels elles vont interagir. Plusieurs récepteurs aux IgA sont caractérisés (Figure 14). Le Fc α RI ou CD89 exprimé par les cellules myéloïdes lie spécifiquement l'IgA1 et l'IgA2, alors que le récepteur des immunoglobulines polymériques, le Fc/ μ R, la transferrine et l'«asialoglycoprotein receptor», sont des récepteurs pouvant lier d'autres ligands. Ces récepteurs peuvent moduler la pharmacocinétique des IgA et les propriétés effectrices (Moura, 2001).

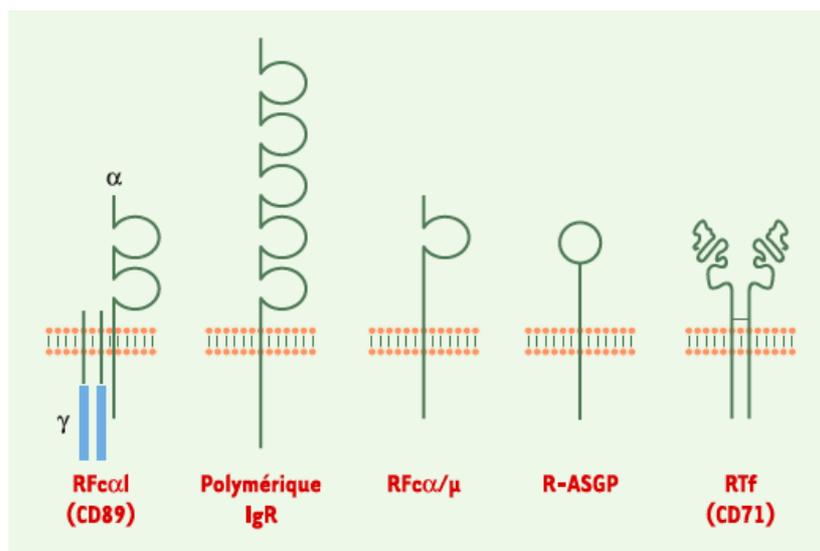


Figure 14 : Les différents récepteurs des IgA

Le RFc α I (ou CD89, récepteur monospécifique pour les IgA humaines), le récepteur des immunoglobulines polymériques (ou pIgR), le récepteur des asialoglycoprotéines (R-ASGP), le RFc α / μ (récepteur multispécifique que lie à la fois les IgA et les IgM) et le récepteur de la transferrine (RTf) sont schématisés avec leurs différents domaines (Monteiro, 2003).

Récepteurs	pIgR	Fc α RI	Fc/ μ R	TfR	ASGP-R
Autre dénomination	Récepteur Ig polymériques	CD89	Récepteur multispécifique IgA-IgM	Transferrine ou CD71	Asialoglycoprotein receptor
Localisation	Cellules épithéliales des muqueuses	Monocytes, neutrophiles, éosinophiles	Cellules dendritiques (amygdales), et plasmatisques, macrophages, cellules de Paneth	Foie fœtal, moelle osseuse, lignées lymphocytaires et myéloïdes, cellules mésangiales, entérocytes	Cellules hépatiques
Liaison	IgA2 (principalement) dimères	IgA1 et IgA2 monomères et polymères	IgA et IgM	IgA1 polymériques	IgA2 surtout
Affinité	Haute	Basse : monomère Haute : polymère	Basse	Basse	Basse
Principal rôle	Transcytose, élimination d'IgA couplées à des pathogènes	Phagocytose, ADCC	Défense immunitaire antimicrobienne, coordination réponse immune	Néphropathies ? Maladie coeliaque ?	Clairance sérique IgA

Table 3 : Les différents récepteurs des IgA

i. Récepteurs des immunoglobulines polymériques (pIgR)

Le récepteur des Ig polymériques (pIgR), est présent au pôle basal des cellules épithéliales des muqueuses reconnaissant les dIgA. Il s'associe donc aux dimères d'IgA possédant la chaîne J par des liaisons de haute affinité, les transporte par l'intermédiaire du compartiment endosomal au pôle apical des cellules épithéliales, où cet ensemble est clivé par des protéases en sécrétant les SIgA dans la lumière des muqueuses. Ce processus appelé transcytose se produit en environ 30 minutes (Kerr, 1990). La transcytose est étroitement régulée. Deux signaux distincts sont impliqués :

- un signal de sensibilisation initiée par la liaison des dIgA à la surface basolatérale des cellules de la muqueuse. La transcytose peut se produire en l'absence d'IgA, cependant la liaison des dIgA au pIgR a pour effet de stimuler ce phénomène.

- un signal de stimulation secondaire. Celui-ci est activé lorsque le complexe dIgA-pIgR est transporté à travers la cellule et implique la phosphorylation d'une kinase de la famille des protéines tyrosines kinases.

Le récepteur pIgR a un poids moléculaire de 100 kDa et est le précurseur du composant sécrétoire. Il est composé de cinq domaines similaires à ceux des Ig, avec une partie transmembranaire de 23 acides aminés et une partie intracytoplasmique de 103 acides aminés. Après sa synthèse, celui-ci rejoint spécifiquement la membrane basale des cellules épithéliales.

Le récepteur pIgR peut transférer de larges quantités d'IgA polymériques vers la lumière des muqueuses, mais il peut également transporter localement des pIgA fixées à des pathogènes, tels que des virus (grippe, rougeole et de l'immunodéficience humaine) rencontrés au niveau de la lamina propria dans la région sous-épithéliale, riche en composants alimentaires et où la flore microbienne est importante. Le rôle de cette « élimination immunitaire » par les IgA est de débarrasser la muqueuse de complexes immuns potentiellement inflammatoires. Le pIgR, par conséquent, joue probablement un rôle dans le maintien de l'homéostasie des muqueuses. Les individus déficients en IgA ne souffrent pas de complications graves, mais sont prédisposés aux allergies et aux maladies auto-immunes ([van Egmond, 2001](#)).

ii. Récepteur Fc α RI (CD89)

Fc α RI (CD89) est un récepteur transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs d'Ig. Son poids moléculaire varie en fonction de sa localisation entre 55-75 kDa lorsqu'il est exprimé sur les monocytes et neutrophiles, et 70-100 kDa sur les éosinophiles, en raison de glycosylations. Il se compose de deux domaines extracellulaires, d'une région transmembranaire et d'une queue courte cytoplasmique. Parce que ce dernier ne porte aucun des motifs connus de signalisation, Fc α RI doit s'associer à la chaîne FcR γ pour entraîner la signalisation cellulaire. FcR γ porte un motif d'activation immunorécepteur tyrosine-base (ITAM) dans sa région cytoplasmique, essentielle pour la transduction du signal ([van Egmond, 2001](#)).

Fc α RI ou CD89 est un médiateur clé de la fonction effectrice Fc des IgA. Il est capable de lier aussi bien l'IgA1 que l'IgA2. De façon surprenante, ce récepteur est retrouvé comme étant un récepteur de basse affinité pour les monomères d'IgA alors qu'il paraît être

un récepteur de haute affinité pour les formes polymériques et les IgA avec un complexe immun (Monteiro, 2010). En effet, des molécules d'IgA (en clusters) fixés à la surface d'agents pathogènes peuvent déclencher des processus d'élimination par leur fragment Fc en se liant au récepteur Fc α RI présent sur les neutrophiles, monocytes, éosinophiles, les cellules dendritiques et quelques macrophages. Ces mécanismes comprennent la phagocytose, la libération de cytokines et d'espèces oxygénées activées, et la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (Woof, 2011).

iii. Les autres récepteurs d'IgA

- Le récepteur Fc/ μ R

Il est ainsi appelé car c'est un récepteur qui se lie aux IgA et aux IgM. Il est exprimé à la surface des cellules dendritiques au niveau des amygdales, des macrophages, des cellules plasmiques et des cellules de Paneth dans la *lamina propria*. Bien que la fonction de ce récepteur Fc humain Fc/ μ R ne soit pas encore tout à fait élucidée, ses différentes localisations sont compatibles avec un rôle dans la coordination de la réponse immunitaire, au moins dans certains tissus muqueux, et dans la défense immunitaire antimicrobienne. La partie distale de la région extracellulaire de ce récepteur de type I porte des caractéristiques structurales communes, avec le domaine extracellulaire du pIgR (43% d'homologie) (Woof, 2005), en particulier les boucles CDR, ce qui pourrait signifier qu'ils partageraient un même mode d'interaction avec les dimères d'IgA. Fc/ μ R interagit uniquement avec des formes polymères d'IgA et IgM, mais la présence de la chaîne J ne semble pas être essentielle (Monteiro, 2010).

- Le récepteur de la transferrine (TfR)

Le TfR appelé aussi CD71 est un homodimère de 180 kDa. Il est maintenant connu pour se lier aux IgA1, mais pas aux IgA2. Le CD71 se lie préférentiellement aux IgA1 polymériques plutôt qu'aux monomères d'IgA1, cependant l'interaction provoquée avec l'IgA1 est beaucoup moindre qu'avec la transferrine. En dépit de son expression difficilement détectable, le CD71 est trouvé sur des cellules hématopoïétiques dans le foie foetal et la moelle osseuse et sur certaines lignées de cellules lymphocytaires et myéloïdes. Cependant, le CD71 est présent sur les cellules mésangiales, avec une forte expression chez les patients présentant une néphropathie à IgA ce qui suggère que ce récepteur pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de la néphropathie à IgA notamment son implication dans les dépôts d'IgA au

niveau des reins. Le CD71 a également été identifié sur les cellules dendritiques de type interstitiel, où il a été montré qu'il pouvait médier l'internalisation des complexes IgA (Woof, 2005).

- Le récepteur ASGP (ASGP-R ; asialoglycoprotein receptor)

Ce récepteur est exprimé sur les cellules hépatiques et semble jouer un rôle important dans la clairance des IgA sériques, en particulier des IgA2. En effet, seul un petit pourcentage d'IgA1 serait éliminé par cette voie. Cette différence pourrait en partie expliquer la demi-vie sérique plus élevée des IgA1 comparée à la demi-vie très courte des IgA2 (Pascal, 2009).

iv. Implication des IgA et de leurs récepteurs dans la néphropathie à IgA

La néphropathie primitive à IgA ou maladie de Berger est une maladie orpheline. Elle est la plus fréquente des glomérulonéphrites primitives. Cette maladie a été décrite pour la 1^{ère} fois en 1968 par Jean Berger et Nicole Hinglais, elle est caractérisée par la présence de dépôts d'IgA, exclusivement de la sous-classe IgA1 dans les glomérules, plus précisément dans les axes intercapillaires (ou axes mésangiaux). Elle atteint essentiellement l'enfant ou l'adulte jeune, et 3 à 4 fois plus souvent les hommes que les femmes.

Le tableau clinique associe habituellement une hématurie et une protéinurie contemporaines d'infections des voies aériennes supérieures. L'absence d'atteinte extrarénale permet de distinguer la maladie de Berger de la glomérulonéphrite du purpura rhumatoïde, également caractérisée par des dépôts mésangiaux d'IgA1, mais comportant des signes de vascularite cutanée, digestive et articulaire (Monteiro, 2003). La néphropathie à IgA est actuellement reconnue comme une cause d'insuffisance rénale. Différentes études ont permis d'estimer le pourcentage d'insuffisance rénale terminale selon la durée d'évolution :

- 10 ans après le début apparent de la maladie : 5 à 10% des patients ;
- 20 ans après le début : 20 à 30% des patients (Société Néphrologie, 2009).

Les mécanismes physiopathogéniques successifs de la maladie de Berger qui conduisent aux dépôts d'IgA dans les glomérules, puis à l'apparition de signes urinaires s'avèrent nombreux et complexes et ne sont pas encore totalement connus. Les mécanismes suivants ont été décrits :

- Une anomalie de la réponse immune IgA caractérisée par : la présence de complexes immuns contenant des IgA, une anomalie de la régulation de la production d'IgA, une anomalie de structure des IgA1 (hypogalactosylation).
- Une interaction anormale des IgA avec le récepteur CD89 due notamment à une anomalie du CD89 : diminution de l'expression membranaire du CD89 et présence d'une forme soluble du CD89 chez les patients atteints de cette maladie.
- Une expression accrue du récepteur de la transferrine

b. Fonctions effectrices de l'IgA (Figure 15)

i. Mécanismes effecteurs directs médiés par l'IgA

Les IgA étant des Ac se trouvant dans les muqueuses des voies intestinales, respiratoires, génito-urinaires, diminuent l'absorption des antigènes solubles ou particulières à la surface de ces muqueuses. L'isotype qui influence profondément la quantité d'antigène absorbé est l'IgA sécrétoire (SIgA) car elle possède des propriétés anti-inflammatoires et de nombreux sites de liaison aux antigènes. Cette action anti-inflammatoire est opposée à celle provoquée par les IgG, qui peuvent entraîner l'activation du complément, l'afflux de polynucléaires, et une altération de l'intégrité de la muqueuse avec une absorption accrue d'antigènes.

Ces Ac muqueux inhibent efficacement l'adhésion de micro-organismes pathogènes à la surface des muqueuses. En effet, les SIgA recouvrent les micro-organismes d'une charge négative et hydrophile qui va avoir pour objectif de repousser leur attachement et provoquent une agglutination des bactéries qui facilite leur élimination. Cette agglutination est médiée par des glycanes. Les SIgA et IgA polymériques peuvent interagir avec les virus, les enzymes et les toxines et neutraliser leurs activités biologiques. L'activité de neutralisation est associée à la partie Fab des molécules d'Ac.

ii. Mécanismes effecteurs indirects de l'IgA

Les effets protecteurs de l'SIgA peuvent être renforcés par l'interaction avec plusieurs facteurs humoraux de l'immunité innée présents dans les sécrétions externes. Par exemple la mucine, abondante dans les surfaces muqueuses, se lie aux SIgA et améliore ainsi le piégeage de SIgA revêtues de bactéries dans la couche de mucus (Biesbrock, 1991).

L'activation de la cascade du complément est l'un des mécanismes principaux de la cytotoxicité indirecte médiée par la partie Fc des Ac. Cependant, l'activation des voies du complément par les différentes formes moléculaires d'IgA semble assez controversée, les IgA étant plutôt considérées comme de faibles activateurs. En général, les complexes immuns Ag - IgA ne représentent pas un système efficace d'activation du complément. Néanmoins, la CDC médiée par l'IgA a été mise en évidence dans des expériences *in vitro* où les IgA avaient été artificiellement agrégées (par exemple par la chaleur ou la lyophilisation) ou altérées avec des groupements glycanes et pouvaient activer la cascade du complément par la voie classique ou la voie des lectines. Un des facteurs limitants de l'activation des voies du complément est que les sécrétions externes contiennent peu de composants du complément (Woof, 2005).

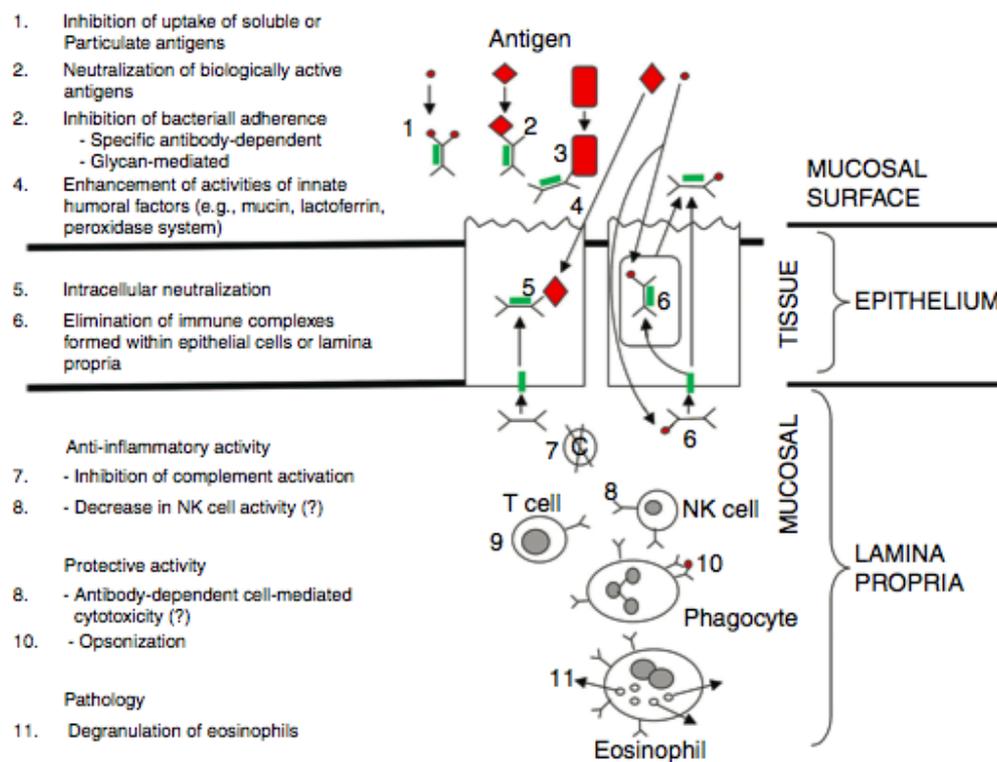


Figure 15 : Rôle des IgA dans la protection des muqueuses (d'après Woof, 2005)

Les IgA peuvent au niveau de la surface des muqueuses :

1. Inhiber l'absorption d'Ag soluble ou particulaire
2. Neutraliser des Ag
3. Inhiber l'adhérence de bactéries
4. Renforcer l'activité de facteurs humoraux

Les IgA peuvent au niveau de l'épithélium :

5. Impliquer une neutralisation intracellulaire

6. Eliminer des complexes immuns formés dans les cellules épithéliales ou dans la lamina propria

Enfin, les IgA peuvent avoir une activité anti-inflammatoire (7. Inhibition de l'activation du complément, 8. Diminution de l'activité des cellules NK), et une activité protectrice au niveau de la *lamina propria*. Par contre, elles peuvent entraîner une dégranulation des polynucléaires éosinophiles, pathologique puisqu'elle peut être responsable de phénomènes allergiques.

5. Apports potentiels des IgA (Table 4)

Les connaissances sur les IgA sont plus restreintes que celles sur les IgG. Aucun anticorps monoclonal de classe IgA n'est en développement pour une application clinique. Ce contraste avec la situation des IgG, résulte notamment de divers verrous technologiques concernant les IgA aussi bien dans leur isolement, caractérisation, propriétés que dans leur production en particulier sur les formes dimériques et sécrétoires. La technologie HAMIGA a permis de lever ces verrous et ainsi de produire les différentes formes d'IgA en quantité exploitable.

Les IgA, largement représentées au niveau sérique et prédominantes dans les sécrétions, sont caractérisées par un tropisme préférentiel pour les muqueuses, ce qui en fait un candidat thérapeutique particulièrement intéressant pour cibler les nombreuses tumeurs à localisation muqueuse. En effet, il est possible d'imaginer que les IgA pourraient cibler des tumeurs inaccessibles aux IgG : elles pourraient potentiellement se concentrer naturellement au niveau des muqueuses et des glandes associées, indépendamment du système sanguin circulant. De plus, les IgA dimériques présentent une capacité de signalisation cellulaire supérieure, puisque porteuse de deux fois plus de paratopes qu'une Ig monomérique. Enfin, l'IgA sécrétoire est particulièrement résistante aux dégradations enzymatiques et aux conditions stringentes présentes dans la lumière mucosale (Yoo et Morrison, 2005), laissant entrevoir la possibilité d'une administration par voie orale. En effet, les Ac monoclonaux sont jusqu'à aujourd'hui administrés par injection ou perfusion intraveineuse. Le développement de nouvelles voies d'administration comme la voie orale est très séduisant, puisque cette voie d'administration est pratique et indolore, et représente un large marché potentiel pour les industries pharmaceutiques.

	IgG	IgA
Chaîne lourde	γ	α
Chaîne légère	κ ou λ	κ ou λ
Variants isotypiques	IgG1 à IgG4	IgA1, IgA2
Forme moléculaire	Monomère	Mono, di, polymère
Nombre de domaine chaîne lourde	4	4
Chaîne J et pièce sécrétoire	non	oui
Poids moléculaire	146 (IgG1, 2 et 4) 170 (IgG3)	160 (monomère) 400 (dimère)
Constante de sédimentation (en S)	6,6	7 (monomère) 11 (dimère)
Contenu en glucide (%)	2 - 3	7
Taux sérique (g/l)	8 - 18	2 - 3
% des Ig sériques	75 à 85	15 à 20
Demi-vie (jours)	23	5,8
Fixation du complément		
Voie classique	IgG1, 2,3	non
Voie alterne	IgG4 agrégées	IgA1 et 2 agrégées
Valence	2	2, 4, 6
Traversée du placenta	++	-
Fixation aux macrophages et neutrophiles	+	+
Autres propriétés	Réponse secondaire	Protection muqueuse
Thermostabilité (56°C, 30 min)	oui	oui
Récepteurs	FcγRI, II, III	pIgR, FcαRI, Fc/μR, TfR
Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps	Oui	Oui via FcαRI
Cytotoxicité dépendante du complément	Oui	?

Table 4 : Récapitulatif des propriétés physiques, chimiques et biologiques des IgG et des IgA humaines

II. Les pathologies et les antigènes ciblés

A. Les Lymphomes non Hodgkiniens

Les lymphomes sont des tumeurs malignes développées à partir du système lymphatique. Ils peuvent se développer dans n'importe quel organe contenant du tissu lymphoïde mais plus particulièrement là où celui-ci apparaît le plus dense, comme dans les ganglions lymphatiques, les amygdales, la muqueuse de l'intestin grêle.

On distingue deux grands types de lymphomes : le lymphome de Hodgkin, et les lymphomes non hodgkiniens.

Le lymphome de Hodgkin est une hémopathie peu fréquente mais non rare, plus rencontrée chez l'homme que chez la femme. Son diagnostic repose sur l'examen histologique et la mise en évidence de la cellule de Reed-Sternberg qui permet de caractériser cette maladie (Calop, 2008).

Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) sont un groupe hétérogène de maladies définies par une prolifération anormale de cellules lymphoïdes. C'est ce type de lymphome qui va être décrit.

1. *Epidémiologie*

Le LNH est la plus fréquente des hémopathies, il recouvre plus de 25 types histologiques. Ces derniers peuvent être divisés en formes agressives (65% des cas) et formes indolentes. Après une augmentation continue depuis les années 70, l'incidence des lymphomes semble se stabiliser, selon un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire sur la projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011 (INCA, 2011). Plus répandu chez l'homme que chez la femme, son taux d'incidence est de 13,7 cas pour 100 000 habitants. Environ 11 600 nouveaux cas de LNH auraient été diagnostiqués, en 2011, en France. Ils occupent le 7^{ème} rang des cancers les plus fréquents chez l'homme et le 6^{ème} rang chez la femme, et représentent 3% de l'ensemble des cancers. L'âge médian de survenue d'un LNH est de 60 ans (64 ans chez l'homme, 70 ans chez la femme). L'augmentation d'incidence porte actuellement sur les lymphomes de haut grade de l'adulte jeune. Il varie selon les types histologiques, certains pouvant présenter des pics d'incidence chez l'adulte jeune ou l'enfant (lymphome de Burkitt par exemple).

Le pronostic global est très variable selon les formes histologiques. Par exemple, pour les deux formes histologiques les plus fréquentes, la survie relative à 5 ans se situe aux alentours de 50% pour les lymphomes diffus à grandes cellules B et de 76% pour les lymphomes folliculaires (HAS, 2012).

2. Histoire naturelle de la maladie

Les LNH se développent à partir de cellules lymphoïdes de lignées B (85% des cas) ou plus rarement T (15% des cas). Ces LNH présentent des caractéristiques communes, cependant ils regroupent de nombreuses entités différentes, en particulier aux plans clinique, histologique, évolutif, pronostique et thérapeutique (Table 5).

Les ganglions lymphatiques représentent la localisation principale. Mais dans 40% des cas, il existe une atteinte extra-ganglionnaire, associée ou isolée. Ces autres atteintes concernent les organes possédant du tissu lymphoïde : tube digestif, peau, sphère ORL, testicules, cerveau.

Les formes « agressives » et les formes « indolentes » de LNH sont caractérisées par des comportements cliniques et des modes évolutifs différents, qui vont guider l'approche thérapeutique. Le bilan initial, la stratégie thérapeutique et le suivi peuvent être spécifiques à chaque forme histologique. Néanmoins, la prise en charge du lymphome diffus à grandes cellules B peut être considérée comme représentative de celle d'une majorité des formes agressives. Il en est de même pour la prise en charge du lymphome folliculaire, considérée comme représentative de celle d'une majorité des formes indolentes. Les LNH sont des hémopathies difficilement éradicables et d'évolution sur plusieurs années, entrecoupées de rechutes successives.

	LNH agressifs	LNH indolents
Fréquence	50 à 60% des LNH	40 à 50% des LNH
Histologie la plus fréquente	LNH diffus à grandes cellules B (60%)	Lymphome folliculaire (80%)
Présentation	Symptomatique Haut grade de malignité	Paucisymptomatique Faible grade de malignité
Installation	Rapide (en quelques semaines)	Lentement progressif (habituellement plusieurs mois voire plusieurs années)
Evolution	Sans traitement : rapidement péjorative	Lente Possibilité de transformation en forme agressive (suite à une anomalie génétique)
Traitement	Instauration dès le diagnostic : chimiothérapie +/- immunothérapie en 1 ^{ère} intention (R-CHOP ou R-ACVBP)	Abstention thérapeutique avec surveillance peut être initialement proposée chez les patients asymptomatiques et avec une faible masse tumorale Immunochimiothérapie en 1 ^{ère} intention (R-CVP)
Pronostic	Possibilité de guérison complète dans de nombreux cas	Rémissions Rechutes relativement fréquentes, avec résistance au traitement au fur et à mesure des poussées évolutives

Table 5 : Lymphomes Non Hodgkiniens de l'adulte

R signifie rituximab (Mabthera®), ACVBP signifie l'association doxorubicine – cyclophosphamide – vindésine – bléomycine – prednisone, CHOP signifie l'association cyclophosphamide – doxorubicine – vincristine – prednisolone et CVP signifie cyclophosphamide – vincristine – prednisone.

En raison des complexités histologiques et morphologiques, de nombreuses classifications ont été élaborées. La classification d'Ann Arbor permet de séparer les formes localisées des formes disséminées. La classification OMS sépare les LNH en lymphomes T et B (Table 6).

Lymphomes B	Lymphome du manteau Lymphome folliculaire Lymphome des zones marginales (MALT) Lymphome diffus à grandes cellules B Lymphome B de haut grade de type Burkitt
Lymphomes T	Lymphome T périphérique : cutané Lymphome lymphoblastique

Table 6 : Classification cytologique des Lymphomes Non Hodgkiniens

3. Diagnostic

a. Circonstances de découverte

Le diagnostic de LNH doit être évoqué devant les signes cliniques suivants :

- des adénopathies superficielles persistantes, peu douloureuses et non inflammatoires, quelle que soit leur localisation
- une hépatomégalie ou une splénomégalie en dehors d'un contexte connu
- des signes généraux : amaigrissement, fièvre et sueurs nocturnes profuses
- un syndrome inflammatoire biologique inexpliqué
- des manifestations cliniques extra-ganglionnaires (gastrique, cutané, cérébral).

La présentation clinique initiale ne permet généralement pas de distinguer *a priori* les formes indolentes des formes agressives. La distinction repose sur les résultats de l'examen histologique.

Le contexte clinique reste le plus important pour orienter le diagnostic.

b. Démarche diagnostique

- L'interrogatoire permet de rechercher des signes généraux, des antécédents personnels ou familiaux d'hémopathie, une exposition à des substances particulières ou un risque d'infection virale (VIH, hépatites B et C).

- L'examen clinique :

Il inclut un examen des aires ganglionnaires superficielles, une recherche d'une hépatomégalie et d'une splénomégalie, et de localisations extra-ganglionnaires.

- Biologie :

Avant toute biopsie d'un ganglion persistant, il est nécessaire d'effectuer les examens permettant d'identifier une maladie infectieuse ou systémique causale.

Un hémogramme est réalisé à la recherche d'une lymphocytose > 4 Giga/litre ou de cellules lymphoïdes atypiques circulantes même en l'absence d'hyperlymphocytose. En cas d'hyperlymphocytose, un frottis sanguin permet d'orienter le diagnostic.

- Confirmation du diagnostic : examen anatomopathologique

Le diagnostic est posé sur une prolifération clonale de cellules lymphoïdes. Les lames doivent servir à de l'immunomarquage pour la caractérisation phénotypique des cellules : le phénotype B ou T, les antigènes de différenciation CD20, CD19...

- Bilan d'extension : imagerie notamment scanner thoraco-abdomino-pelvien et surtout la TEP-TDM au ¹⁸F-Fluorodésoxyglucose.

4. Prise en charge thérapeutique

Le but du traitement est d'obtenir une rémission complète, d'empêcher les rechutes et d'obtenir un taux de survie élevé sans événement.

La prise en charge thérapeutique des LNH utilise actuellement les polychimiothérapies, éventuellement à forte dose avec réalisation d'une greffe de moelle osseuse chez les sujets jeunes de moins de 65 ans. La mise à disposition d'un Ac monoclonal chimérique ciblant le CD20, le rituximab administré le plus souvent en association avec les polychimiothérapies, a révolutionné la stratégie thérapeutique des LNH. Le CD20 étant un marqueur exclusif des lymphomes B (95%), le rituximab est administré en association synergique avec des cytotoxiques dans des protocoles comme le R-CHOP (rituximab -

cyclophosphamide – doxorubicine – vincristine – prednisolone) le R-CVP (cyclophosphamide – vincristine – prednisone)...

Le LNH représente une indication intéressante pour la RIT, les cellules tumorales exprimant des Ag bien caractérisés et sensibles aux effets des rayonnements ionisants et à l'immunothérapie passive avec des Ac monoclonaux non radiomarqués. La RIT où un Ac monoclonal anti-CD20 l'ibritumomab tiuxétan (Zevalin[®]) vectorise un radioélément émetteur β - l'yttrium 90, apporte une possibilité thérapeutique ayant démontré son intérêt dans le traitement des lymphomes B (Bodet-Milin, 2009).

De nombreuses études ont été menées pour développer un Ac monoclonal ou un fragment anti-CD20 vectorisant un radioélément à visée diagnostique. Il serait effectivement intéressant d'avoir des applications en RIS pour permettre une localisation spécifique de ces tumeurs et une dosimétrie pré-thérapeutique. Le rituximab a été radiomarqué avec un isotope émetteur γ comme le technétium 99m par méthode directe (Stopar, 2006) ou par méthode utilisant un synthon (Dias, 2011) dans un but d'imagerie TEMP. Des fragments scFv-sc anti-CD20 ont également été radiomarqués avec un émetteur β^+ , l'iode 124, à des fins d'utilisation en imagerie TEP (Chopra, 2004).

5. Antigène CD20

L'antigène CD20 est une protéine transmembranaire identifiée au début des années 1980 comme un marqueur des lymphocytes B (Stashenko, 1980). Le CD20 est une phosphoprotéine non glycosylée de 297 acides aminés, hydrophobe, de masse moléculaire 35 kDa, composée de quatre domaines membranaires, deux domaines N et C-terminaux intracytoplasmiques et d'une double boucle extracellulaire dont la structure tridimensionnelle est stabilisée par un pont disulfure (Ernst, 2005). L'expression de cette molécule dépourvue de ligand dépend du stade de maturation du lymphocyte B. Il n'est pas exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques et sur les précurseurs les plus précoces de la lignée B alors que le stade pré-B et le lymphocyte B mature, en sont richement pourvus. Les plasmocytes, quant à eux se délestent du CD20 puisqu'il ne reste que 20% des plasmablastes à IgM qui l'expriment (Renaudineau, Devauchelle-Pensec, Hanrotel, Pers, Saraux, et Youinou, 2009). L'administration de rituximab n'affectera donc pas les cellules souches ou le développement

des précurseurs des cellules B, ceci permettra aux cellules B saines de se régénérer après le traitement et de revenir à un niveau normal après un délai de 9 à 12 mois (Surga, 2011).

Bien que la fonction du CD20 ne soit pas encore clairement établie, il est considéré que son rôle principal est celui d'un régulateur des flux de calcium. Il intervient dans la transduction d'un signal au cours de l'activation et de la différenciation du lymphocyte B (Bosly, 2006).

Dans les lymphoproliférations B, la densité du marqueur varie considérablement d'un stade à l'autre et donc d'une hémopathie à l'autre : les cellules de Leucémie Lymphoïdes Chroniques portent peu de molécules CD20 alors que celles des lymphomes en expriment beaucoup ; entre les deux s'insèrent, celles des Maladies Auto-Immunes (Renaudineau, 2009). Il est exprimé dans plus de 95% des cellules B des LNH (Cartron, 2004).

Après la fixation d'un Ac, le CD20 ne s'internalise pas dans les cellules cibles et n'est pas décapé de la surface cellulaire. Le CD20 ne possède pas de forme circulante présente dans le sang périphérique, hormis celles libérées par des microvésicules membranaires (Manshoury, 2003). Ces deux paramètres font du CD20 un Ag de choix pour les traitements anticancéreux : les effets de l'Ac monoclonal seront persistants dans le temps puisque l'Ag ne sera ni sécrété ni internalisé et puisque les formes solubles n'interféreront pas sur la fixation (Dayde, 2008).

Outre les mécanismes d'action tels que l'induction d'apoptose, la lyse par CDC et ADCC, le rituximab, après liaison au CD20, entraîne une translocation de ce dernier dans des radeaux lipidiques. Les radeaux lipidiques sont des structures « flottantes » présentes dans la membrane plasmique. La translocation permettrait au rituximab d'activer le complément de façon plus efficace (Dayde, 2008). Il est à noter que l'efficacité du rituximab peut être compromise par une expression plus faible de l'Ag CD20, dans certaines pathologies où les lymphocytes B expriment moins le CD20, ou par un phénomène de perte aiguë d'expression du CD20. Ce phénomène appelé « shaving » a notamment été mis en évidence par Beum *et al.* (Beum, 2006). Il s'agit d'un phénomène unidirectionnel au cours duquel les complexes rituximab-Ag CD20 seraient internalisés par les macrophages après capture.

Le CD20 a été choisi comme cible car actuellement les IgG anti-CD20 trouvent de nombreuses applications en immunothérapie et en RIT et ont fait preuve de leur efficacité dans cette indication. De plus en plus de données sur le rituximab étant disponibles aujourd'hui, nous allons pouvoir évaluer l'efficacité de notre radiomarquage.

B. Le Cancer colorectal

1. *Epidémiologie*

En France le cancer colorectal est la 2^{ème} cause de mortalité par cancer et la 1^{ère} après 85 ans. Il est le 3^{ème} cancer le plus fréquent chez l'homme et le 2^{ème} chez la femme. L'incidence du cancer colorectal est estimée, en 2010, à 40 000 nouveaux cas dont 52% chez l'homme. La maladie touche dans 95% des cas des personnes âgées de plus de 50 ans avec un âge moyen au moment du diagnostic de 70 ans chez les hommes et de 73 ans chez les femmes.

La localisation est surtout rectosigmoïdienne (2/3) plutôt que rectale.

Le cancer colorectal est un cancer de bon pronostic lorsqu'il est diagnostiqué à un stade précoce: la survie relative à 5 ans est de 91% pour les stades localisés, de 70% pour les stades avec envahissement locorégional. En revanche, la survie à 5 ans est environ de 11% dans les situations métastatiques qui représentent environ 25% des patients au moment du diagnostic. En raison de nets changements dans la prise en charge de ces cancers (diagnostic plus précoce) et de progrès en termes de modalités thérapeutiques, le taux de mortalité par cancer colorectal a diminué ces 20 dernières années. Actuellement, environ 17 000 décès annuels lui sont imputables ce qui représente près de 11% des décès par cancer (HAS, 2012).

2. *Description*

60 à 80% des cancers colorectaux se développent au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale à partir d'un adénome, généralement sous la forme d'un polype ou plus rarement sous une forme plane, plus difficile à détecter. Plusieurs types de polypes bénins existent: adénomateux, hyperplasiques (les plus fréquents), inflammatoires ou lymphoïdes. Seul l'adénome, résultant de la prolifération des cellules des glandes de Lieberkühn a la capacité de se transformer en cancer. Le risque de transformation d'un adénome en cancer varie en fonction de la taille, de l'importance de la composante villositaire au sein de l'adénome et du degré de dysplasie. La transformation se fait sur quelques mois à plusieurs années, le polype adénomateux passant par différents stades de dysplasie avant le stade de cancer invasif (Figure 16). Tout adénome bénin est par définition en dysplasie de bas grade, la dysplasie de haut grade correspond quant à elle au premier stade de cancer.

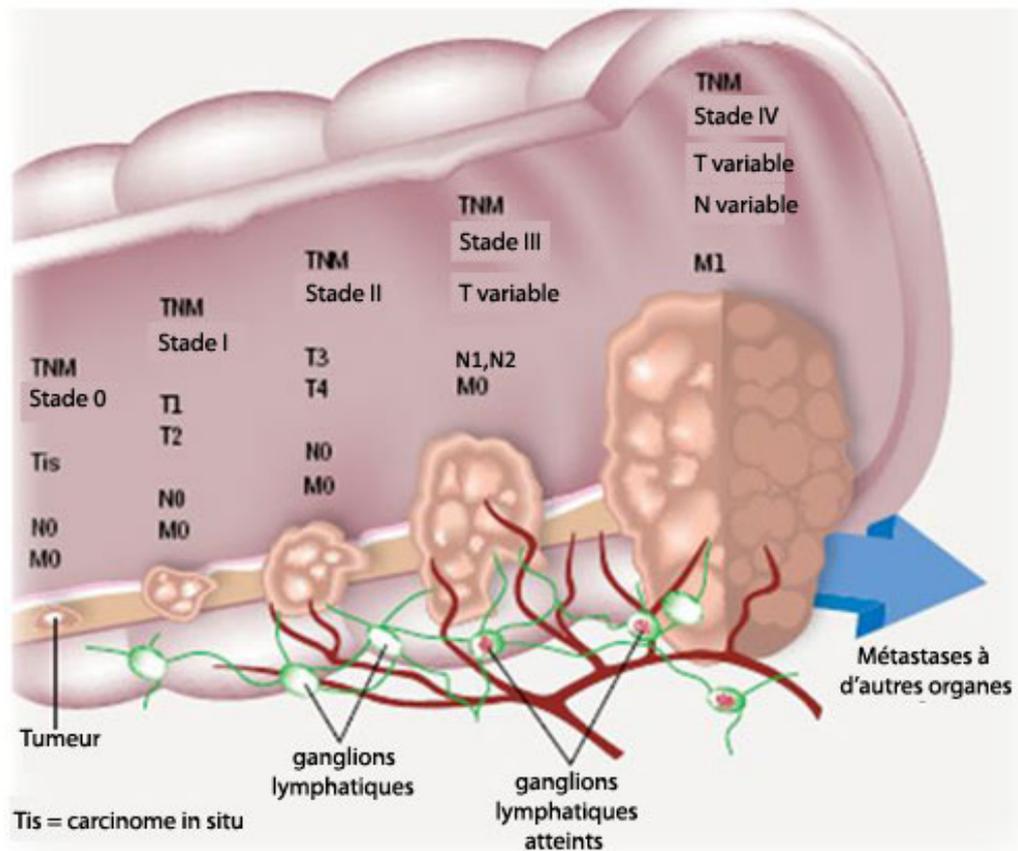


Figure 16 : Les divers stades du cancer colorectal (d'après L'association canadienne du Cancer Colorectal)

Les stades du cancer colorectal correspondent à l'importance de l'étendue de celui-ci au niveau de la muqueuse ou de la sous muqueuse. Ils sont définis en fonction de l'invasion tumorale dans la paroi intestinale, de l'atteinte des ganglions lymphatiques et de la propagation du cancer à d'autres organes.

Stade 0 : Le cancer ne touche que la 1^{ère} couche de la paroi interne du côlon ou du rectum et n'a pas encore envahi l'ensemble de la paroi intestinale.

Stade I : Le cancer a traversé plusieurs couches de la paroi du côlon ou du rectum.

Stade II : Le cancer a franchi complètement la paroi du côlon ou du rectum et peut se propager aux tissus environnants.

Stade III : Le cancer a atteint les ganglions lymphatiques.

Stade IV : Le cancer s'est étendu à des organes éloignés, généralement le foie ou les poumons.

L'histologie du cancer colorectal la plus rencontrée est l'adénocarcinome (> 95%). Les autres types histologiques sont les tumeurs neuroendocrines, les lymphomes digestifs, les tumeurs stromales et les sarcomes.

Les cancers colorectaux surviennent de façon sporadique dans 80% des cas, ou dans un contexte familial dans 15% des cas ou sur un terrain de prédisposition génétique dans 5% des cas de type polypose adénomateuse familiale (PAF), ou de type syndrome de Lynch (HNPCC).

Des facteurs de risque d'apparition de cette pathologie ont été clairement identifiés comme l'alimentation et l'exercice physique insuffisant, le tabagisme, un antécédent de cancer, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique), l'âge.

On peut différencier trois groupes en fonction du niveau de risque :

- Les personnes à risque très élevé : celles avec des formes familiales liées à une prédisposition génétique.
- Les personnes à risque élevé : celles avec un antécédent personnel d'adénome ou de cancer colorectal ; un antécédent familial au premier degré de cancer colorectal ou d'adénome > 1 cm survenu avant 65 ans ; deux ou plusieurs antécédents familiaux au premier degré de cancer colorectal quel que soit l'âge de survenue ; une maladie inflammatoire chronique.
- Les personnes à risque moyen : les sujets de plus de 50 ans des deux sexes.

Plusieurs classifications permettent de déterminer les groupes à risque et de faciliter les décisions thérapeutiques. La classification de Dukes, et la classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) sont les plus appliquées.

3. Diagnostic

a. Circonstances de découverte

Les signes cliniques devant évoquer un cancer colorectal sont :

- Des troubles digestifs peu spécifiques (alternance de diarrhées et de constipation)
- Une occlusion
- Des rectorragies
- Une anémie ferriprive inexplicée...

b. Démarche diagnostique

- L'examen clinique comprend une évaluation de l'état général et nutritionnel, un examen de l'abdomen, des touchers pelviens, une palpation des aires ganglionnaires.
- La réalisation d'une coloscopie totale avec biopsies des lésions suspectes vient ensuite et représente un examen indispensable pour le diagnostic du cancer colorectal.
- Le bilan d'extension comprend un bilan biologique avec notamment dosage de l'Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE) marqueur tumoral revêtant un intérêt pronostique dans les situations métastatiques et un bilan d'imagerie reposant sur la tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne avec injection de produit de contraste. Des examens complémentaires peuvent être utilisés en fonction des symptômes et si présence de métastases, comme une échographie hépatique, une IRM hépatique, une scintigraphie osseuse ou une TDM (Tomodensitométrie) cérébrale. Le TEP-TDM n'est pas systématique et n'est indiqué qu'après discussion pluridisciplinaire.

Aucune molécule ciblant l'Ag ACE n'est aujourd'hui utilisée pour aider au diagnostic ou au suivi du cancer colorectal. Un Ac ciblant l'ACE a pourtant été développé et utilisé en imagerie isotopique de 1996 à 2005 : le CEA-Scan[®] (^{99m}Tc-arcitumomab). Il s'agissait d'un fragment variable Fab dérivé d'un Ac monoclonal murin de type IgG, marqué au ^{99m}Tc. Malgré un principe séduisant, sa commercialisation a été interrompue pour des raisons économiques, le marché s'étant restreint suite à l'utilisation de la TEP au ¹⁸F-FluoroDésoxyGlucose, dont la sensibilité donne des résultats équivalents mais qui offre des images d'une résolution supérieure.

4. *Prise en charge thérapeutique*

La prise en charge thérapeutique du cancer colorectal comprend une intervention chirurgicale et/ou un traitement chimiothérapeutique en fonction du stade et de la présence ou non de métastase (Table 7).

En situation adjuvante (stade III) les protocoles proposés peuvent être le FOLFOX associant 5-FluoroUracile (5FU) et oxaliplatine ou le XELOX associant 5FU et capécitabine. En situation métastatique, les protocoles de chimiothérapie proposés en 1^{ère} ligne pourront être le FOLFOX ou le XELOX ou encore du raltitrexed. Le protocole proposé en 2^{ème} ligne sera par exemple le FOLFIRI associant 5FU et irinotécan. L'arsenal thérapeutique dans la prise en charge par chimiothérapie du cancer colorectal métastatique s'est enrichi en 2004 du

cétuximab Erbitux[®], Ac monoclonal chimérique de type IgG1, ciblant le domaine extracellulaire de l'EGFR (Epidermal Growth Factor), puis en 2005 du bevacizumab Avastin[®], Ac monoclonal humanisé de type IgG1, se fixant spécifiquement au VEGF circulant (Vascular Endothelial Factor) et en 2007 du panitumumab Vectibix[®], Ac recombinant entièrement humanisé de type IgG2 ciblant l'EGFR. L'Erbitux[®] et le Vectibix[®] sont réservés aux patients présentant des cancers colorectaux métastatiques, en association à une chimiothérapie ou en monothérapie dans les cancers résistants à la chimiothérapie. L'Avastin[®] est quant à lui toujours indiqué dans les traitements des cancers colorectaux métastatiques en association à une chimiothérapie. L'Erbitux[®] ainsi que le Vectibix[®] doivent être administrés chez des patients ne présentant pas de mutation K-RAS (protéine servant à la transmission du signal cellulaire) qui empêche leur action (CNHIM, 2008). Des données prometteuses ont été rapportées concernant l'intensification de la chimiothérapie, la chimiothérapie intra-artérielle hépatique et l'intégration des thérapies ciblées qui permettent d'augmenter le taux de résecabilité des métastases. En situation métastatique palliative, des inhibiteurs de tyrosine kinase tels que le sorafénib et nintedanib sont en cours d'étude dans des essais de phase I-II et ont montré une action prometteuse (Volet, 2012).

	Stade	Chirurgie	Chimiothérapie
Cancer colique non métastatique	I	Résection colique + curage ganglionnaire	Pas de chimiothérapie
	II		En l'absence de facteurs de mauvais pronostic : pas de chimiothérapie
	III		Chimiothérapie adjuvante recommandée
Cancer colique métastatique	IV	Exérèse du cancer colique : objet d'une concertation médico-chirurgicale. Résection des métastases hépatiques et pulmonaires seulement si résection complète possible.	Chimiothérapie doit être envisagée pour tout patient présentant un cancer du colon métastatique (5FU, oxaliplatine, cétuximab, irinotécan, bevacizumab, capécitabine, raltitrexed)

Table 7 : Prise en charge thérapeutique des Cancers Colorectaux

(Chimiothérapie adjuvante : 5FU, oxaliplatine, capécitabine)

Deux constatations concernant les thérapies ciblées de ce cancer, peuvent être faites :

Aujourd'hui, la prise en charge des cancers colorectaux est encore dépourvue d'Ac ciblant l'ACE, malgré l'expression de cet antigène dans les cancers colorectaux. Il est cependant à noter qu'un Ac ciblant l'ACE couplé au SN-38, métabolite actif de l'irinotécan est en cours de développement. Ce conjugué appelé labetuzumab-govitecan fait l'objet d'essais cliniques de phase I et II chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique.

De plus, les Ac utilisés sont tous de classe IgG, aucun de classe IgA présentant un tropisme muqueux, n'est en développement. Ces possibilités d'amélioration de l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques sont à prendre en considération et donc à étudier.

5. Antigène ACE

L'Antigène CarcinoEmbryonnaire est une glycoprotéine de poids moléculaire 180-200 kDa comportant 60% de glucides qui a été isolée par Gold et Freedman ([Gold et Freedman](#),

1965). Il appartient à la superfamille des immunoglobulines et comporte sept domaines extracellulaires.

L'antigène ACE est un Ag oncofoetal présent dans l'intestin, le foie, le pancréas d'embryons ou de fœtus humains au cours des deux premiers mois de grossesse (Benchimol, 1989). A la naissance, sa synthèse s'effondre et il est donc quasiment absent des tissus sains adultes. Il peut être présent à des taux très faibles dans la muqueuse du côlon et dans les glandes mammaires, et être détectable dans le sérum de sujets sains en particulier chez les fumeurs. Il est au contraire, retrouvé dans la plupart des adénocarcinomes tels ceux du tube digestif, du sein, du poumon (Mohamed, 2010).

Ainsi, il s'agit d'un des marqueurs tumoraux les plus anciens et l'un des plus répandus en étant certainement le plus fréquemment utilisé sous forme protéique comme marqueur dans les cancers gastro-intestinaux, en particulier dans le cancer colorectal (Goldstein et Mitchell, 2005) et dans d'autres cancers comme celui du sein, et du poumon. En effet, la concentration de l'ACE s'élève préférentiellement dans les cancers colorectaux, où une valeur supérieure à 25ng/mL est très fréquente (5ng/mL chez un sujet sain – 7,5ng/mL chez un sujet tabagique) (Caquet, 2010). Ce marqueur est utilisé dans le diagnostic mais aussi dans le suivi des cancers colorectaux. Une élévation de l'ACE étant assez bien corrélée au degré d'extension du cancer, le dosage préopératoire de ce marqueur peut être utile pour distinguer, parmi les patients sans envahissement ganglionnaire, ceux qui sont à haut risque de récurrence. (Caquet, 2010).

La famille de l'ACE comprend 29 gènes, dont 18 sont exprimés, 7 appartenant au sous-groupe de l'ACE et 11 au sous-groupe des glycoprotéines spécifiques de structure très proche comme celle des NCA (Non specific Cross reacting Antigen).

L'ACE est attaché à la membrane cellulaire par du glycosyl phosphatidylinositol et est probablement libéré sous forme soluble par une phospholipase C ou phospholipase D (Thompson, 1991). Plusieurs membres du groupe de l'ACE possèdent des propriétés d'adhésion cellulaire, ceci pourrait suggérer que l'ACE pourrait agir comme une molécule d'adhérence. Il a été démontré que grâce à sa localisation à la surface apicale des entérocytes matures du côlon humain normal, l'ACE peut jouer un rôle dans la protection du côlon contre les infections microbiennes, peut-être en se liant et en piégeant des micro-organismes infectieux (Hammarström, 1999). Des modifications dans l'adhérence cellulaire étant impliquées dans le développement de métastases, il a été montré *in vitro* que l'ACE peut jouer un rôle dans les processus de dissémination et d'invasion (Duffy, 2001).

III. Radiomarquage des anticorps et applications

Des molécules d'intérêt peuvent être radiomarquées par des radioéléments artificiels (REA) dans deux grands types d'application :

- **Applications diagnostiques** : les molécules seront radiomarquées par des émetteurs de rayonnements fortement pénétrants et peu ionisants comme les émetteurs gamma (γ) ou béta+ (β^+). Ces molécules radiomarquées seront administrées, le plus souvent à l'état de traces, et leur distribution pourra être suivie par détection externe à l'aide d'une caméra adaptée aux rayonnements à détecter, ou chez l'animal après sacrifice et comptage des organes. Ce principe est mis à profit en Médecine Nucléaire pour obtenir des informations sur la fonctionnalité et le métabolisme des organes explorés : il s'agit ici d'une imagerie fonctionnelle. Ces examens diagnostiques sont appelés scintigraphies.
- **Applications thérapeutiques** : les molécules seront dans ce cas radiomarquées par des émetteurs de rayonnements à fort pouvoir ionisant et faible pouvoir pénétrant, les émetteurs béta- (β^-) voire alpha (α), le but étant d'irradier des cellules ciblées en épargnant les cellules saines.

Chez l'homme, le radiotracer administré au patient est un médicament appelé Médicament RadioPharmaceutique (MRP). Il peut être constitué par un radioisotope seul sous forme d'ion qui joue le rôle de traceur et de vecteur, ou le plus souvent formé d'un traceur (radioisotope) fixé ou complexé à un vecteur permettant d'atteindre la cible biologique choisie. La vectorisation du REA doit permettre une fixation la plus spécifique possible pour déterminer la localisation de la cible (imagerie) et/ou provoquer sa destruction (radiothérapie), tout en entraînant une diminution du rapport signal/bruit en diagnostic et une limitation des effets indésirables en thérapie. Divers radiotraceurs ont été développés en diagnostic et en radiothérapie et sont aujourd'hui couramment utilisés. Les vecteurs employés peuvent être soit des petites molécules d'intérêt biologique comme des molécules métabolisables, des ligands de récepteur, ou soit des macromolécules biologiques. Les vecteurs sont ici administrés à l'échelle de traces (10^{-8} à 10^{-12} mole/l ou M). La recherche de MRP présentant de fortes affinité et spécificité vis-à-vis d'un organe, d'un tissu, d'une pathologie a conduit à s'intéresser à des macromolécules, comme les anticorps, en tant qu'agent de vectorisation reconnaissant un antigène cible.

Après quelques rappels de radioactivité, nous présenterons les applications en thérapies puis en diagnostic des molécules radiomarquées. Le Technétium 99m, radioélément que nous avons sélectionné pour radiomarquer les Ig sera ensuite présenté, ainsi que les méthodes de radiomarquage associées à cet élément.

A. Rappels de radioactivité

1. Définition et unités de mesure

Un atome est un ensemble électriquement neutre constitué d'un noyau autour duquel gravite un cortège d'électrons. Le noyau est lui-même constitué de neutrons et de protons. Les isotopes radioactifs sont caractérisés par des noyaux instables qui évoluent vers une plus grande stabilité en se désintégrant par émission d'une ou de plusieurs particules, voir de rayonnements électromagnétiques. Cette instabilité nucléaire donne lieu à une décroissance spontanée de la radioactivité d'une population de noyaux donnés. La radioactivité naturelle ou artificielle est un processus nucléaire, spontané, probabiliste et exo-énergétique. Le type de désintégration dépend de l'origine de l'instabilité nucléaire : excès de neutrons ou excès de protons.

a. Constante radioactive λ et décroissance radioactive

La constante radioactive, caractéristique du radionucléide, représente la probabilité pour un noyau radioactif de se désintégrer par unité de temps.

Ainsi dans une source constituée d'un nombre N de noyaux radioactifs à l'instant t le nombre dN de noyaux se désintégrant durant l'intervalle de temps dt est :

$$dN = -N(t) \cdot \lambda \cdot dt$$

avec λ exprimée en s^{-1} .

Le nombre d'atomes radioactifs décroît de manière exponentielle en fonction du temps selon l'équation suivante :

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\lambda t}$$

Où : $N(t)$ = nombre d'atomes radioactifs à l'instant t

N_0 = nombre d'atomes radioactifs à t_0

Δt = temps écoulé entre t et t_0

b. Période physique

La période radioactive caractérise un isotope radioactif et est définie comme étant le temps au bout duquel la radioactivité a diminué de moitié.

$$\text{On a : } T_{1/2} = \ln 2 / \lambda$$

En Médecine Nucléaire, elle doit être adaptée à la demi-vie d'élimination du vecteur (la molécule biologique) auquel le radionucléide sera couplé, et à l'exploration voulue : suffisamment longue afin que le taux de fixation soit optimal au niveau de la cible et suffisamment courte pour limiter l'irradiation du patient.

c. L'activité

L'activité d'une source radioactive est le nombre de noyaux qui se désintègrent spontanément par unité de temps. Elle diminue au cours du temps. L'activité d'une source au temps t se définit par la relation suivante :

$$A(t) = A_0 \cdot e^{-\lambda t}$$

Où : $A(t)$ = activité de la source à l'instant t

A_0 = activité de la source à t_0

Δt = temps écoulé entre t et t_0

Dans le Système International, l'unité de mesure de l'activité est le Becquerel (Bq) qui correspond à une désintégration par seconde.

Le Curie (Ci) est une ancienne unité de mesure mais elle est encore très utilisée :

$$1 \text{ Ci} = 3.7 \cdot 10^{10} \text{ Bq}$$

d. Le transfert linéique d'énergie

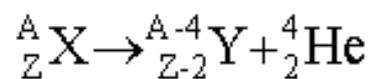
Le transfert linéique d'énergie ou TEL est la quantité d'énergie en keV (kiloélectronvolt) transférée par une particule ionisante traversant la matière par unité de distance (en μm). Il varie en fonction de la nature et de l'énergie du rayonnement ionisant. Il est utilisé pour quantifier l'effet du rayonnement ionisant sur un matériau biologique (référence = eau).

2. Rayonnements

Divers types de rayonnements sont produits par les radioéléments : les rayonnements particuliers α , β et les rayonnements électromagnétiques γ . Les applications médicales de ces radioisotopes reposent sur les caractéristiques de ces rayonnements, notamment leur interaction avec la matière.

a. Emetteurs α

Les émetteurs α se désintègrent en émettant un rayonnement particulaire α constitué de deux protons et de deux neutrons (noyau d'hélium ${}^4\text{He}$).



Ce rayonnement est très ionisant. Son énergie délivrée est importante (5 à 10 MeV), sur une très courte distance (Table 8). Par contre, il est peu pénétrant ; il est absorbé par de faibles épaisseurs de matière : son parcours dans les tissus mous est de l'ordre de 0,03 mm (Figure 17).

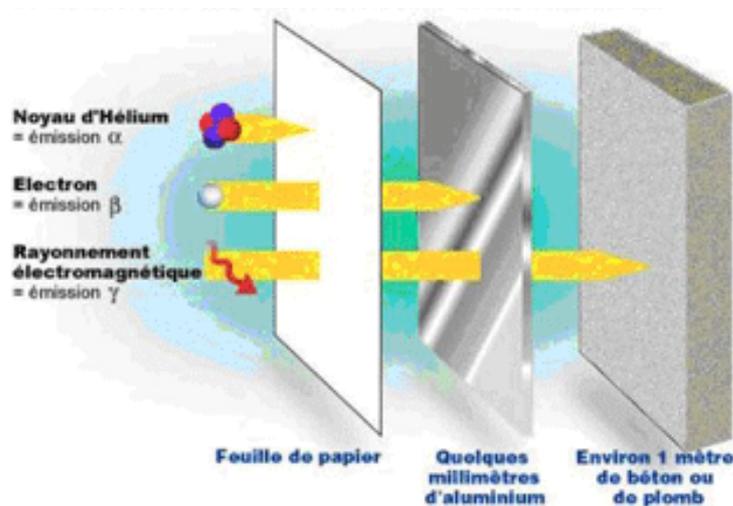


Figure 17 : Pouvoir de pénétration des différents rayonnements ionisants

Les rayonnements α sont arrêtés par exemple par une feuille de papier. Les rayonnements β peuvent être arrêtés par de l'aluminium ou du plexiglas. Les rayonnements γ ont quant à eux un pouvoir pénétrant beaucoup plus important et sont arrêtés par des couches de béton ou de plomb.

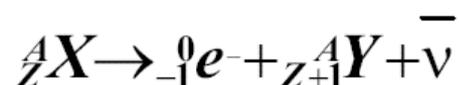
Rayonnement	Parcours		TEL
	Air	Eau et tissus	
α	5 à 10 cm	Quelques μm	+++
β	1 m	1 mm	++
γ	100 m à 1 km	10 cm	+

Table 8 : Parcours et TEL des différents rayonnements ionisants

b. Emetteurs β

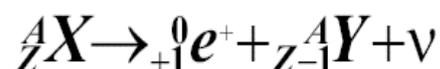
Deux types d'émetteurs β existent. Les radioéléments β^- qui émettent un électron négatif ou négaton et les radioéléments β^+ qui émettent un électron positif ou positon.

- La désintégration β^- est isobarique et est caractérisée par la transformation d'un neutron en proton avec pour conséquence l'émission d'un électron négatif et d'un antineutrino :



Les émetteurs β^- ont un TEL plus faible que les émetteurs α et ont un pouvoir pénétrant plus important, allant de quelques micromètres à une dizaine de millimètres. Ils sont utilisés en radiothérapie interne vectorisée (Table 8, Figure 17).

- La désintégration β^+ est isobarique et est caractérisée par la transformation d'un proton en neutron avec pour conséquence l'émission d'un électron positif et d'un neutrino :



Les émetteurs β^+ sont utilisés en imagerie par Tomographie à Emission de Positons (TEP). Les positons qui sont émis, vont, après avoir perdu leur énergie dans la matière, interagir avec des électrons du milieu, et s'annihiler en émettant deux photons γ de 511keV. Ces photons émis de façon antiparallèle sont détectables par des capteurs placés en couronne. Le signal est pris en compte uniquement s'il y a une détection simultanée sur les scintillateurs opposés (Figure 18). La désintégration β^+ est en compétition avec la capture électronique qui

correspond à la captation d'un électron du cortège électronique par le noyau père qui se transforme alors en son noyau fils.

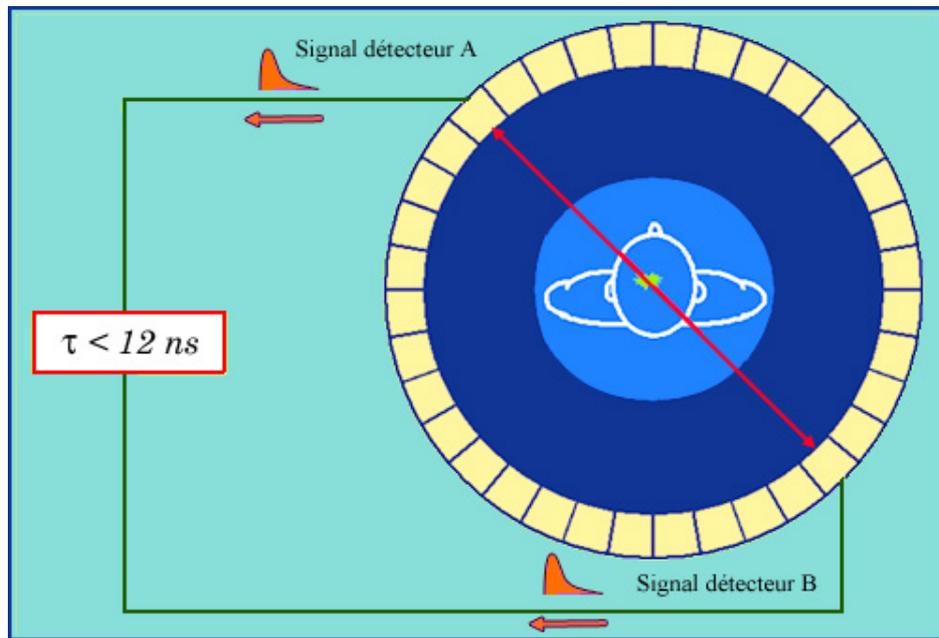


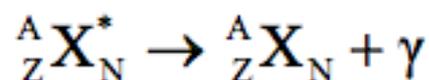
Figure 18 : Principe de fonctionnement d'une caméra TEP (site *laradioactivite.com*)

Les deux rayons gamma, émis de façon antiparallèle lors de l'annihilation du positon, sont détectés pratiquement en même temps par les 2 scintillateurs (A et B) qu'ils frappent. Cette coïncidence dans le temps constitue une signature très forte qui les distingue d'autres photons. Des circuits électroniques, dits de « coïncidence » permettent de les sélectionner.

La pénétration des rayonnements β^+ est plus élevée que celle des particules α , cependant ils ne parcourent que quelques millimètres dans l'organisme (en fonction de leur énergie) et ne provoquent donc qu'une faible diffusion du signal détecté par la caméra TEP (Table 8).

c. Emetteurs γ

Très souvent à la suite d'une désintégration α ou β ou d'une réaction nucléaire, le noyau produit est dans un état excité. Le retour à l'état fondamental de ce noyau excité s'effectue généralement en une ou plusieurs transitions successives qui s'accompagnent d'une libération d'énergie. L'émission de photons γ est un des deux processus de désexcitation du noyau.



Ces photons sont des rayonnements constitués d'ondes électromagnétiques de courte longueur d'onde et d'énergie très variable. Les photons γ , particule sans masse, ni charge, ont un fort pouvoir pénétrant et un TEL faible. Ces rayonnements interagissant peu avec la matière, peuvent traverser des épaisseurs importantes de matière et sont par conséquent utilisés en imagerie par Tomographie à Emission Mono-Photonique (TEMP). Ils sont détectés par une gamma-caméra constituée de capteurs couplés à des collimateurs (canaux en plomb) permettant de sélectionner les rayonnements uniquement perpendiculaires aux collimateurs (Figure 19).

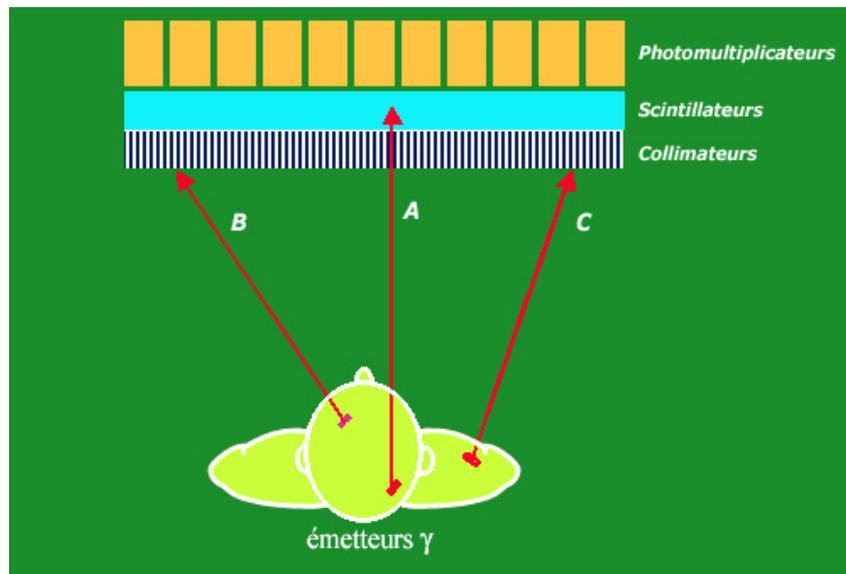


Figure 19 : Principe de fonctionnement d'une gamma-caméra (site laradioactivite.com)

Dans une gamma-caméra, connaissant la position de l'impact d'un des photons γ émis sur le détecteur, il faut connaître sa direction pour remonter au point d'origine. Pour cela, une collimation sélectionnant les photons ayant une direction donnée, est nécessaire. Sur la figure, seul le photon A qui atteint le scintillateur sera détecté par les photomultiplicateurs, les photons B et C seront absorbés par le plomb.

B. Applications des radioisotopes en thérapie et principaux REA utilisés pour le radiomarquage des Ac

1. Définitions

La **Radiothérapie Interne Vectorisée (RIV)** est définie comme l'utilisation de médicaments radiopharmaceutiques associant une molécule biologique à un isotope radioactif

émetteur β - ou α dans un but thérapeutique. Il s'agit d'émetteurs à fort pouvoir ionisant mais faible pouvoir pénétrant, le but étant de déposer beaucoup d'énergie localement afin d'induire la mort des cellules ciblées. La RIV utilise un radionucléide seul ou fixé sur des agents de vectorisation variés comme un peptide, ou encore un Ac monoclonal. Des peptides analogues de la somatostatine (octréotide, lanréotide par exemple) ont été marqués dans le cadre de traitement de tumeurs neuroendocrines, avec différents isotopes émetteurs β - comme l' ^{90}Y ou le lutétium 177 (Kraeber-Bodéré, 2011). Aujourd'hui ce sont les émetteurs β - qui ont le plus d'application. Mais il faut constater que depuis une dizaine d'années, de plus en plus d'études portant sur l'administration d'émetteurs α ont été publiées. En effet, ces derniers délivrent de très hautes énergies sur un parcours de l'ordre de la dizaine de μm alors que celui des β est de l'ordre de 0,1 à 1 cm. L'utilisation de ce type de REA pourrait donc permettre d'administrer une forte dose au niveau du tissu ciblé et ce en diminuant la toxicité au niveau des tissus avoisinants (Elgqvist, 2011). En 2013, le dichlorure de radium-223 (Xofigo[®]) a obtenu une AMM dans le traitement du cancer de la prostate résistant à la castration, avec métastases osseuses symptomatiques et sans métastases viscérales connues.

Dans le cas où l'agent de vectorisation du radioélément est un Ac monoclonal reconnaissant un Ag exprimé par les cellules tumorales, la RIV est appelée **Radio-Immuno-Thérapie (RIT)**. L'efficacité de ce radioimmunoconjugué provient essentiellement de la radioactivité qui provoque une irradiation à bas débit de dose, en déposant une dose d'irradiation de façon hétérogène, selon une exponentielle décroissante. A cet effet dosimétrique s'ajoute le rôle de l'Ac monoclonal qui peut stimuler les mécanismes entraînant un effet tumoricide. L'effet antitumoral de ce radioimmunoconjugué peut être augmenté car les mécanismes immunologiques se conjuguent aux mécanismes de toxicité radiobiologique. Les cellules non directement ciblées par les Ac monoclonaux, mais situées dans un environnement tissulaire proche, défini par la portée maximale de la particule chargée, peuvent être détruites par le mécanisme dit du « feu croisé » (Bodet-Milin, 2009). L'un des meilleurs exemples d'application de la RIT est l'ibritumomab tiuxétan (Zevalin[®]) marqué à l' ^{90}Y qui est indiqué dans le traitement des lymphomes folliculaires CD20 positifs chez les adultes réfractaires ou rechutant après traitement par rituximab.

La technique la plus récente de RIT est l'approche dite de **pré-ciblage** (Meredith et Buchsbaum, 2006). Le principe consiste à administrer, dans un premier temps un Ac non radioactif dit « froid », afin qu'il se fixe à l'Ag à cibler, et dans une seconde étape, une

molécule radiomarquée qui est capable de se fixer à l'Ac. L'Ac froid peut être capable de reconnaître en premier l'antigène cible et ensuite une petite molécule radiomarquée comme un haptène. L'haptène est choisi pour ses propriétés pharmacocinétiques : du fait de sa petite taille, il diffusera rapidement dans les tumeurs. La partie non fixée sera éliminée rapidement de l'organisme par excrétion rénale, limitant ainsi l'irradiation non spécifique du patient. Cette méthodologie porte le nom de « Affinity Enhancement System » ou AES et a pour objectif de réduire l'irradiation des tissus sains. Le premier modèle mis au point pour exploiter ce ciblage en deux temps utilisait le système bien connu « Streptavidine-Biotine ». L'administration de Streptavidine liée à l'Ac anti-CD20 était suivie par une administration de Biotine radiomarquée par de l' ^{90}Y (Meredith et Buchsbaum, 2006).

Dans certains cas, l'Ac froid est bispécifique et monovalent pour chaque antigène. Des essais cliniques ont par exemple été menés chez des patients atteints de cancer médullaire de la thyroïde avancé. Ces patients ont reçu un anticorps bispécifique anti-ACE et anti-diéthylentriamine pentaacétate (DTPA) suivi quatre à cinq jours après, par l'injection d'un haptène, le DTPA bivalent marqué à l' ^{131}I et à l'indium 111. L'émetteur à visée thérapeutique est ici l' ^{131}I (Kraeber-Bodéré, 2006).

2. Principaux REA utilisés pour radiomarquer des Ac en thérapie

- Les émetteurs β^-

Dans la [table 9](#) sont présentés les principaux REA utilisés en RIT dans des MRP ayant une AMM ou en essai clinique. Ces émetteurs diffèrent par leur période mais aussi par l'énergie de la particule β et donc par le rayon d'action du radioélément. Les plus utilisés sont l'yttrium 90 (^{90}Y), l'iode 131 (^{131}I) et de plus en plus, le rhénium 186 ou 188 (^{186}Re ou ^{188}Re).

Radionucléide	Période (jours)	Energie β^- (MeV)	Pénétration maximale dans les tissus	Energie γ associée (keV)
^{67}Cu	2,6	0,57	1,8 mm	511
^{90}Y	2,7	2,27	12,0 mm	–
^{131}I	8,0	0,81	2,0 mm	364
^{177}Lu	6,7	0,5	1,5 mm	113 – 208
^{186}Re	3,8	1,07	5,0 mm	137
^{188}Re	0,7	2,11	11,0 mm	155

Table 9 : Principaux radionucléides β^- utilisés en RIT

La table 9 décrit les principaux radioéléments émetteurs β^- utilisés en RIT avec leur période, l'énergie de leurs rayonnements β^- en MeV et de leurs rayonnements γ en keV le cas échéant. Elle montre également la pénétration maximale de ces rayonnements dans les tissus.

- Les émetteurs α

La table 10 présente les principaux émetteurs α étudiés en RIT. Aucun émetteur α couplé à un anticorps n'a actuellement d'AMM. Plusieurs essais pré-cliniques utilisant ce type d'émetteurs sont par contre en cours et montrent des résultats prometteurs (Roscher, 2013).

Radionucléide	Période	Energie α (MeV)	Pénétration maximale dans les tissus	Energie γ associée (keV)
^{211}At	7,2 jours	6 (42%) – 7,5 (58%)	70 μm	70-80-570
^{213}Bi	0,7 jour	6 (2%) – 8 (58%)	80 μm	440
$^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$	10,6 heures	8,8	100 μm	

Table 10 : Principaux radionucléides α utilisés en RIT

La table 10 décrit les principaux radioéléments émetteurs α utilisés en RIT avec leur période, l'énergie de leurs rayonnements α en MeV et de leurs rayonnements γ en keV le cas échéant. Elle montre également la pénétration maximale de ces rayonnements dans les tissus.

C. Applications des radioisotopes en imagerie et principaux REA utilisés pour le radiomarquage des Ac

1. Applications des radioisotopes en imagerie

a. Applications en imagerie TEMP et TEP

Pour la réalisation de scintigraphies, les critères de choix du radioisotope à visée diagnostique sont avant tout le type de rayonnement (β^+ ou γ) et sa période. Une période courte sera favorable pour optimiser la radioprotection des patients et du personnel, toutefois elle devra être compatible avec le mode de production et d'approvisionnement du radiotraceur. Concernant les émetteurs γ , l'énergie du rayonnement devra être adapté aux caméras utilisées (100 – 350 keV). Mais d'autres éléments sont également à prendre en compte dans le choix d'un radioélément comme l'isotope de décroissance, son mode de production et la méthode de radiomarquage.

La décroissance radioactive de l'isotope utilisé ne doit pas conduire à la formation d'un autre isotope radioactif, afin de limiter les irradiations non désirées.

Le mode de production de l'isotope radioactif est à prendre en compte car la disponibilité de celui-ci et les coûts vont en dépendre. Tous les isotopes utilisés en Médecine Nucléaire sont obtenus à partir de trois grands modes de production : cyclotron (Iode 123 ^{123}I , Fluor 18), réacteurs nucléaires (^{125}I), ou générateurs (Technétium 99 métastable $^{99\text{m}}\text{Tc}$). Ce dernier mode est très avantageux puisqu'il permet de produire l'élément radioactif désiré sur le site même, en fonction des besoins, avec une activité spécifique importante et à un moindre coût.

La méthode de radiomarquage est un des critères déterminants en diagnostic comme en thérapie. Elle doit être simple, en une ou deux étapes au maximum, et doit permettre d'obtenir une pureté radiochimique supérieure à 90%. Les radiopharmaceutiques obtenus doivent être stables dans le milieu circulant (détection de la radioactivité) et la présence du radioélément sur la molécule vectrice ne doit pas altérer ses propriétés ciblantes. Selon le radioélément, deux types de marquage sont possibles : par liaison covalente ou par complexation.

Un dernier critère à ne pas négliger est celui de la radioprotection du personnel manipulant ce radioélément.

Les émetteurs β^+ les plus utilisés en TEP, sont l'oxygène ^{15}O , l'azote ^{13}N , le carbone ^{11}C et le fluor ^{18}F (Table X). Ces isotopes ont des demi-vies courtes respectivement de 2.1, 10, 20.4 et 110 minutes, ce qui impose une production et une synthèse sur le lieu où l'imagerie est réalisée. Ces synthèses sont lourdes en équipement, en personnel et réservées à de rares centres (Vilain et Papathanassiou, 2012). Ces différentes contraintes ont conduit à plutôt développer des molécules marquées au ^{18}F , pouvant être distribuées en dehors du site de production dans des centres dépourvus de cyclotrons.

La TEP au [^{18}F]-Fluorodésoxyglucose (Figure 18), analogue fluoré du glucose représente la principale avancée de l'imagerie radioisotopique des tumeurs. Ce radiotracer va s'accumuler dans les cellules en fonction de leur consommation en glucose, et va donc se concentrer dans les tumeurs présentant un métabolisme accru. Cette imagerie par marquage métabolique est très sensible et résolutive mais a peu de spécificité, toutes les cellules métaboliquement actives fixant ce MRP (Montravers, 2009). Un autre émetteur β^+ qui fait l'objet de nombreuses recherches est l'iode 124, de demi-vie 4.2 jours. Ce radioisotope serait intéressant pour marquer des Ac, compte tenu de sa demi-vie adaptée à une imagerie tardive.

En Médecine Nucléaire, dans le cadre d'application diagnostique le radioisotope de choix reste le $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Il s'agit de l'émetteur γ de loin le plus utilisé aujourd'hui pour les examens par scintigraphie monophotonique. Il peut être administré seul ou couplé à un vecteur. Les isotopes de l'iode, ^{123}I et ^{131}I sont également employés dans les explorations morphologiques et fonctionnelles de la thyroïde. En outre, ^{123}I est un radioélément intéressant pour marquer des petites molécules comme des peptides, mais il présente un coût de production important. ^{131}I possède quant à lui, une composante photonique d'énergie élevée, associée à l'émission de β^- en faisant plutôt un radiopharmaceutique utilisé en thérapeutique. Ces critères limitent donc l'utilisation de ces deux isotopes de l'iode. Parmi les émetteurs γ , il faut aussi citer l'indium 111 (^{111}In) qui est un isotope utilisé pour marquer des vecteurs dont la biodistribution vers l'organe cible est lente (Table 11).

Radionucléide	Emission	Période	Energie (keV)	Production	Utilisation
⁶⁷ Ga	γ - CE	78,24 h	90-190	Cyclotron	TEMP
¹²³ I	γ - CE	13,2 h	160	Cyclotron	TEMP
¹¹¹ In	γ - CE	67,2 h	171-245	Cyclotron	TEMP
^{99m} Tc	γ	6,02 h	140	Générateur	TEMP
²⁰¹ Tl	γ	73,2 h	170	Cyclotron	TEMP
¹¹ C	β+	20,4 min	960	Cyclotron	TEP
¹⁸ F	β+	109,8 min	630	Cyclotron	TEP
⁶⁸ Ga	β+ - γ	1,12 h	1900	Générateur	TEP
¹⁵ O	β+	2,1 min	1730	Cyclotron	TEP
¹³ N	β+	10 min	1190	Cyclotron	TEP

Table 11 : Principaux radionucléides utilisés en diagnostic en Médecine Nucléaire

Les deux techniques d'imagerie TEMP et TEP présentent individuellement des avantages et des limites en terme de sensibilité et de résolution (Table 12).

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

Table 12: Comparaison clinique et préclinique des propriétés de l'imagerie TEP et TEMP

(Jansen et Vanderheyden, 2007)

Le développement de nouveaux radiopharmaceutiques, les améliorations techniques et la combinaison à d'autres techniques d'imagerie comme le scanner ou l'IRM ont pour but de diminuer ces limites. Ainsi, l'utilisation de TEMP-TDM (Tomodensitométrie), de TEP-TDM

ou encore de TEP-IRM permet d'obtenir de bien meilleures résolutions et une amélioration des diagnostics en associant des informations fonctionnelles et morphologiques.

Des limites en terme de spécificité existent toujours pour ces deux techniques. Pour pallier ce manque de spécificité, de nouveaux radiotraceurs capables de cibler les tumeurs sont toujours recherchés.

b. Cas particulier de l'application des radioisotopes chez le petit animal

L'imagerie est devenue un des piliers de la recherche translationnelle du fait de son caractère non invasif. A côté du scanner, de l'IRM ou de l'échographie permettant principalement d'obtenir des images anatomiques, les techniques d'imagerie nucléaire et optique, conduisant à des images fonctionnelles, occupent une place privilégiée dans les études pré-cliniques (Table 13). Ces dernières techniques sont utilisées pour suivre l'évolution d'évènements biologiques ou pharmacologiques, mais aussi pour explorer le devenir pharmacocinétique ou métabolique de nouvelles molécules.

Modalité	Agent physique	Sensibilité Contraste (sonde, mol/L)	Résolution spatiale (mm)	Résolution temporelle	Type d'imagerie
TDM (CT)	Rayon X	+ $10^{-2} - 10^{-3}$	++ MicroCT 0,02-0,3 CT clinique 0,5-2	+	Anatomique
IRM	Radiofréquence	++ $10^{-3} - 10^{-5}$	+++ Petit animal 0,01-0,1 Clinique 0,5-1,5	++	Anatomique Fonctionnelle
Echographie	Ultrasons	++ Visualisation de microbulles individuelles possible	+++ Petit animal 0,04-0,1 Clinique 0,15-1,0	+++	Anatomique Fonctionnelle
Imagerie nucléaire	Rayon gamma	+++ TEMP $10^{-10} - 10^{-11}$ TEP $10^{-11} - 10^{-12}$	+ Micro TEMP 0,5-2 TEMP Clinique 7-15 Micro TEP 0,1-2 TEP Clinique 6-10	+	Fonctionnelle Moléculaire
Imagerie optique	Rayon UV, visible ou IR	+++ $\approx 10^{-9} - 10^{-12}$	+ Fluorescence ≈ 1 Bioluminescence 3-5	+++	Moléculaire

Table 13 : Comparaison des différentes techniques d'imagerie disponibles.

Malgré le principe séduisant de l'imagerie et le développement d'appareils dédiés au petit animal, des limitations persistent, en particulier en terme de résolutions spatiale et temporelle. Pour mener des études de biodistribution plus précises à l'aide de composés radiomarqués, des techniques de caractérisation *in vitro*, *post mortem* ou *in vivo* sont également utilisées. Ces principales techniques, présentées succinctement ci-dessous, sont *in vivo*, les Beta-MicroProbe, *post mortem*, les prélèvements et comptages d'organes, et *in vitro*, l'autoradiographie.

i. *In vivo* : Beta-MicroProbe

Cette technique est complémentaire à la TEP chez le petit animal. Il s'agit de sondes radiosensibles permettant la mesure locale quantitative de molécules marquées à l'aide d'isotopes β^+ afin de suivre l'évolution du traceur. Les sondes sont implantées *in situ* dans les compartiments spécifiques et non spécifiques (Figure 20). Cette implantation permet d'obtenir les cinétiques locales de fixation des radiotraceurs sur leur cible d'intérêt avec une haute résolution temporelle (Desbrée, 2005). Contrairement à la TEP, ce ne sont pas les gammas d'annihilation qui sont détectés mais directement les positons. Le principe de détection de la sonde repose sur le parcours limité des particules β dans les tissus. La Beta-MicroProbe nécessite l'anesthésie et la stéréotaxie du petit animal. Il s'agit donc d'une technique plus ou moins invasive, selon la région que l'on souhaite étudier.

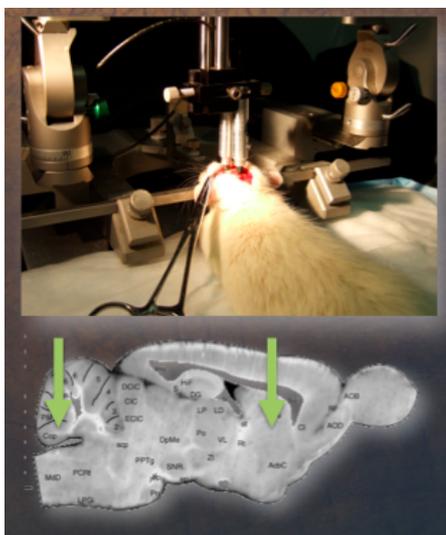


Figure 20 : Image d'un rat équipé de sondes dans des régions spécifiques du cerveau.

Cette technique présente une très grande résolution temporelle, idéale pour la modélisation cinétique. Elle est peu onéreuse et peut être couplée à d'autres techniques dédiées aux études *in vivo* chez le petit animal.

ii. Les études de biodistribution *ex vivo*

Le radiotraceur est administré chez l'animal vigile ou anesthésié. L'animal est ensuite sacrifié à un temps précis. Ses tissus sont alors étudiés par comptage de la radioactivité présente dans les régions d'intérêt ou par exposition des coupes sur des films

autoradiographiques, dont le principe est décrit dans le paragraphe suivant. Ainsi les paramètres du radiotraceur peuvent être évalués : sa distribution, son pourcentage de pénétration, sa fixation spécifique ou sélective... Si la cinétique du radiotraceur est inconnue les études de biodistribution doivent se faire à plusieurs temps. Si la cinétique du radiotraceur est connue, des études de compétition ou de détermination du rapport signal/bruit peuvent être menées en prenant un seul point.

iii. *In vitro* : autoradiographie

L'autoradiographie est une technique d'imagerie par émission qui s'oppose à la radiographie qui est une imagerie de transmission de rayons X. Elle permet la détection qualitative (ou quantitative à l'aide d'une gamme étalon) de radioactivité fixée sur un substrat solide tel qu'un tissu cellulaire. Elle est réalisée à partir d'une source radioactive placée au contact d'une émulsion ou d'un film photographique à base de sels d'argent qu'elle va modifier par une réaction de sensibilisation. La sensibilisation consécutive à l'interaction des émissions radioactives sur les grains d'argent va ainsi créer des zones noircies sur la plaque qui vont permettre de localiser la structure recherchée. Le film argentique a été remplacé aujourd'hui, par une technique de révélation plus récente qui emploie des écrans radioluminescents à mémoire. Ces écrans sont aussi appelés plaques au phosphore photostimulables ou « phosphorscreen ». Durant l'exposition de la source radioactive, les écrans vont stocker l'énergie déposée par les rayonnements ionisants. La lecture des écrans est effectuée à l'aide d'un appareil numériseur équipé d'un laser, qui permet de restituer l'énergie par photostimulation laser. Deux techniques d'autoradiographie existent :

- Autoradiographie « *ex vivo* » par exposition de tissus coupés très finement, d'un animal ayant reçu un radiotraceur, les tissus sont alors la source de rayonnements, comme expliqué précédemment.
- Autoradiographie « *in vitro* » pour marquer l'emplacement de molécules au sein des tissus cellulaires. Les organes à étudier sont prélevés chez l'animal puis découpés en sections très fines. Les coupes sont alors mises en présence de la molécule radioactive pendant une courte durée appelée « pulse ». Certaines coupes sont de plus transférées dans un milieu contenant la même molécule, mais « froide » pendant une période plus ou moins longue afin de favoriser le déplacement des molécules « chaudes » et de déterminer la fixation non spécifique. Les coupes sont enfin fixées pour bloquer toute modification.

2. Principaux REA utilisés pour radiomarquer des Ac en diagnostic (Table 14) :

L'iode 124 est un isotope de l'iode, émetteur β^+ produit par cyclotron qui fait l'objet de nombreuses recherches. Les méthodes de radiohalogénéation possibles et ses caractéristiques physiques en font un isotope très attractif pour la synthèse et le design de nouveaux radiotraceurs utilisables en TEP. Sa demi-vie en particulier le rend intéressant pour marquer des Ac monoclonaux. Robinson a par exemple étudié la biodistribution de diabodies anti-HER2 marqués à l' ^{124}I ciblant des tumeurs HER2 positives greffées chez des souris (Robinson, 2005) et a montré qu'ils pourraient représenter un nouveau traceur TEP pour les cancers du sein. La limite à son utilisation est sa disponibilité puisque ce radioélément n'est pas commercialisé actuellement. Il reste un isotope réservé aux centres disposant d'un cyclotron adapté à sa production.

L' ^{111}In ($T_{1/2}=62$ h) est un produit de cyclotron. Il émet des photons gamma d'énergie bien adaptée aux seuils de détection des gamma-caméras. Les biomolécules radiomarquées à l' ^{111}In sont actuellement surtout des protéines, des peptides, voire des Ac. Ces radiomarquages ont pour objectif le ciblage des antigènes et des récepteurs surexprimés dans certaines tumeurs et donc la détection de tumeur par TEMP. Les Ac monoclonaux ou les fragments dirigés contre la mésothéline exprimée dans les mésothéliomes, les carcinos du poumon, du pancréas (...) ont été radiomarqués par l' ^{111}In par plusieurs équipes, notamment celle de Hassan (Hassan, 1999) et de Misri (Misri, 2011). Leurs études ont montré des résultats concluants quant à l'utilisation de ces Ac radiomarqués à l' ^{111}In en imagerie, avec un bon rapport signal/bruit.

Le cuivre 64 avec une période physique de 12,7 h, est un autre émetteur de positons de grand intérêt qui est également envisagé pour le radiomarquage d'Ac. Un minibody anti-CD20 a notamment été marqué par le ^{64}Cu et l' ^{124}I par l'équipe de Chopra (Chopra, 2004).

L'yttrium 86 est appliqué pour les études dosimétriques pré-thérapeutiques. Compte tenu de l'actuelle utilisation routinière de l' ^{90}Y pour le marquage des immunoconjugués et des peptides, la paire de radioisotopes yttrium 86/yttrium 90 est intéressante. Pourtant, la haute énergie des rayonnements gamma, émis en abondance par l'yttrium-86, est un inconvénient majeur pour l'utilisation en routine de ce radioisotope.

Le scandium 44m est aussi intéressant pour les études dosimétriques pré-thérapeutiques, mais il s'agit d'un isotope « exotique » réservé à des centres particuliers.

Le technétium 99m reste un radioélément de choix et sera détaillé dans le paragraphe suivant.

Radionucléide	Période (heures)	Energie β^+ (MeV)	Energie γ (keV)	Utilisation
^{64}Cu	12,7	0,65	–	TEP
^{124}I	100,8	2,14	602-723-1691	TEP
^{111}In	67,2	–	171-245	TEMP
$^{44\text{m}}\text{Sc}$	3,9	1,47	1157	TEP
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,02	–	140	TEMP
^{86}Y	14,7	3,14	443-628-1077	TEP

Table 14 : Principaux radionucléides utilisés en RIS.

La table X décrit les principaux radioéléments utilisés en RIS avec leur période, l'énergie de leurs rayonnements γ (en keV) et/ou β^+ (en MeV) et enfin leur utilisation en imagerie TEMP ou TEP.

D. Radiomarquage au technétium 99m

1. Le technétium

La découverte du technétium ($Z = 43$), du grec technetos (artificiel) est attribuée à Segré et Perrier en 1937 (Chopra, 2004). C'est un métal de transition artificiel. Il possède plus de 30 radioisotopes connus (du ^{90}Tc au ^{110}Tc). Parmi ces isotopes, le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ est le plus utilisé et représente le nucléide de choix en Médecine Nucléaire. Il est à l'origine de 80% des explorations scintigraphiques. Le $^{94\text{m}}\text{Tc}$ est un émetteur intéressant, majoritairement β^+ (2,44 MeV), de période 52 min, produit dans un cyclotron. Il est utilisable en imagerie TEP mais le développement de traceurs à base de $^{94\text{m}}\text{Tc}$ est à l'heure actuelle très limité en raison de la concurrence exercée par le ^{18}F (Aufort, 2008).

2. Propriétés physiques et production du technétium 99m

L'utilisation prépondérante du technétium 99m (^{99m}Tc) en Médecine Nucléaire est notamment due à ses propriétés physicochimiques et à sa disponibilité. En effet, le radionucléide d'un radiopharmaceutique à usage diagnostique doit émettre des rayonnements pénétrants, peu ionisants avec une émission γ comprise entre 100 et 200 keV adaptée aux gamma-caméras, une demi-vie courte, et l'absence d'émission conjointe de particules chargées.

Le ^{99m}Tc présente ces propriétés, puisqu'il s'agit d'un émetteur γ pur, présentant une énergie de 140 keV, de période courte ($T_{1/2} = 6,02$ h) permettant d'administrer aux patients des activités suffisamment importantes pour avoir de bonnes images scintigraphiques tout en évitant une irradiation excessive. De plus, il est facilement obtenu à partir d'un générateur de molybdène $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ permettant sa production quotidienne dans les services de Médecine Nucléaire, à un coût raisonnable. Le ^{99m}Tc provient de la désintégration β^- du ^{99}Mo . Le ^{99}Mo peut être produit soit par activation neutronique du ^{98}Mo en réacteur nucléaire, soit par fission de l'Uranium 235. Le ^{99}Tc , élément fils de période longue ($2,1 \cdot 10^5$ ans) est obtenu à partir du ^{99}Mo par voie directe à 13% et par voie indirecte à partir du ^{99m}Tc suivant le schéma présenté en Figure 21.

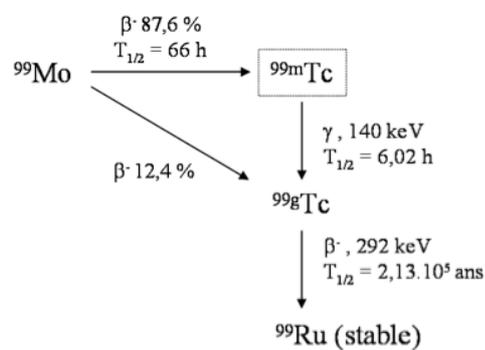
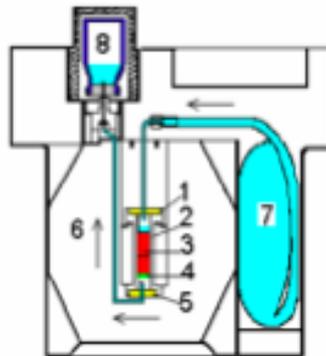
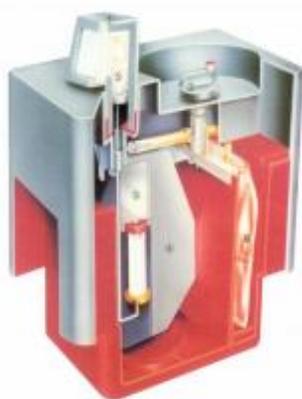


Figure 21 : Schéma de désintégration du ^{99}Mo



1. Capsule métallique
2. Colonne de verre
3. Alumine
4. Filtre
5. Capsule métallique
6. Blindage de plomb
7. Poche NaCl 0,9%

Figure 22 : Générateur de molybdène $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

Le générateur de molybdène $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Figure 22), est constitué de molybdate $^{99}\text{MoO}_4^-$ adsorbé sur une colonne d'alumine échangeuse d'ions. Le ^{99}Mo décroît continuellement en $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et ^{99}Tc . La colonne est éluée par une solution stérile de chlorure de sodium 0,9% qui va permettre d'entraîner les ions technétium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et ^{99}Tc , sous forme de pertechnétate (TcO_4^-) faiblement fixés alors que le ^{99}Mo est lui retenu. L'éluat est alors composé de chlorure de sodium 0,9% contenant l'espèce $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- \text{Na}^+$ en concentration inférieure à 10^{-6}M .

3. Chimie du technétium

Le technétium est un métal artificiel de la deuxième série des éléments de transition qui appartient au groupe VIIB comme le manganèse et le rhénium. Il possède sept électrons « s » et « d » sur sa couche de valence. Sa configuration électronique est la suivante : $[\text{Kr}] 4d^5 5s^2$. La chimie du technétium, est dominée par la formation de complexe métal (accepteur d'un ou de doublets électroniques)/ligand (donneur de doublet).

En Médecine Nucléaire, les complexes peuvent être classés en deux catégories :

- Les complexes métalliques très stables qui possèdent les propriétés biologiques «technétium-essentiels» dans lesquels le complexe chélatant fait partie intégrante de la structure active et complète le vecteur. Le complexe formé ne doit pas être métabolisé dans l'organisme. Sans le métal, la molécule ne serait pas délivrée à sa cible. Ce sont principalement des traceurs de débit, utilisés pour les explorations des fonctions rénale et cardiaque, et de la perfusion cérébrale.

- Les complexes métalliques «technétium-non essentiels» où l'atome de ^{99m}Tc est ajouté à une molécule biologiquement active. Ces composés biologiquement actifs peuvent être préparés en tant que «technétium-non essentiels» car ils se lient à leur cible avec ou sans l'inclusion du métal. La fixation de l'isotope se fait par l'intermédiaire d'un chélate bifonctionnel.

Le technétium possède neuf degrés d'oxydation de Tc (-I) à Tc (+VII). En solution aqueuse, le diagramme potentiel-pH du technétium montre que seuls les degrés d'oxydation +VII, +IV voire +III sont stables en présence d'eau (Figure 23). Les autres degrés d'oxydation ne sont stabilisés que par des ligands hétéroatomiques différents de H_2O .

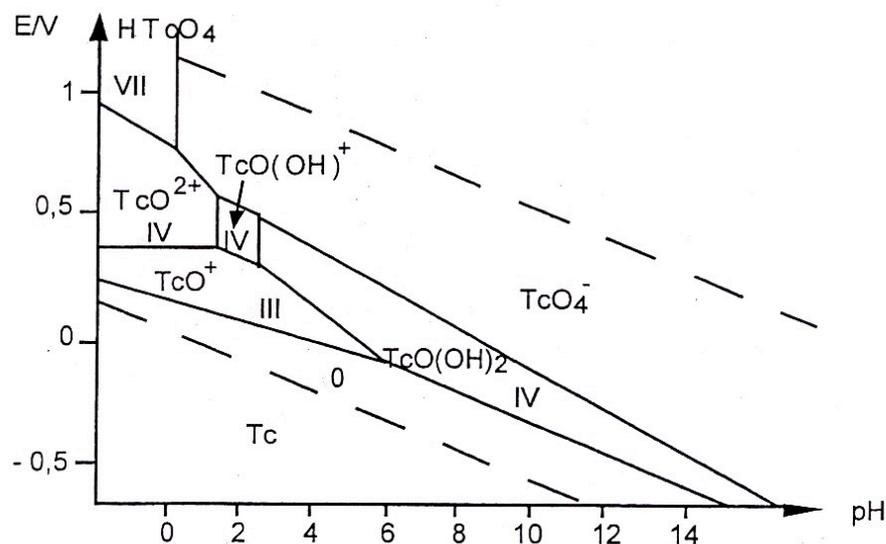


Figure 23 : Diagramme potentiel-pH du technétium dans l'eau à 25°C.

A potentiel d'oxydoréduction élevé (+VII), à pH physiologique et en solution aqueuse, la forme stable est l'ion pertechnétate TcO_4^- . Quand le potentiel diminue, c'est le degré +IV qui devient prépondérant. La zone de prépondérance de Tc (III), en milieu acide, est très limitée. Enfin, à faible potentiel, c'est le Tc métallique (0) qui est stable.

a. Réduction du pertechnétate

Pour pouvoir former des complexes, le technétium doit être réduit à des degrés d'oxydation inférieurs à VII, ce qui forme des orbitales « d » vides, qui vont lui permettre de se lier à des ligands donneurs d'électrons (N, S, P, carboxylates) avec un nombre de coordination allant de 4 à 9. Le contrôle de l'état d'oxydation du technétium va dépendre de nombreux paramètres comme la nature du réducteur, le pH et la température de réaction, et la

nature des ligands et des coligands (Verbeke, 2003). Les formes réduites doivent être complexées par le ligand dès leur formation car elles peuvent réagir avec des molécules d'eau et d'oxygène pour aboutir à des complexes inertes. La stabilité des complexes technétiés injectés est primordiale, sans quoi c'est la biodistribution de TcO_4^- qui est observée.

De nombreux réducteurs existent sur le marché : Fe(II), Cu(II), thiols, phosphines, borohydrure de sodium... Néanmoins, l'étain stanneux (Sn^{2+}) disponible sous forme de chlorure d'étain est le plus utilisé, car il est stable, soluble dans l'eau et peu toxique (Ardisson, 2005).

b. Structure générale des complexes technétiés

La structure générale des complexes technétiés peut être représentée par $[\text{Tc X}_n \text{L}_m]$ avec TcX le cœur du complexe, où $X = \text{oxygène, soufre ou azote}$ et L le ligand. Selon la nature de X et la valeur de n , on distingue par exemple (Figure 24) :

- $n=0$ cœur métallique Tc
- $n=1$ $X = \text{O}$ cœur monoxotechnétium TcO^{3+}
- $X = \text{N}$ cœur nitrurotechnétium TcN^{2+}
- $n=2$ $X = \text{O}$ cœur dioxotechnétium TcO_2^{2+}

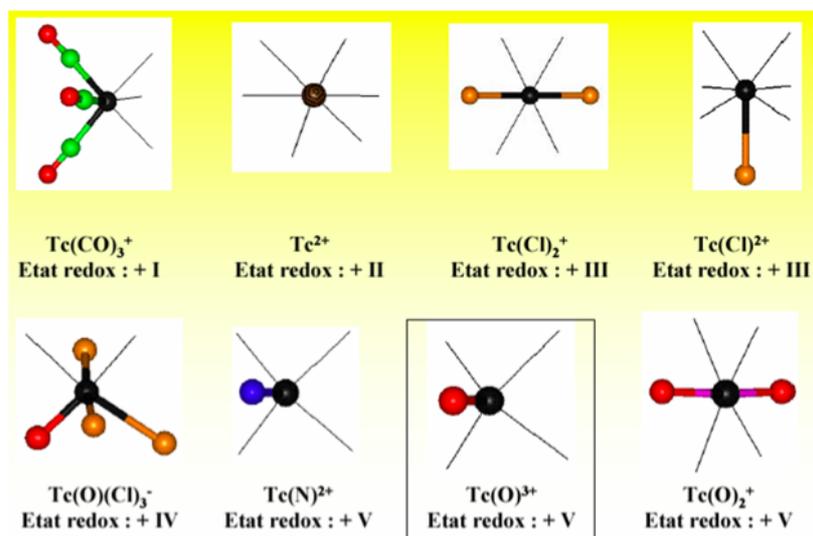


Figure 24 : Principaux coeurs de technétium et état d'oxydation du coeur métallique.

Les degrés +I, +III et +V sont les plus stables et les plus accessibles dans la forme complexée. Le cœur métallique va déterminer en partie la structure du complexe et le choix des atomes donneurs. La majorité des complexes commercialisés, c'est à dire les complexes ^{99m}Tc originaux, se trouvent aux degrés d'oxydation +V, +IV, +I que nous allons détailler.

- Complexes de degré d'oxydation +V (d^2)

Les complexes de degré d'oxydation +V sont les plus rencontrés en Médecine Nucléaire. Les cœurs les plus représentatifs de cet état d'oxydation sont le monoxotechnétium $[\text{TcO}]^{3+}$, le dioxotechnetium $[\text{TcO}_2]^+$ et le nitrurotechnétium $\text{Tc}(\text{N})^{2+}$. Le cœur $[\text{TcO}]^{3+}$ est le plus répandu et se forme facilement au cours de la réduction du pertechnétate en milieu aqueux légèrement acide. Le métal est, dans ces complexes, considéré comme pentacoordonné, le métal étant situé au-dessus du plan contenant les quatre ligands (Figure 25). Les thiolates peuvent représenter des ligands donneurs stabilisant ce cœur.

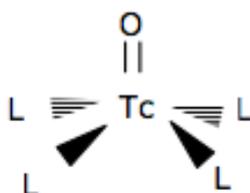


Figure 25 : Cœur monoxotechnétium

Le radiopharmaceutique le plus connu avec ce cœur technétié est l'examétazine (HMPAO) Ceretec[®] (Figure 26) indiqué dans la scintigraphie cérébrale ou le marquage des polynucléaires neutrophiles.

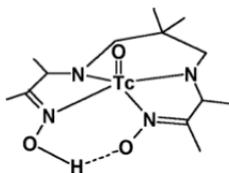


Figure 26 : Structure du ^{99m}Tc -HMPAO

- Complexes de degré d'oxydation +IV (d^3)

Ce sont les premiers complexes à avoir été synthétisés en Médecine Nucléaire pour les scintigraphies osseuses. Les complexes les plus fréquents de ce degré d'oxydation sont

l'oxyde ($TcO_2 \cdot xH_2O$) et les hexahalogénotechnétates (TcX_6^{2-}). Généralement, ces composés sont hexacoordonnés et sont formés lors des réactions de synthèse en milieu acide et en présence de réducteur comme le chlorure stanneux. Des réactions de marquage avec des ligands alkyldiphosphonates comme l'HMDP Osteocis[®] permettent d'avoir des radiopharmaceutiques à tropisme osseux qui vont se fixer aux cristaux d'hydroxyapatite de l'os en formation.

- Complexes de degré d'oxydation +I (d^6)

Ces complexes de bas degré d'oxydation ont suscité peu d'intérêt jusqu'à la description du $[^{99m}Tc(MIBI)_6]^+$, composé stable et hydrosoluble, par Trop *et al.* en 1980. Ce radiopharmaceutique appelé sestamibi Cardiolite[®] est aujourd'hui très employé et indiqué dans les explorations myocardiques, et les scintigraphies des parathyroïdes (Figure 27).

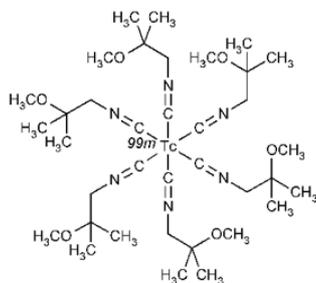


Figure 27 : Structure du ^{99m}Tc -MIBI

Les phosphines, les isocyanures et les groupements CO, peuvent donner des liaisons fortes avec le métal à bas degré d'oxydation, en stabilisant l'état d'oxydation du métal riche en électrons. Ces ligands doivent comporter des accepteurs π .

Les formes acides molles (de bas degré d'oxydation comme le degré (+I)) sont préférentiellement complexées par des ligands mous, comme le carbone. Ces formes de degré d'oxydation (+I) sont cinétiquement inertes, elles n'ont pas besoin d'être complexées par des ligands très « architecturés ».

L'équipe de Alberto *et al.*, en 1998, a créé un complexe dans ce degré d'oxydation dans lequel le technétium est lié à trois molécules de monoxyde de carbone et à trois ligands donneurs. Il s'agit du cœur tricarbonyl, aujourd'hui utilisé comme complexe intermédiaire échangeant des ligands avec un synthon bifonctionnel (qui sera développé dans le paragraphe III. D. 4. c).

4. Possibilités de radiomarquage par le ^{99m}Tc

La synthèse des complexes technétiés implique habituellement trois composants : le pertechnétate (TcO_4^-), un réducteur (R) et un ligand (L). On distingue trois approches de radiomarquage.

a. Approche par voie directe : complexation rapide (Figure 28)

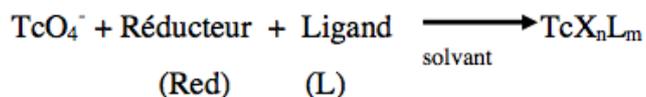


Figure 28 : Réaction de marquage par voie directe (X = oxygène)

Dans le cas de protéine, cette méthode directe de complexation d'un radiométal met à profit les groupements chélatants libres des chaînes latérales des acides aminés. Lors du radiomarquage des Ac monoclonaux par voie directe, la stabilité du complexe est corrélée avec la densité des groupements thiol, cela révèle le rôle déterminant de ces groupes dans la complexation (Comet et Vidal, 1999). Le solvant est généralement de l'eau si le ligand est hydrophile ou un mélange alcool/eau.

Par exemple, l'Ac arcitumomab a été marqué au ^{99m}Tc par cette approche qui ne nécessite pas de modification de la molécule vectrice et est aisée à mettre en œuvre (Goldenberg et Wegener, 1997). Le marquage direct peut aussi être effectué en utilisant un agent réducteur comme le 2-mercaptoéthanol convertissant des ponts disulfures de la protéine en groupes thiol libres auxquels le ^{99m}Tc est capable de se lier efficacement. Les groupes thiol libres peuvent de la même manière, être générés en photoactivant la protéine par une irradiation UV. Cette méthode a été utilisée pour radiomarquer du rituximab et a montré de bons rendements de marquage (Stopar, 2006). L'inconvénient du marquage direct est la plus faible stabilité du complexe formé par la création de liaisons de faible affinité ainsi que le risque d'altération de la structure et des propriétés biologiques de la macromolécule. Cette méthode est donc peu utilisée.

b. Approche intégrée

Dans cette stratégie de radiomarquage, la partie chélatante de l'isotope radioactif fait partie intégrante de la partie ciblant. La structure chimique et tridimensionnelle de la molécule à marquer doit être maintenue pour pouvoir être reconnue par le récepteur : la molécule marquée finale doit avoir une structure et une taille aussi proche que possible de la molécule ciblant.



Figure 29 : Stratégie de marquage de peptide par approche intégrée (en rouge : le métal et en bleu : le motif de chélation)

L'approche intégrée (1) a été par exemple exploitée par Aufort *et al.* en assemblant deux entités Ai et Bj capables de coordonner un cœur métallique M pour former un complexe [Ai.M.Bj]. Cette méthode (Figure 29) a été développée pour obtenir une chimiothèque de traceurs assemblés par coordination du ^{99m}Tc qui miment la séquence peptidique RGD (Arginine-Glycine-Asparagine) reconnue par l'intégrine $\alpha\text{V}\beta3$, première intégrine associée à l'angiogenèse tumorale (Aufort, 2008).

c. Marquage indirect : Approche bifonctionnelle

Le marquage indirect est effectué avec dans un premier temps la fonctionnalisation de la protéine par un synthon bifonctionnel (BiFunctional Chelate Agent BFCA), et dans un second temps la complexation du ^{99m}Tc . Un BFCA est un ligand possédant à une extrémité les propriétés de ligand multidenté permettant la coordination du métal et à une deuxième extrémité, un groupe fonctionnel permettant une liaison covalente avec la molécule à marquer (Figure 30).

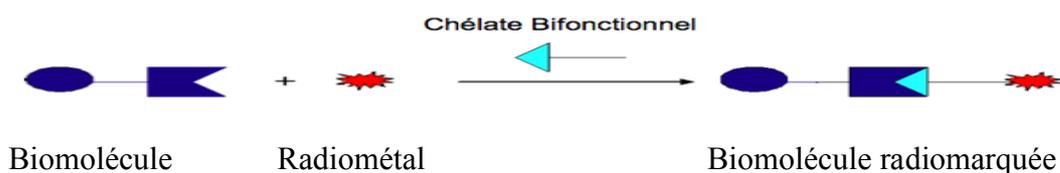


Figure 30 : Réaction de marquage par l'intermédiaire d'un chélate bifonctionnel

L'utilisation de synthon permet de marquer des molécules biologiques, jouant le rôle de vecteur jusqu'à la cible à étudier. Les radiopharmaceutiques obtenus vont exploiter les réactions de liaison Ag-Ac ou récepteur-ligand et sont composés : du vecteur qui transporte l'isotope radioactif (par exemple le ^{99m}Tc) jusqu'à la cible, éventuellement d'un « spacer » (chaîne hydrocarbonée ou peptidique pour minimiser les interactions vecteur-chélate/métal), d'un chélate bifonctionnel permettant de coupler le métal au vecteur, et de l'isotope radioactif comme le ^{99m}Tc qui n'intervient pas dans le mécanisme de reconnaissance mais qui sert uniquement pour la détection. De nombreux BFCA ont été développés. Les aspects physicochimiques, la stabilité thermodynamique et cinétique, la stabilité de l'état d'oxydation, les sites de liaison entrant en jeu, la préservation de l'activité biologique de la molécule à marquer sont autant de paramètres à prendre en compte pour le choix du chélate.

Le radiomarquage indirect peut être réalisé soit par une approche dite « pre-labelling » soit par une approche dite « post-labelling ».

- La première approche implique la formation du chélate technétié, puis la conjugaison de celui-ci à une biomolécule, dans une étape séparée. Cette approche a été utilisée avec succès pour le marquage de fragments d'Ac spécifiques du mélanome avec du ^{99m}Tc par Fritzberg *et al.* (Fritzberg, 1988). Dans cette voie, la chimie est mieux définie, et la biomolécule cible n'est pas exposée à des conditions difficiles dans l'étape de complexation. Cependant, cette technique est longue et nécessite de nombreuses étapes de synthèse chimique complexes.
- La deuxième approche implique d'abord la fixation du BFCA à la biomolécule pour former un conjugué. Une fois que le conjugué est préparé, le radiomarquage peut être réalisé soit par réduction directe de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ en présence d'une quantité suffisante du conjugué soit par échange de ligand avec un complexe intermédiaire du ^{99m}Tc , tel que le [^{99m}Tc] glucoheptonate (Ozker, 2002). Cette approche combine la facilité du marquage direct et la chimie de l'approche par chélate préformé. Il s'agit de la plus pratique pour la formulation de kit et pour le développement de produits commerciaux (Liu, 2008).

Les synthons bifonctionnels les plus appliqués sont l'EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique), le DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique acide), le DTPA (Acide Diéthylène Triamine Penta Acétique), l'HYNIC, le MAG3 et le tricarbonyl. Nous détaillerons l'HYNIC, le MAG3 et le tricarbonyl.

- HYNIC (Synthon bifonctionnel : S-6-HYNIC)

L'HYNIC ou 2-hydrazinonicotinamide est un agent bifonctionnel, qui possède à une extrémité une fonction acide qui se lie aux amines primaires des vecteurs, et à l'autre extrémité une fonction hydrazine qui se complexe au technétium pour donner un cœur diazotechnétium. Il a été décrit pour la première fois par l'équipe d'Abrams pour marquer des Ac (Abrams, 1990). L'HYNIC est aujourd'hui un BFCA utilisable pour marquer de nombreuses biomolécules, comme des analogues de la somatostatine (Decristoforo et Mather, 1999), des liposomes (Laverman, 1999), des protéines (Figure 31) comme l'annexine V (Biechlin, 2008).

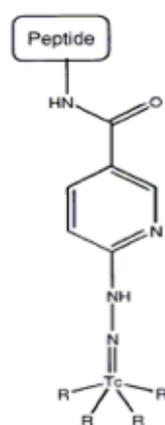


Figure 31 : Structure du complexe ^{99m}Tc -HYNIC-peptide

Le marquage est effectué en milieu aqueux par ajout de ^{99m}Tc en présence de réducteur. Les conditions de marquage (temps de réaction, pH et température) sont à déterminer pour chaque molécule. Le complexe HYNIC- ^{99m}Tc étant peu stable, la présence d'un coligand est nécessaire pour maintenir la structure et stabiliser le ^{99m}Tc à l'état d'oxydation V. Des coligands comme la tricine (Biechlin, 2008), le glucoheptonate (Liu, 1999), les phosphines ont été utilisés pour former un complexe mixte technétié. L'inconvénient de l'addition de ces coligands est qu'ils vont compléter la sphère de coordination, donc influencer la biodistribution en raison de la taille du complexe et peuvent inhiber la reconnaissance de la cible (Liu, 2005).

- Le synthon MAG3

Le MAG3 Mertiotide (mercaptoacetyltriglycine) est un ligand tétradente de la famille des chélatants du type $N_xS(4-x)$ (Figure 32). Il a l'avantage d'avoir une petite taille et une bonne stabilité. Ce ligand est utilisé pour la coordination du cœur monooxotechnétium TcO^{3+} , le ^{99m}Tc peut lier des atomes de soufre et d'azote. La molécule marquée peut présenter différents états intermédiaires : liaison à 4 soufres donc 4 MAG3, puis liaison à 2 soufres et 2 azotes soit 2 MAG3, et liaison à 1 soufre et 3 azotes soit 1 MAG3.

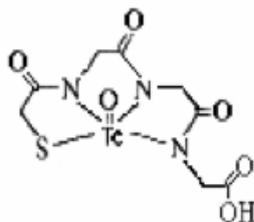


Figure 32 : ^{99m}Tc -Mertiotide

Ce synthon est très étudié, en particulier pour le marquage de nanopéptides, de peptides, et de protéines. Gano et al ont travaillé et obtenu de bons rendements sur le radiomarquage d'IgG polyclonales par le ^{99m}Tc par différentes techniques directes et indirectes notamment avec le synthon MAG3 (Gano, 1998). L'équipe de Faintuch a développé le marquage de nanopéptides dont la cible est le cancer de la prostate (Faintuch, 2011).

- Le complexe tricarbonyl

Le cœur tricarbonyl (Figure 33), a été développé pour la première fois par Alberto *et al.* en 1998, en présence de monoxyde de carbone gazeux et d'un réducteur soluble et fort mais qui ne se coordine pas avec le technétium réduit (Alberto, 1998). Ce complexe technétié peut maintenant être obtenu plus aisément à l'aide de pertechnétate de sodium ($^{99m}TcO_4^-$), et d'un kit commercial (Isolink[®]), dans lequel le boranocarbonate est utilisé comme source de monoxyde de carbone.

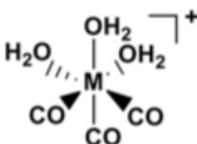


Figure 33 : Cœur tricarbonyl. M correspond à l'atome de ^{99m}Tc

Le complexe technétié obtenu, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$, est un semi-aquaion stable, dont les molécules d'eau très réactives peuvent facilement être substituées par un ligand donneur d'électron. Le pertechnétate $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, doit être réduit de l'état VII à l'état I car il est stabilisé à l'état d'oxydation I, il est alors difficilement oxydable par l'oxygène et ne nécessite pas la présence d'un coligand (Liu, 1999). Pour cela, un agent réducteur fort mais qui ne se coordonne pas au métal réduit et qui est soluble dans les solvants comme le NaBH_4 est nécessaire (Alberto, 1999). Dans le kit d'Isolink[®], le borocarbonate de sodium ($\text{Na}_2\text{BH}_3\text{CO}_2$) est présent et permet ainsi à la fois la production de CO et la réduction du technétium. La réaction est réalisée à pH 10-11 afin de stabiliser le réactif réducteur. A l'état I, en milieu aqueux, 3 sites de coordination sont occupés par le monoxyde de carbone CO et les sites restants sont occupés par des molécules d'eau. Le tricarbonyl précurseur est stable dans l'eau à pH basique mais il échange rapidement ses molécules d'eau avec une grande variété de ligands donneurs qui sont des ligands plus forts et plus mous que l'eau. Ces ligands qui se fixent facilement au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -aquaion peuvent être des thioéthers, thiolates et N-hétérocycles (Egli, 1999). Ce sont des fonctions qui correspondent aux chaînes latérales de la méthionine, cystéine et histidine. L'utilisation de ce cœur a permis notamment de marquer des peptides préparés avec de l'histidine en position N-terminale et des fragments d'Ac avec de bons rendements (Waibel, 1999). Cette méthode de marquage est donc particulièrement intéressante pour marquer des protéines comme des Ac. Des études sur l'influence de la denticité des ligands sur la stabilité des complexes de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et sur leur comportement *in vivo* ont suggéré que les chélateurs bidentés sont moins stables avec les molécules biologiques telles que l'histidine ou la cystéine par rapport aux ligands tridentés (Schibli, 2000). D'autre part, il a été démontré que les ligands aqueux de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ sont facilement substitués par des ligands tridentés contenant l'amine comme les ligands donneurs N-hétérocyclo aromatiques et/ou carboxyliques pour produire des complexes basés sur le cœur $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^{1+}$ (Pak, 2003).

Le marquage indirect s'effectue en deux étapes. La première étape est la préparation du $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ en marquant le kit contenant l'agent réducteur par le $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ avec une période de chauffe à 100°C pendant 25 minutes. L'étape de chauffage est indispensable afin d'augmenter la pression pour produire le monoxyde de carbone et permettre de réduire le $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Dans une seconde étape, la molécule biologique à marquer est ajoutée. Les conditions

de marquage, c'est à dire temps, température, pH, tampon, sont à adapter à chaque molécule biologique.

5. Méthode choisie pour le radiomarquage des IgA

Etant donné la fragilité des IgA, le radiomarquage indirect par approche « post labeling » avec BFCA qui modifie peu la structure de la protéine, tout en restant une méthode accessible, a été retenu.

Un complexe technétié dans un faible degré d'oxydation (+I) tel que le cœur tricarbonyl $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ a été choisi pour notre travail du fait de sa grande stabilité cinétique. Dans un travail de Biechlin *et al.*, il a été montré que le marquage utilisant le cœur tricarbonyl était d'une stabilité supérieure et apportait de meilleurs rendements que celui utilisant la méthode HYNIC (Biechlin, 2008). Ce complexe est petit et hydrophile et devrait peu modifier les propriétés physico-chimiques et biologiques de la molécule bioactive.

Bien que la fixation du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricarbonyl soit possible directement, nous avons choisi de fonctionnaliser l'Ac avec du 2-Iminothiolane (2-IT) ou Traut's Reagent qui représente dans le cas de ce radiomarquage, le synthon bifonctionnel. Ce « spacer » facilite la liaison de l'ion métallique au conjugué (Meares, 1990). L'objectif est de greffer des résidus thiol libres sur les Ig (Ig-SH). Cette réaction, décrite pour la première fois en 1989 par Goedemans *et al.*, peut permettre d'augmenter la réactivité des Ig greffées vis-à-vis du complexe $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricarbonyl et d'améliorer les rendements de marquage (Goedemans et Panek, 1995). Les travaux de Biechlin *et al.*, ont montré que cette technique peut être appliquée aux IgG et donne de très bons rendements (Biechlin, 2005). Le gain de rendements obtenus par ce greffage nous intéresse tout particulièrement pour les IgA, car les quantités d'IgA pouvant être utilisées restent limitées. Il s'agit d'une réaction entre les groupements amine libres des protéines et le 2-IT produisant un groupe mercaptobutyrimidyl (MBG) (Figure 34). Le 2-IT présente l'avantage de permettre une réaction dans des conditions non dénaturantes et d'être disponible commercialement. Le cœur tricarbonyl joue quant à lui le rôle de complexe technétié préformé.

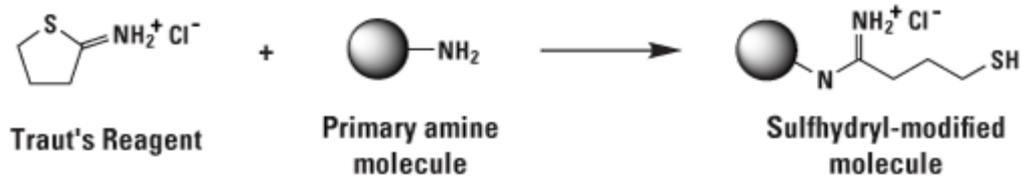


Figure 34 : Réaction des acides aminés avec le 2-IT. Formation du groupe MBG.

Chapitre 2: Travail personnel

Comme nous l'avons présenté dans le chapitre « revue bibliographique », le monopole d'utilisation des immunoglobulines (Ig) d'isotype G et de leurs fragments, en thérapie (immunothérapie, radioimmunothérapie) ou en diagnostic (radioimmunosciintigraphie) ainsi que les intenses recherches les concernant ont permis d'entrevoir certaines limitations.

L'objectif de notre travail est d'explorer les immunoglobulines A (IgA) une classe d'Ig jusque là négligée au profit des immunoglobulines G (IgG). En effet, les IgA, largement représentées dans le sérum et prédominantes dans les sécrétions, sont caractérisées par un tropisme préférentiel pour les muqueuses, ce qui en fait un candidat thérapeutique particulièrement intéressant pour cibler notamment les tumeurs à localisation muqueuse. Il est ainsi possible d'imaginer que les IgA pourraient grâce à cette caractéristique cibler des tumeurs peu accessibles aux IgG.

Afin d'évaluer les propriétés cinétiques des IgA et leur potentiel de ciblage d'une tumeur, nous avons choisi de radiomarquer les Ig et d'appliquer les techniques isotopiques décrites précédemment. Notre travail a donc tout d'abord porté sur la mise au point d'une technique générale de radiomarquage des Ig applicable aux IgG et aux IgA. Les IgA produites par la technologie HAMIGA étant disponibles en quantité restreinte, nous avons dû mettre au point et optimiser le radiomarquage en premier lieu avec des IgG. Cette mise au point et l'évaluation de l'IgG radiomarquée a fait l'objet d'un premier article.

A partir de la méthode de radiomarquage optimisée et appliquée aux IgA, les études de biodistribution de l'IgA radiomarquées ont été réalisées chez l'animal sain et comparées à l'IgG. La capacité de ciblage de l'IgA a ensuite été évaluée dans un modèle murin de cancer colorectal, à l'aide d'IgA anti-ACE. L'étude de biodistribution et de ciblage est présentée dans un second article en cours de préparation.

I. Premier partie : Radiomarquage des immunoglobulines G anti-CD20 avec le ^{99m}Tc -Tricarboxyl : évaluations *in vitro* et *in vivo*

A. Introduction

La première partie de notre travail a porté sur le choix, la mise au point et l'optimisation d'une technique de radiomarquage pour les Ig. Celle-ci doit être non altérante, simple, applicable aux différents isotypes d'Ig et permettre d'obtenir de bons rendements de radiomarquage.

Le technétium 99m reste l'isotope de choix en Médecine Nucléaire. Il a été sélectionné pour radiomarquer les Ig en raison de ses nombreux avantages, comme présenté dans la revue bibliographique. Ce radionucléide possède des propriétés de désintégration favorables (rayonnement γ pur d'énergie 140 keV, demi-vie 6h) pour l'imagerie moléculaire et la radioprotection. En outre, sa disponibilité quotidienne grâce à un générateur est également un atout. Enfin, le technétium étant un métal, il pourra se fixer simplement par complexation à différents types de vecteurs dont les protéines. Les IgA étant des Ac fragiles, le radiomarquage par méthode indirecte avec un complexe technétié tel que le cœur tricarbonyl $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ a été retenu. Il s'agit d'un complexe présentant une grande inertie chimique. Ce complexe devrait peu modifier la structure de la protéine, tout en apportant des rendements de marquage efficaces. Les quantités d'IgA disponibles étant limitées, nous avons choisi de fonctionnaliser les Ac avec un « spacer », le 2-Iminothioline. Le 2-IT permet de greffer des résidus thiol libres sur les Ig dans des conditions non dénaturantes afin d'augmenter leur réactivité vis-à-vis du complexe ^{99m}Tc -tricarbonyl et d'améliorer les rendements de marquage.

Pour cette première partie, nous avons travaillé sur une IgG commerciale et donc disponible en grande quantité pour pouvoir réaliser les différentes mises au point et optimisations. Nous avons plus précisément choisi une IgG anti-CD20 (Mabthera[®], rituximab) représentant un des anticorps les plus étudiés aujourd'hui et les plus utilisés en hématologie. De nombreuses données étant disponibles, ces anticorps nous ont servis de référence pour notre travail.

La conservation des propriétés des Ig radiomarquées a été étudiée *in vitro*. Des études de stabilité du radiomarquage ont été effectuées en PBS (Phosphate Buffer Saline), en plasma

murin et par des épreuves de compétition avec des acides aminés. Des études d'intégrité des anticorps radiomarqués ont été réalisées afin de s'assurer que les différentes étapes du radiomarquage n'altèrent pas la protéine. Enfin, l'affinité a été évaluée à l'aide de deux techniques de binding complémentaires, l'une sur support coaté avec l'antigène d'intérêt et l'autre sur cellules exprimant le même antigène. Les IgG à tester ciblant le CD20, nous avons travaillé avec les cellules EL4-hCD20. Des contrôles négatifs ont été réalisés à l'aide des cellules EL4-WT qui n'expriment pas l'antigène CD20 à leur surface. En effet, les EL4 sont obtenues à partir d'un lymphome T murin. Une partie de ces EL4 a été transfectée pour exprimer l'antigène CD20 humain à leur surface.

L'évaluation *in vivo* des IgG radiomarquées, après injection i.v., a été réalisée par des études de biodistribution chez l'animal sain et des études de ciblage tumoral chez l'animal porteur de tumeur CD20+/CD20-.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal PLOS ONE : « **Anti-CD20 immunoglobulin G radiolabeling with a ^{99m}Tc-tricarbonyl core: *In vitro* and *in vivo* evaluations.** »

Afin d'aboutir à ces résultats, plusieurs études préliminaires et de mises au point ont été nécessaires pour ce travail et sont présentées ci-dessous.

B. Etudes préliminaires

1. Optimisation du radiomarquage et choix des conditions de contrôle par radiochromatographie

Le radiomarquage des Ig par la technique choisie comporte deux étapes (Figure 35) :

- Formation du cœur tricarbonyle [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺
- Complexation du [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ avec les Ig préalablement fonctionnalisées avec le 2-iminothiolane

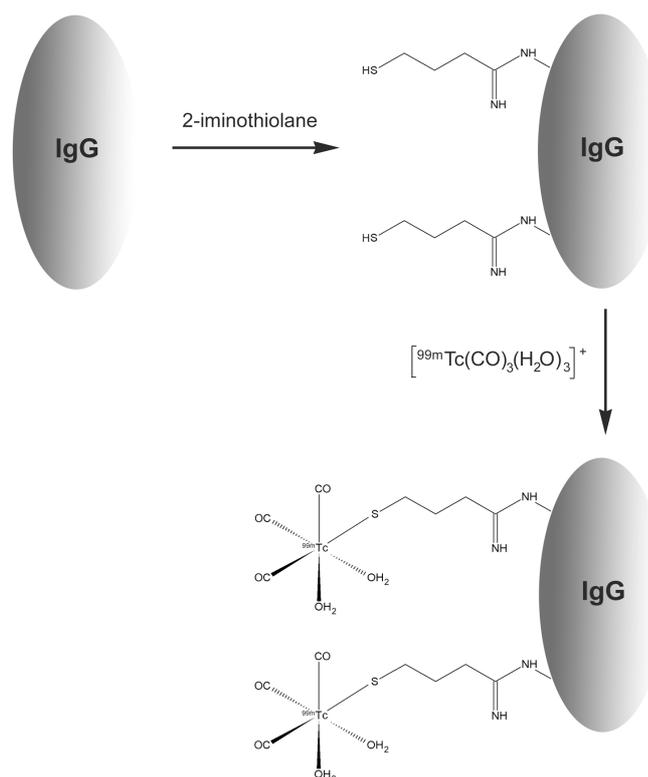


Figure 35 : Etapes du radiomarquage des Ig avec le ^{99m}Tc .

A chaque étape du radiomarquage, des contrôles de Pureté RadioChimique (PRC) doivent être réalisés afin de s'assurer que la complexation a été effective. Ces contrôles ont été effectués par Chromatographie sur Couche Mince (CCM). Cette technique permet de réaliser des contrôles rapides à partir d'une petite quantité d'échantillon. Après dépôts de l'échantillon (4 μl) sur la plaque de chromatographie, celle-ci est placée dans une cuve fermée contenant le solvant approprié. Lors de sa migration sur la plaque, le solvant va entraîner les composés selon leur affinité respective pour le solvant et le support de chromatographie. Lorsque le front du solvant atteint le « haut » de la plaque (0,5 cm du bord), celle-ci est retirée de la cuve. Après séchage, la plaque est lue à l'aide du radiochromatographe. Un tracé de la répartition de la radioactivité sur la plaque est ainsi obtenu.

a. Préparation et contrôle de la Pureté Radiochimique du $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

Pour obtenir un rendement de marquage optimal du ^{99m}Tc -Isolink[®], la solution de pertechnétate de sodium $[\text{Na } ^{99m}\text{TcO}_4]$ doit être éluée moins de 2h avant le radiomarquage, le générateur ayant été élué depuis moins de 24 h. Des contrôles de l'éluat sont réalisés en

routine afin de s'assurer que le ^{99m}Tc est sous forme $^{99m}\text{TcO}_4^-$. 0,8 à 1 ml de la solution de pertechnétate de sodium [$\text{Na } ^{99m}\text{TcO}_4$] d'activité comprise entre 2 220 et 3 700 MBq (soit 60 et 100 mCi) est ensuite ajoutée au flacon d'Isolink[®] sans mettre de prise à air. Le flacon est agité par retournement, mis à incuber à 100°C (bain-marie sec) pendant 20 à 30 min, et refroidi dans de l'eau froide pendant 10 min. Le cœur tricarbonyl est stable pendant 4h.

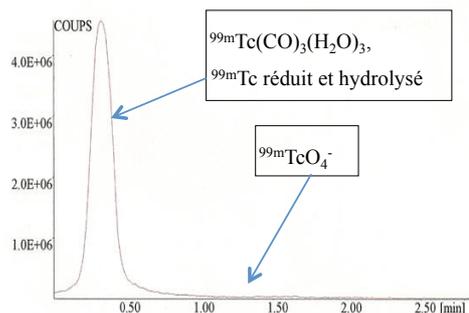
Lors de l'étape de préparation du cœur technétié, les impuretés radiochimiques majoritaires pouvant être présentes sont le technétium non complexé dit « libre » $^{99m}\text{TcO}_4^-$, et le technétium réduit et hydrolysé, [$^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_n(\text{H}_2\text{O})_y$].

Deux CCM sont nécessaires pour séparer ces impuretés du [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$]⁺ :

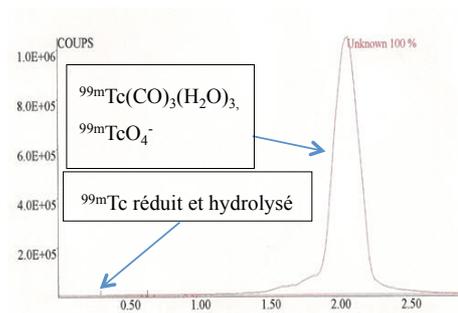
- 1^{ère} méthode : support d'oxyde d'aluminium Baker Flex (VWR, Pessac, France), solvant méthanol/HCl en quantité 95/5 v/v. Avec cette méthode, le $^{99m}\text{TcO}_4^-$ migre avec le front du solvant, le cœur [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$]⁺ et le technétium réduit et hydrolysé restent au point de dépôt.
- 2^{ème} méthode : support ITLC-SG (Instant Thin Layer Chromatography - Silica Gel) (Varian, Les Ulis, France), solvant méthanol. Avec celle-ci, le technétium libre et le [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$]⁺ migrent avec le front du solvant, alors que le technétium réduit et hydrolysé reste au point de dépôt.

Les Rapports Frontaux (Rf) en CCM (permettant d'obtenir les PRC) des différentes espèces chimiques sont présentés dans la [table 15](#). Des exemples de radiochromatogramme relatifs à ces PRC se trouvent sur la [figure 36](#).

Le rendement de marquage du ^{99m}Tc -Isolink[®] a été vérifié avant et après réajustement du pH nécessaire pour la complexation des Ig. En moyenne, une PRC de $98.8 \pm 1.6\%$ (n = 8) a été obtenue.



A. Support : Baker Flex
Phase mobile : Méthanol/HCl (95/5 v/v)



B. Support : ITLC-SG
Phase mobile : Méthanol

Figure 36 : Radiochromatogrammes du ^{99m}Tc-Isolink[®]

- A. Support Baker Flex en phase mobile Méthanol/HCl (95/5 v/v) :
Rf [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺=0
- B. Support ITLC-SG en phase mobile Méthanol: Rf [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺=1

	Baker Flex avec Méthanol/HCl	ITLC SG avec Méthanol	ITLC SG avec NaCl
^{99m} TcO ₄ ⁻	Rf=0,5	Rf=1	Rf=1
^{99m} Tc réduit et hydrolysé	Rf=0	Rf= 0	/
[^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺ à pH 7	Rf= 0	Rf=1	Rf=1
^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O) ₃ ⁺ à pH 11	Rf= 0	Rf=1	Rf=1
^{99m} Tc-Anticorps	/	/	Rf = 0

Table 15 : Rapports Frontaux (RF) en CCM de chaque espèce chimique pouvant être présente dans le ^{99m}Tc-Isolink[®] et dans le ^{99m}Tc-Ig"

b. Préparation et contrôle de la Pureté Radiochimique des Ig radiomarquées

La seconde étape du radiomarquage correspond à la complexation des Ig-SH avec le complexe technétié [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ (Figure 35). Pour effectuer le marquage dans des conditions non altérantes pour les Ig, le pH de l'Isolink[®] marqué, initialement de 11, est tout d'abord réajusté entre 7 et 8 avec 280 µl d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,5 M (mol/l).

Pour chaque échantillon (Ig greffées en groupements thiol ou non) des volumes de 160 à 450 μl sont mis à incuber, après mélange par retournement, avec des activités de 148 à 370 MBq (soit 4 à 10 mCi) de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Isolink (150 μl) pendant 2 h à température ambiante, sous agitation lente en tube Low Adsorption. Un effet important du volume réactionnel lors du radiomarquage ayant été observé dans nos essais, des volumes de 300 μl ont par la suite, été utilisés pour les échantillons d'Ac.

Un contrôle est ensuite réalisé par CCM sur plaque ITLC-SG avec comme solvant du NaCl 0,9% afin de s'assurer de l'efficacité de la complexation. Les impuretés radiochimiques majoritaires pouvant être présentes sont le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Isolink[®] non fixé aux Ac et le technétium non complexé dit « libre » $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.

Dans la [table 15](#), les Rf en CCM de chaque espèce chimique pouvant être présente dans le « $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Ig » sont répertoriés. Des exemples de radiochromatogrammes relatifs à ces PRC se trouvent sur la [figure 37](#).

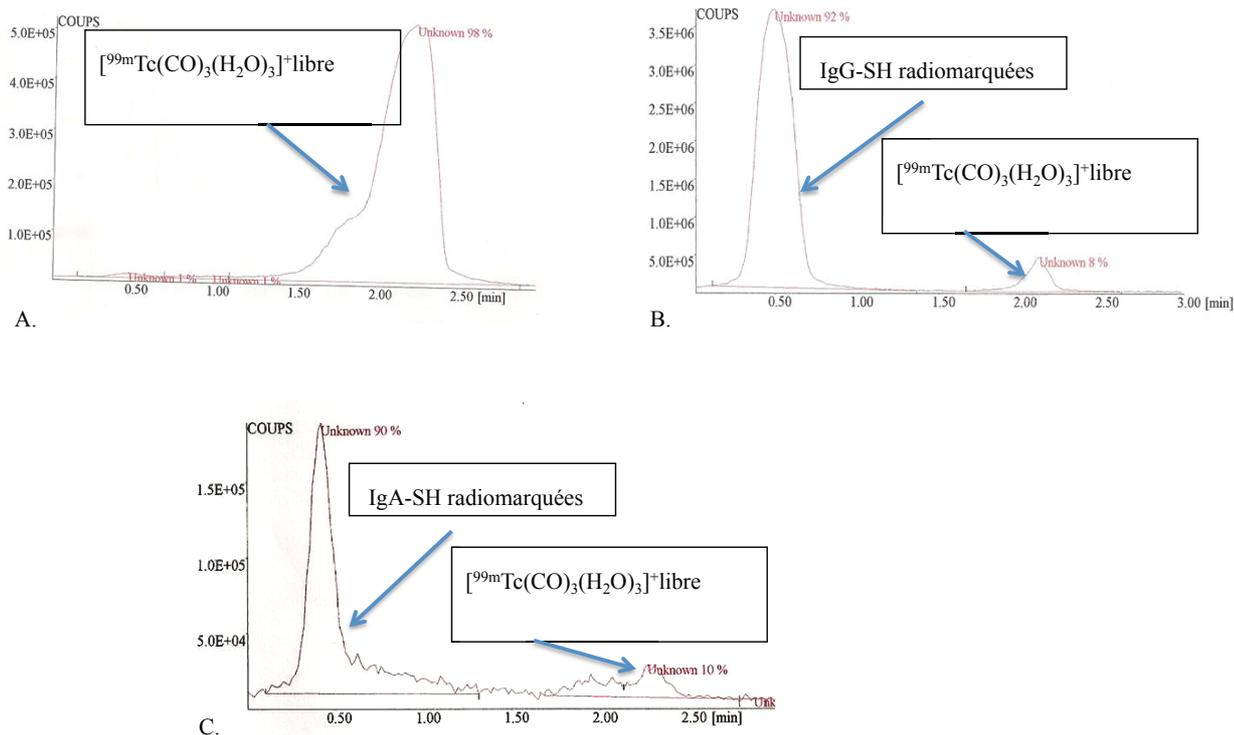


Figure 37 : Radiochromatogrammes sur support ITLC-SG en phase mobile NaCl 0,9%

A. ^{99m}Tc -Isolink[®] : $R_f [^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+ = 1$

B. IgG-SH radiomarquées : $R_f [^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+ \text{ libre} = 1$ et $R_f ^{99m}\text{Tc-IgG} = 0$

C. IgA-SH radiomarquées : $R_f [^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+ \text{ libre} = 1$ et $R_f ^{99m}\text{Tc-IgA} = 0$

Le $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et le cœur $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ migrent avec le front du solvant, alors que les $^{99m}\text{Tc-Ac}$ restent au point de dépôt.

2. Choix des conditions pour les expériences de binding sur cellules

Avant de débiter les études de Binding, nous avons dû déterminer la **concentration en Ac froid** à employer pour déplacer la liaison spécifique et calculer les liaisons non spécifique et spécifique. Nous avons utilisé une quantité fixe de cellules de 1 million dans 250 μl de PBS-BSA 3% et trois concentrations en Ac radiomarqués (40 ng/ml, 800 ng/ml et 40 $\mu\text{g/ml}$), qui correspondent à la gamme de concentration dans laquelle les études d'affinité sont faites (Figure 38). Pour 40 ng/ml et 800 ng/ml d'Ig radiomarquées (A et B), on constate qu'une concentration d'Ac froid de 10 $\mu\text{g/ml}$ induit déjà un déplacement maximum, l'excès d'Ac froid, dans le milieu réactionnel final, étant d'un rapport de 512 et 25 respectivement. Pour 40 $\mu\text{g/ml}$ (C), concentration maximale d'Ac chaud dans les gammes étudiées, on

observe qu'une concentration de 100 µg/ml (excès de 5) semble suffisante, 200 µg/ml n'apportant pas de déplacement supérieur. Pour la suite des études, nous avons donc choisi de travailler à une concentration en Ac froid de 100 µg/ml lors de la pré-incubation des cellules, même si, pour la concentration de la solution d'Ac radiomarqués la plus élevée de la gamme (40 µg/ml, soit 13,33 µg/ml dans le milieu réactionnel final), une concentration en Ac froid supérieure serait probablement nécessaire pour un déplacement optimal, le taux de fixation non spécifique obtenu pour 40 ng/ml et 800 ng/ml étant d'environ 10% alors que pour 40 µg/ml, il est plus important (18,4%).

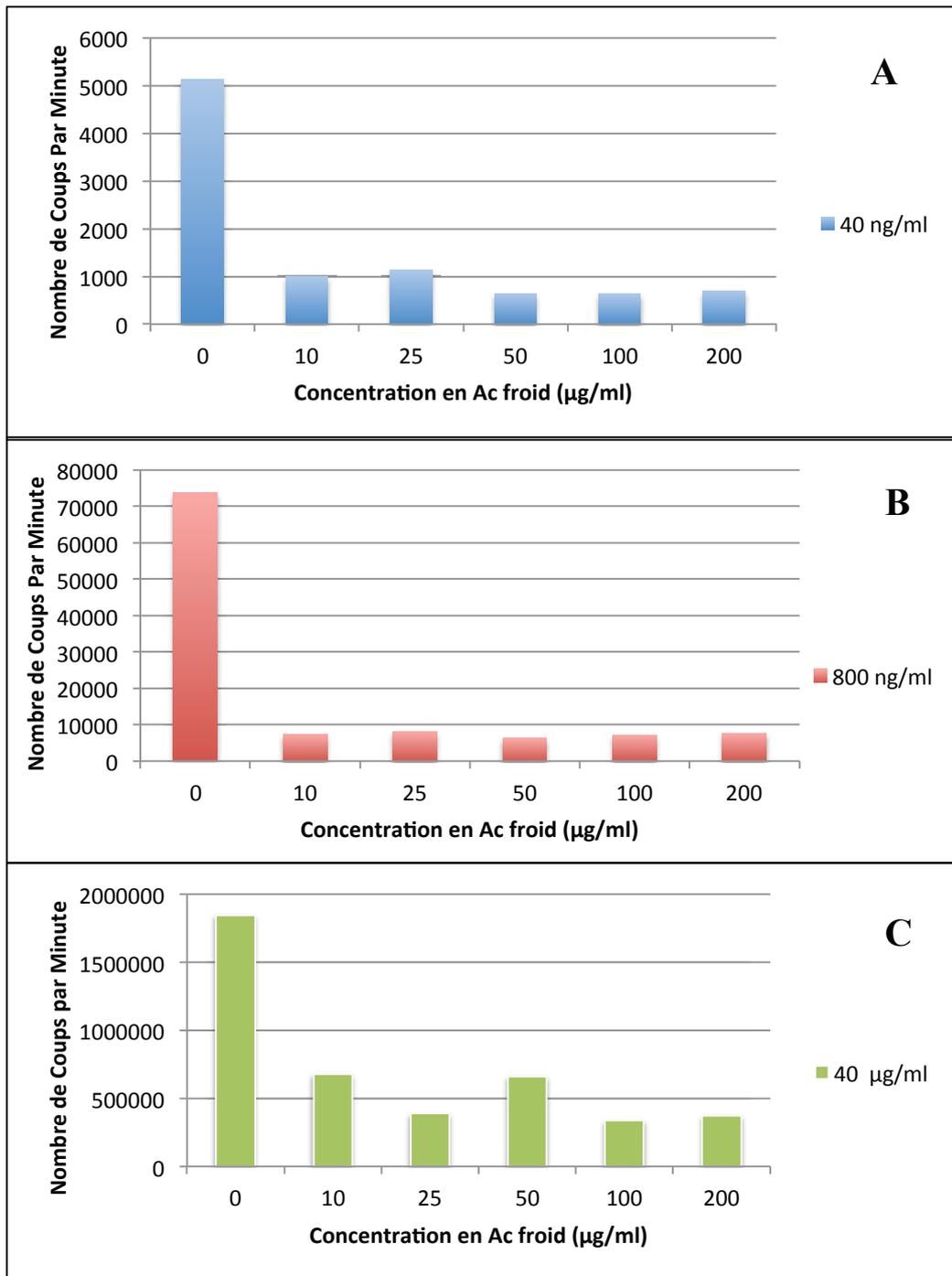


Figure 38 : Détermination de la concentration en Ac froid à utiliser pour les études d'affinité sur cellules

- : Représente la concentration en Ac froid à 40 ng/ml
- : Représente la concentration en Ac froid à 800 ng/ml
- : Représente la concentration en Ac froid à 40 µg/ml

Nous avons également étudié le **temps d'incubation** des cellules avec l'Ac nécessaire afin d'atteindre l'équilibre de liaison. Le temps de 2h est apparu suffisant pour atteindre des conditions d'équilibre.

Différentes **conditions de séparation** des Ac radiomarqués libres et des Ac liés sur les cellules ont été testées. Le premier mode de séparation était par centrifugation et lavage des culots cellulaires en PBS. Cette technique entraînait une liaison non spécifique importante. Une séparation par filtration sur Manifold® (Millipore, Molsheim, France) a donc été choisie. Ce mode de séparation a toutefois pour inconvénient de ne pas pouvoir utiliser une quantité trop importante de cellules, du fait du risque d'obturer les filtres.

Le même type d'essais a été réalisé pour les expériences de Binding sur plaques, la technique utilisée ayant été au départ adaptée à partir des conditions utilisées pour les dosages ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) (quantité d'antigène coaté, temps d'incubation). Plusieurs concentrations d'Ac froid ont été testées afin d'évaluer la liaison non spécifique.

C. Article : « Anti-CD20 immunoglobulin G radiolabeling with a ^{99m}Tc-tricarbonyl core: *In vitro* and *in vivo* evaluations »

Les travaux sur la mise au point du radiomarquage de l'IgG et l'étude de l'IgG anti-CD20 radiomarquée nous ont permis de réaliser une publication dans le journal PLOS ONE. Cet article est présenté ci-après.

RESEARCH ARTICLE

Anti-CD20 Immunoglobulin G Radiolabeling with a ^{99m}Tc-Tricarbonyl Core: *In Vitro* and *In Vivo* Evaluations

Hélène Carpenet^{1,2}, Armelle Cuvillier³, Jacques Monteil^{1,2}, Isabelle Quelven^{1,2*}

1 Nuclear Medicine Department, Dupuytren University Hospital, Limoges, France, **2** EA 3842, Faculty of Medicine and Pharmacy, Limoges, France, **3** B Cell Design Society, Limoges, France

* isabelle.quelven@unilim.fr



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Carpenet H, Cuvillier A, Monteil J, Quelven I (2015) Anti-CD20 Immunoglobulin G Radiolabeling with a ^{99m}Tc-Tricarbonyl Core: *In Vitro* and *In Vivo* Evaluations. PLoS ONE 10(10): e0139835. doi:10.1371/journal.pone.0139835

Editor: Serge Muyldermans, Vrije Universiteit Brussel, BELGIUM

Received: July 2, 2015

Accepted: September 17, 2015

Published: October 6, 2015

Copyright: © 2015 Carpenet et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: Some of the work presented here was supported in part by CORC (Comité d'Orientation de la Recherche sur le Cancer) Limousin. Mallinckrodt Medical for supply of IsoLink. F. Dalmay (INSERM UMR-S 1094 NET) for assistance with statistical analyses. M. Cogne for gift of EL4-WT and EL4-CD20 cells. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. B Cell Design Society provided support in the form of a salary for author AC, but did not have any additional role in the study

Abstract

In recent years, the diagnostic and therapeutic uses of radioisotopes have shown significant progress. Immunoglobulin (Ig) appears to be a promising tracer, particularly due to its ability to target selected antigens. The main objective of this study is to optimize and assess an Ig radiolabeling method with Technetium 99m (^{99m}Tc), an attractive radioelement used widely for diagnostic imaging. Monoclonal anti-CD20 IgG was retained to study *in vitro* and *in vivo* radiolabeling impact. After IgG derivatization with 2-iminothiolane, IgG-SH was radiolabeled by an indirect method, using a ^{99m}Tc-tricarbonyl core. Radiolabeling stability was evaluated over 24h by thin-layer chromatography. IgG integrity was checked by sodium dodecyl sulfate—polyacrylamide gel electrophoresis coupled with Western blot and autoradiography. The radiolabeled Ig's immunoaffinity was assessed *in vitro* by a radioimmunoassay method and binding experiments with cells (EL4-hCD20 and EL4-WT). Biodistribution studies were performed in normal BALB/c mice. Tumor uptake was assessed in mice bearing EL4-hCD20 and EL4-WT subcutaneous xenografts. With optimized method, high radiolabeling yields were obtained (95.9 ± 3.5%). ^{99m}Tc-IgG-SH was stable in phosphate-buffered saline (4°C and 25°C) and in serum (37°C), even if important sensitivity to transchelation was observed. IgG was not degraded by derivatization and radiolabeling, as shown by Western blot and autoradiography results. ^{99m}Tc-anti-CD20 IgG-SH immunoaffinity was estimated with Kd = 35 nM by both methods. *In vivo* biodistribution studies for 48h showed significant accumulation of radioactivity in plasma, liver, spleen, lungs and kidneys. Planar scintigraphy of mice bearing tumors showed a significant uptake of ^{99m}Tc-anti-CD20 IgG-SH in CD20⁺ tumor versus CD20⁻ tumor. Radiolabeling of derivatized IgG with ^{99m}Tc-tricarbonyl was effective, stable and required few antibody amounts. This attractive radiolabeling method is “antibody safe” and preserves Ig affinity for antigen, as shown by both *in vitro* and *in vivo* experiments. This method could easily be used with noncommercial IgG or other antibody isotypes.

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific role of this author is articulated in the "author contributions" section.

Competing Interests: Mallinckrodt Medical supplied IsoLink for this study. A. Cuvillier is employed by B Cell Design Society. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

Introduction

Due to their highly specific targeting ability, monoclonal antibodies and their fragments are considered attractive candidates to deliver radioelements to an interest target (particularly in oncology). The aim of this work was to optimize, a convenient and non-damaging Ig radiolabeling method that can be applied to Ig fragments and different isotypes. The radiolabeling method should provide efficient yields while maintaining antibody structure and functionality. To assess the radiolabeling process in the study, the IgG isotype and technetium ^{99m}Tc were selected, due to their widespread use and ready accessibility. Among the radionuclides used in diagnosis, ^{99m}Tc remains the most widely used isotope. This radionuclide has favorable decay properties (energy of 140 keV of pure γ -radiation, 6h half-life) for molecular imaging and radiation protection. Moreover, its daily availability from a generator system is also a great asset. However, the short decay half-life of ^{99m}Tc is not ideal in following the entire process of IgG biokinetics, although this theoretical disadvantage has not prevented its human use. Today, only intact or fragments of monoclonal antibodies approved by the FDA (Food and Drug Administration) are radiolabeled with ^{99m}Tc . Besilesomab, a chimeric monoclonal anti-NCA 95 antibody, and sulesomab, an anti-NCA-90 Fab' fragment, are indicated for infection imaging [1,2]. Finally, another attractive property of ^{99m}Tc lies in its polyvalent radiochemistry. Technetium chemistry is ruled by the formation of metal-ligand complexes. To produce these complexes, the technetium eluted from the generator ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) must be reduced to lower oxidation states. For radiolabeling antibodies with ^{99m}Tc , several techniques have been proposed using direct or indirect synthesis pathways. *Direct antibody radiolabeling* can be performed after reduction of disulfide bridges [3]. This method's drawbacks lie in the lower stability of the complex obtained and the high probability of structure alterations. *Indirect radiolabeling, via a bifunctional chelating agent* (BFCA), has been promoted by development of new synthons such as MAG3 [4] and HYNIC [5]. Among the BFCAs, "tricarboxyl core" $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ has many advantages, e.g., permitting ^{99m}Tc to link with proteins under mild physiological conditions [6,7]. Moreover, tricarboxyl core is in a low oxidation state (+ I), with a high kinetic stability. Biechlin *et al.* showed that this complex was much more stable than the HYNIC method in radiolabeling proteins [8]. Alberto *et al.* first developed the ^{99m}Tc -tricarboxyl core [6]. ^{99m}Tc pertechnetate must be reduced to the +I state by direct reduction using a strong and soluble reducing agent under carbon monoxide gas conditions. This first limited method of core production has been replaced by an easier and reproducible method using a commercial one-step kit formulation [9]. In this kit (IsoLink[®], Mallinckrodt), boranocarbonate sodium allows both the production of carbon monoxide and the reduction of technetium. Different antibody radiolabeling strategies using ^{99m}Tc -tricarboxyl have been assessed, with direct antibody labeling [7,10] or using a spacer [11]. Investigations by Egli *et al.* showed that histidine was the most potent ligand among other amino acids and led to direct radiolabeling of peptides or proteins [12]. Radiolabeling yields with direct approaches are often insufficient and supplementary steps such as purification are then required. A spacer may facilitate the addition of the metal ion to the protein. Among the spacers used to bind the tricarboxyl core, 2-iminothiolane (2-IT, Traut's reagent) has been studied [13]. 2-IT has the advantage of allowing the reaction under non-denaturing conditions. It reacts with free amino groups of Ig, to produce the mercaptobutyrimidyl group (MBG) and generates free thiol residues on Ig (Ig-SH). This reaction can increase the Ig reactivity against ^{99m}Tc complexes and improve labeling yields [14]. Biechlin *et al.* demonstrated that the combination of ^{99m}Tc -tricarboxyl with 2-IT derivatization could be applied to various proteins such as IgG with high yields [15], showing with polyvalent IgG that this radiolabeling was efficient and highly stable. However, the preservation of antibodies structure and affinity, after this two-step radiolabeling method has not been evaluated.

Considering the various advantages of using a tricarboxyl core after Ig functionalization with 2-IT, we chose to apply and optimize this promising method. Radiolabeled antibody integrity and affinity were evaluated by *in vitro* and *in vivo* studies. To this aim, we selected a widely used monoclonal antibody, rituximab (commercialized as Rituxan[®] in the United States and as Mabthera[®] in Europe). Rituximab is a chimeric mouse/human IgG1 monoclonal antibody directed against the transmembrane antigen CD20. Rituximab binds the CD20 antigen with a high affinity ($K_d = 5.2\text{--}11.0\text{ nM}$) [16].

Thus, the purpose of the present study was to optimize an IgG radiolabeling method with ^{99m}Tc . Functionalization of the antibody with 2-IT and complexation with ^{99m}Tc -tricarboxyl core were applied to radiolabel anti-CD20 IgG. The radiolabeled IgG was then characterized by both *in vitro* and *in vivo* approaches to verify Ig function preservation.

Materials and Methods

Materials

All chemicals and reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), unless otherwise specified.

Anti-CD20 IgG (rituximab) and irrelevant IgG (anti-EGFR: panitumumab) were purified from Mabthera[®] (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) and from Vectibix[®] (Amgen, Breda, The Netherlands) respectively, by affinity chromatography. Subsequently, IgG was dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS) by centrifugation (1000 x g, 15 min) using Amicon 30 kDa (Millipore, Molsheim, France).

Pertechnetate [$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$] was eluted freshly from a $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator (CisBio, Saclay, France). IsoLink[®] kit was obtained from Mallinckrodt Medical (Petten, The Netherlands).

ITLC-SG strips were purchased from Varian (Les Ulis, France) and Baker-Flex aluminium oxide strips were obtained from J.T.Baker Inc (VWR, Pessac, France). Protein concentrations and antibody quantity injected to mice were determined using bicinchoninic assay kits (Micro BC Assay[®], Fisher Scientific, Illkirch, France). The CD20 antigen used for the radio-immunoassay was synthesized and purified by Millegen (Toulouse, France). This antigen corresponds to CD20 extracellular region and disulfide bond has been conserved to form the most immunogenic loop according to Ernst's [17]. Electrophoresis reagents were from Bio-Rad (Marnes-La-Coquette, France) and cell culture media and supplements were from Invitrogen (Carlsbad, USA). Activity measurements were carried out using an activimeter Medi 405 (Medisystem, Guyancourt, France) and a gamma-counter (Cobra 5003; Packard Canberra Company, Frankfurt, Germany). Female BALB/c mice and female athymic immunodeficient nude mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France).

Thiol-derivatization of Ig with 2-IT

First, 0.5–2 nmol IgG (200 μL in PBS) was incubated with 2-IT at a final concentration of 3.8 μM (Fig 1). The reaction proceeded at room temperature in a low-adsorption tube for 120 min, with stirring. After dilution with 100 μL of PBS, solutions were purified by size exclusion chromatography with Zeba Spin Desalting Columns (Fisher Scientific) after centrifugation (1000 x g, 2 min, 4°C).

The number of thiol groups was determined with a micromethod using Ellman's reagent (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB) followed by a spectrophotometric assay at 405 nm. Cysteine was used as a standard (2.5–100 μM). Results are expressed as sulfhydryl groups generated per antibody molecule.

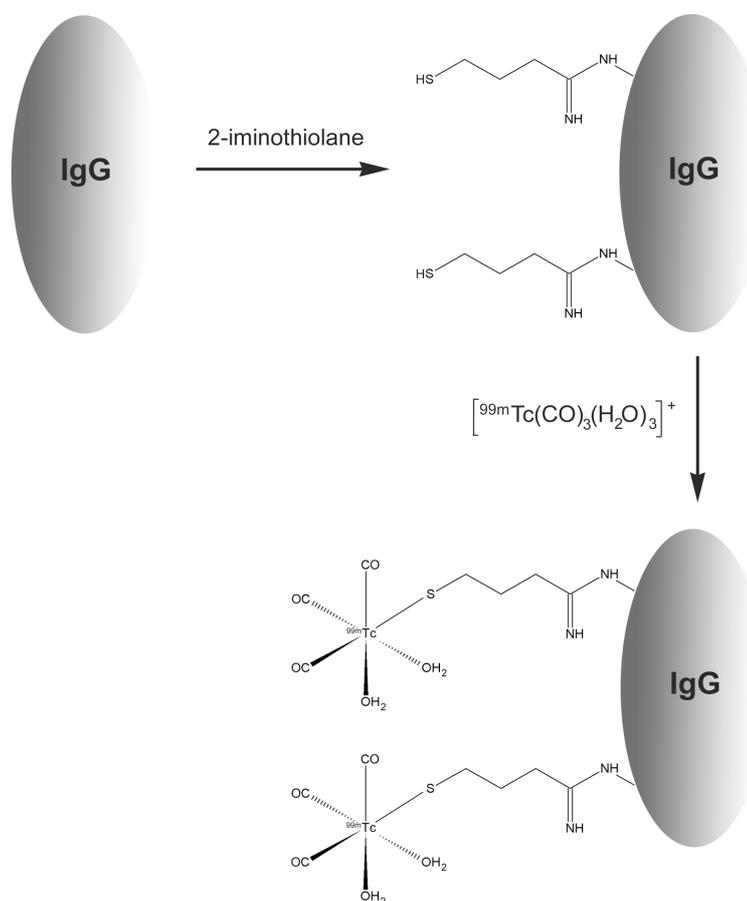


Fig 1. Two-step IgG radiolabeling. After IgG functionalization with 2-iminothiolane (2-IT), ^{99m}Tc-tricarbonyl core [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ preformed was complexed with IgG functionalized (IgG-SH).

doi:10.1371/journal.pone.0139835.g001

Synthesis of the tricarbonyl precursor [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺

First, 0.8–1 mL of [Na^{99m}TcO₄] in fixed activities (2220–3700 MBq) was added to the IsoLink[®] vial, incubated in a boiling water bath for 25 min and cooled in water for 10 min.

In each synthesis, a radiochemical purity (RCP) analysis was performed by thin-layer chromatography (TLC) with two systems and assessed with a radiochromatograph Miniscan[®] from Bioscan:

1. System I (Baker Flex Aluminium oxide strips in methanol/hydrochloric acid (95/5 v/v)): Rf ([^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ and [^{99m}Tc(OH)_n(H₂O)_y]) = 0, Rf ([^{99m}Tc] -pertechnetate) = 1
2. System II (ITLC-SG strips in methanol): Rf ([^{99m}Tc(OH)_n(H₂O)_y]) = 0, Rf ([^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ and [^{99m}Tc] -pertechnetate) = 1

Radiolabeling of native or derivatized immunoglobulins with [^{99m}Tc ($\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$

^{99m}Tc -tricarbonyl was neutralized to pH 7.0 using 0.5 M hydrochloric acid to perform Ig radiolabeling under non-denaturing conditions. In a low adsorption tube, 0.5–4 nmol of non-derivatized IgG or 0.5–2 nmol of derivatized IgG (IgG-SH) in 300 μL PBS was mixed with 150 μL (148–185 MBq) of a ^{99m}Tc -tricarbonyl solution (Fig 1). Each sample was incubated at room temperature for 120 min with stirring.

The RCP was determined by ITLC-SG/NaCl 0.9%: $\text{Rf}([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{-Ig or }([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{-Ig-SH}) = 0$ and $\text{Rf}([\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+) = 1$.

In vitro stability of radiolabeled immunoglobulins

Samples of radiolabeled antibody were incubated for 24 h in PBS at two different temperatures (4°C and 25°C) or in murine plasma (1/10) at 37°C. To determine their stability against transchelation and/or degradation, radiolabeled IgG was also tested at 37°C for 24 h in the presence of cysteine (7.5-, 15-, 150-, or 1500-fold excess over the number of thiol groups present in the radiolabeled IgG solution) or histidine (1500-fold excess). For each sample, aliquots were analyzed by ITLC at 1 h, 2 h, 4 h, 16 h, and 24 h.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for Western blot or autoradiography

SDS-PAGE was performed under nonreducing conditions with the native or labeled Ig. Proteins (1.5–10 μg per lane) and molecular weight standards (Bio-Rad) were loaded and resolved with a Mini-Protean TGX Precast Gel using a Bio-Rad (Hercules, CA, USA) apparatus. One gel was used for radioactivity measurements using a phosphor screen (Multisensitive Medium MS; Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) revealed by an autoradiochromatograph scanner (Cyclone Storage Phosphor System; Perkin Elmer). A duplicate gel was transferred on a PVDF membrane. Membrane was incubated (90 minutes) in diluted primary antibody solution (1/1000, goat antihuman IgG-horse radish peroxidase; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) and revealed with a diaminobenzidine (DAB) substrate.

Binding affinity of radiolabeled Ig by radioimmunoassay (RIA)

To evaluate anti-CD20 IgG binding to human CD20, removable well plates were coated with CD20 at 1 μg /well and incubated at 4°C overnight in PBS (pH 7.4), then blocked with PBS-gelatin 2% for 1 h at 37°C. Radiolabeled Ig-relevant (anti-CD20 IgG) or irrelevant (anti-EGFR IgG) (100 μL , 0.5–32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added in two series to antigen-coated wells. The first series was diluted in PBS-gelatin 0.2% (total binding) and the second in PBS-gelatin 0.2% containing unlabeled antibody at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (non-specific binding). Plates were incubated for 2 h at 37°C and were washed three times with PBS. Radioactivity contained in the wells was determined by gamma counting.

Cell culture

Murine lymphoma T-cells line not expressing human CD20 (EL4-WT) and murine lymphoma T-cells expressing human CD20 (EL4-hCD20) were gifts from UMR-CNRS 7276 (Prof. Michel Cogné, Limoges University, France) [18]. They were cultured in Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose, buffered with HEPES, supplemented with 10% fetal calf serum, 1% nonessential amino acids, 1% sodium pyruvate, 1% penicillin (100 U/mL)—streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), β -mercaptoethanol ($9 \times 10^{-4}\%$) and neomycin (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.1%) for

EL4-hCD20 cells only. The level of CD20 expression was checked regularly by flow cytometric analysis, using a murine FITC-labeled anti-human CD20 IgG (Dako, Glostrup, Denmark).

Binding affinity of radiolabeled Ig on cells

Saturation binding experiments with ^{99m}Tc -Ig-SH were performed with EL4-hCD20 and EL4-WT cells for anti-CD20 IgG. With EL4-hCD20 cells, anti-EGFR IgG was used as an irrelevant antibody control. Samples of cells (1 millions cells/ 250 μL), pre-incubated (90 min, 25°C) with unlabeled antibody (final concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or with PBS-BSA 3%, were incubated with increasing concentrations of ^{99m}Tc -IgG-SH (125 μL , 0,23–15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After incubation (2 h, 25°C), the cells were filtered using Manifold[®] (Millipore, Molsheim, France) and washed with PBS. Filter radioactivity was evaluated with a gamma-counter.

Affinity data analysis

For wells and cell-binding affinity studies, specific binding was evaluated by subtracting, non-specific binding (determined after incubation with unlabeled antibody) from total binding. Data analysis was performed using a Scatchard plot of binding of ^{99m}Tc -anti-CD20-IgG-SH and the dissociation constant (Kd), the number of antibody binding sites/wells or cells, and the Bmax of ^{99m}Tc -anti-CD20 IgG-SH were determined.

Antibody immunoreactivity

The immunoreactivity fraction (IRF) was assessed according to the method of Lindmo *et al.* [19,20]. An immunoreactivity study was performed in microtubes using increasing concentrations of EL4-hCD20 cells (0,16 x 10⁶–10 x 10⁶ cells in 250 μL of 3% PBS-BSA). Nonspecific binding was determined by 1 h previous incubation of one series of cell dilutions with unlabeled antibody (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). ^{99m}Tc -anti-CD20 IgG-SH (125 μL , 800 ng/mL) was added to each tube containing the cell dilutions. After incubation (2 h, 25°C), the cells were filtered using Manifold[®] and washed with PBS. Cell-bound radioactivity was determined by measuring filters with a gamma-counter. The data were plotted as a double inverse plot of specific binding over total applied radioactivity as a function of increasing cell concentration.

Biodistribution of ^{99m}Tc -anti-CD20 IgG-SH in normal mice

All *in vivo* experiments were performed in accordance with animal ethical regulations and all efforts were made to minimize suffering. The protocol was approved by Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin (CREAL). Biodistribution experiments were carried out in 7-week-old male BALB/c mice (Charles River Laboratories). ^{99m}Tc -anti-CD20 IgG-SH (40 MBq, 170 μg of antibody) was injected intravenously (tail vein). Animals were euthanized, by anesthesia and cervical dislocation, at 4 h (n = 3), 8 h (n = 4), 18 h (n = 4), 24 h (n = 7) or 48 h (n = 4) after injection. Selected tissues were excised, rinsed and weighed and their radioactivity levels were measured with a gamma-counter. Uptake of radioactivity in these organs was expressed as a percentage of the injected dose per gram of tissue (% ID/g) after correcting for radioactive decay for each time point.

Tumor uptake of ^{99m}Tc -anti-CD20 IgG-SH

Seven-week-old male nude mice were injected subcutaneously with 5 x 10⁶ EL4-hCD20 cells in one flank and with 2 x 10⁷ EL4-WT cells in the other, to obtain comparable tumors size. Animals were used for experiments when tumors size reached 0.9 to 1.1 cm at the largest diameter (4–6 weeks post cells injection). If animals demonstrated clinical alteration or tumor size

exceeded 1.2 cm at the largest diameter, animals were euthanized, by anesthesia and cervical dislocation. Animals were divided into three experimental groups. The first group ($n = 6$) received $170 \mu\text{g } ^{99m}\text{Tc}$ -anti-CD20 IgG-SH intravenously, the second ($n = 3$) received $170 \mu\text{g } ^{99m}\text{Tc}$ -anti-EGFR IgG-SH and the third, the control group ($n = 3$) received only ^{99m}Tc -IsoLink[®]. All the mice were subjected to an activity of 35–37 MBq. Scintigraphy imaging studies were performed 2 h, 30, 12 h and 24 h after injection for ^{99m}Tc -anti-CD20 IgG-SH animals groups and 24 h post-injection for ^{99m}Tc -anti-EGFR IgG-SH and ^{99m}Tc -IsoLink[®] group. Mice were anesthetized using isoflurane (2%) under O_2 conditions (1 L/min) and acquisitions were performed with a gamma camera (Axis; Philips Medical Systems, Cleveland, OH, USA). The planar images (256 x 256 pixels, zoom 2) were acquired during 10 minutes, using a dual-head system fitted with low-energy collimators. Energy windows were set over the 140 keV peaks ($\pm 20\%$). A region of interest (ROI) analysis was carried out using the Odyssey FX 820 software to determine tumor uptake. The semiquantitative uptake was calculated using the tumor to normal tissue background ratio. Muscle (upper limb) was used as normal tissue reference. Statistical analyses were made by applying the nonparametric Wilcoxon paired for kinetic uptake analysis and Mann-Whitney *U*-test for treatment comparison. Tests were made using the SAS software (ver. 9.1.3; SAS Institute, Cary, NC, USA). A *p* value < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Radiolabeling optimization

Under the conditions described, the ^{99m}Tc -IsoLink[®] labeling yields were, on average, $98.8 \pm 1.6\%$ ($n = 8$). To optimize IgG radiolabeling with the tricarboxyl core, increasing antibody quantities and derivatization with 2-IT were studied. Native IgG radiolabeling yields obtained were correlated with IgG amounts and found to reach 90% with IgG amounts > 4 nmol (Fig 2). When IgG was functionalized by 2-IT, an RCP $> 90\%$ was obtained with only 1 nmol and a correlation between RCP and IgG amounts was observed. For the same IgG quantity, much higher yields were achieved if the Ig was derivatized: for 1 nmol IgG, the RCP was 86% versus 45% and for 0.5 nmol IgG, the RCP was 70% versus 20%, after derivatization and without respectively. Derivatization allowed reducing the IgG amount needed by a factor of 4 to obtain high radiolabeling yields. Determining sulfhydryl groups demonstrated that yields were clearly correlated with the number of thiol moieties on IgG (Fig 3). On average, 2.5 ± 1.4 ($n = 8$) sulfhydryl groups were grafted per molecule. In comparison with native IgG, sulfhydryl groups were below the limit of quantification. These results led us to use 1.5 nmol of derivatized IgG in the following experiments. Under these optimized conditions, radiolabeling yields were $> 95.9 \pm 3.5\%$ ($n = 8$) and the specific activity corresponded to 123 MBq/nmol (822 MBq/mg).

In vitro stability of radiolabeled IgG-SH

Stability of radiolabeled IgG studies were performed in different conditions during 24 h (Table 1). In PBS, with storage at $+4^\circ\text{C}$ or $+25^\circ\text{C}$, no appreciable loss in RCP of ^{99m}Tc -IgG-SH was observed ($\Delta = 2$ and 3%, respectively). In murine serum at 37°C , the RCP decreased slightly to 82.3% at 24h, suggesting satisfactory stability *in vivo*.

To assess the susceptibility of radiolabeled IgG to transchelation, in a physiological medium rich in plasma proteins with N-containing amino acids, studies in the presence of strong tridentate ligand systems (cysteine and histidine) were carried out. As expected, the RCP decreased depending on the nature and concentration of the competitor. Indeed, radiolabeled IgG degradation increased gradually as the cysteine excess increased: with 7.5-fold and 15-fold

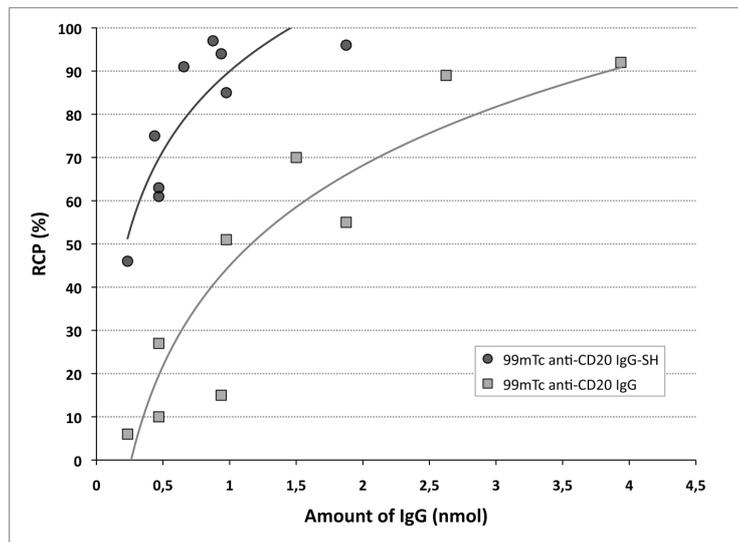


Fig 2. Comparison of radiochemical yields obtained with native or 2-IT derivatized IgG, depending on IgG amount. Radiochemical purity (RCP) were performed by ITLC-SG/NaCl 0,9%.

doi:10.1371/journal.pone.0139835.g002

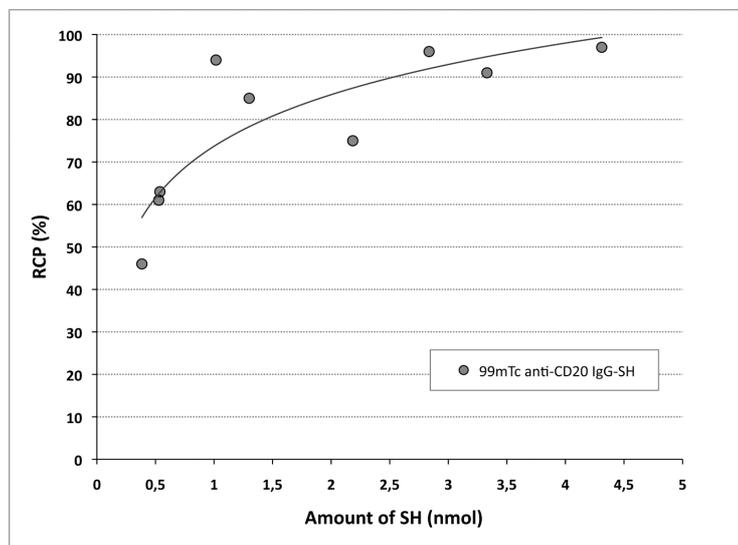


Fig 3. Radiolabeling yields of derivatized IgG as a function of SH group amount. Radiochemical purity (RCP) were performed by ITLC-SG/NaCl 0,9%.

doi:10.1371/journal.pone.0139835.g003

Table 1. *In vitro* stability studies of derivatized radiolabeled IgG.

	T0	T+1h	T+2h	T+4h	T+16h	T+24h
In PBS (+4°C)	99	99	99	99	99	97
(+25°C)	99	99	99	99	96,7	96
In murine serum (+37°C) (1:10)	99	95,9	92	91,3	88,2	82,3
+ Cysteine (+37°C) (7,5-fold)	99	96	96	96	96	94
(15-fold)	99	95	89	83	76	74
(150-fold)	99	75	44	40	28	19
(1500-fold)	99	9	-	-	-	-
+ Histidine (+37°C) (1500-fold)	99	94	86	74	46	40

doi:10.1371/journal.pone.0139835.t001

excesses, the RCP decreased by 5 and 25% respectively. With a 150-fold excess, the RCP dropped 80%, in 24 h. The 1500-fold excess of the number of thiol groups strongly challenged IgG in 1 h (Table 1). At same concentration (x 1500), radiolabeled IgG was only slightly degraded in the presence of histidine (RCP > 94% after 1 h).

Integrity of radiolabeled antibodies

Western blot profiles are presented in Fig 4A. Major bands were visualized at 150 kDa corresponding to the molecular weight of unlabeled IgG (lanes 2–4). It should be noted that weaker molecular weight bands, corresponding to degradation, were observed, but with very low intensity. Comparison between unlabeled and radiolabeled IgG (lines 3–5) showed that the homodimeric structure of IgG was preserved. However, a slight shift in migration and in intensity was observed between unlabeled and radiolabeled antibodies due to charges difference and to loss during purification after incubation with 2-IT, respectively.

The corresponding SDS-PAGE radioactivity profiles are presented in Fig 4B and show the same single band corresponding to 150 kDa for both radiolabeled IgGs. Comparison with the Western blot profiles of radiolabeled IgG (lanes 3–5) indicated that the radiolabeling occurred and remained linked to a fully folded IgG molecule.

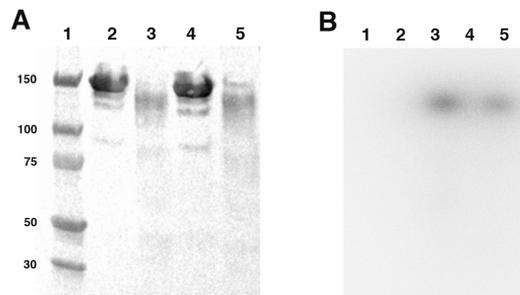


Fig 4. Western-blot (A) and autoradiography (B) of unlabeled and radiolabeled IgG. Molecular weights (kDa) are specified on the left. Well numbers (on the top) correspond to: (1) Marker, (2) Unlabeled anti-CD20 IgG (10µg), (3) Radiolabeled anti-CD20 IgG-SH (25µg), (4) Unlabeled irrelevant (anti-EGFR) IgG (10µg), (5) Radiolabeled irrelevant (anti-EGFR) IgG-SH (25µg).

doi:10.1371/journal.pone.0139835.g004

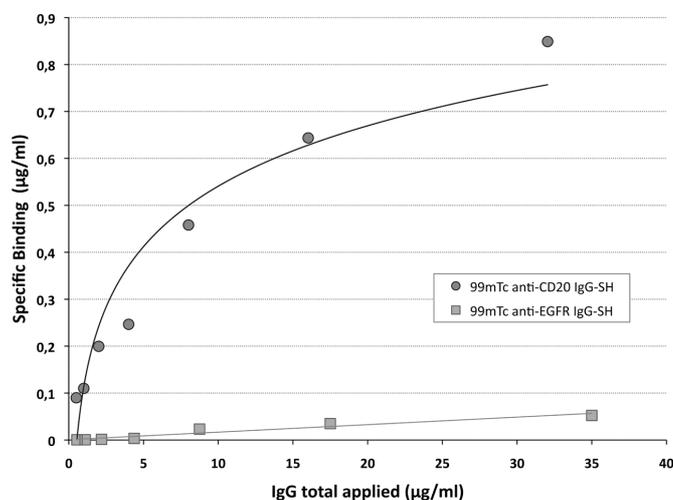


Fig 5. *In vitro* binding of ^{99m}Tc anti-CD20 IgG-SH and ^{99m}Tc anti-EGFR IgG-SH by RIA protocol.

doi:10.1371/journal.pone.0139835.g005

Immunoreactivity and binding affinity

Immunoaffinity on the plate allowed us to observe that the radiolabeled anti-CD20 IgG-SH kept a high affinity for the target antigen (Fig 5). Strong binding (total and specific) was obtained with ^{99m}Tc-anti-CD20 IgG-SH, whereas no binding was observed with ^{99m}Tc-anti-EGFR IgG-SH (irrelevant antibody). Specific binding of ^{99m}Tc-anti-CD20 IgG-SH was confirmed by displacement with an unlabeled antibody. To determine the binding affinity and the maximum number of antibody binding sites/bound per well, a Scatchard analysis was performed. The assays gave an average value of 35 ± 17 nM (n = 3) for the Kd and 11.8 ± 6.5 nM (n = 3) for the binding capacities (B_{max}).

Immunoaffinity was also assessed by cell binding on the fully folded antigen expressed on the cell surface. Specifically, radiolabeled anti-CD20 IgG-SH was tested with EL4-hCD20 cells (Fig 6) using a saturation binding assay. The calculated Kd and B_{max} were 40 ± 19 nM (n = 3) and 11 ± 7.2 nM (n = 3), respectively, clearly consistent with the previous value on the plate (Kd = 35 ± 17 nM). Controls included ^{99m}Tc-anti-CD20 IgG-SH on EL4-WT cells and with irrelevant IgG, ^{99m}Tc-anti-EGFR IgG-SH on EL4-hCD20 cells. As expected, no binding was observed under either condition.

Finally, to determine the IRF of radiolabeled anti-CD20 IgG-SH, we performed an immunoassay with increasing EL4-hCD20-expressing cell concentrations. Fig 7 shows a plot of total applied radioactivity over specific binding as a function of the inverse of increasing cell concentrations. The IRF can be determined by linear extrapolation. Thus, under our radiolabeling conditions, 46% of the radiolabeled antibodies were able to recognize and to bind specifically with antigens expressed on target cells.

Biodistribution

The results of the *in vivo* biodistribution of ^{99m}Tc-anti-CD20 IgG-SH in healthy BALB/c mice are shown in Table 2. Significant accumulation of radioactivity was observed in four organs as soon as 4h: liver (29.7%ID/g), spleen (27.3%ID/g), lungs (18.0%ID/g) and kidneys (16.7%ID/g). Liver

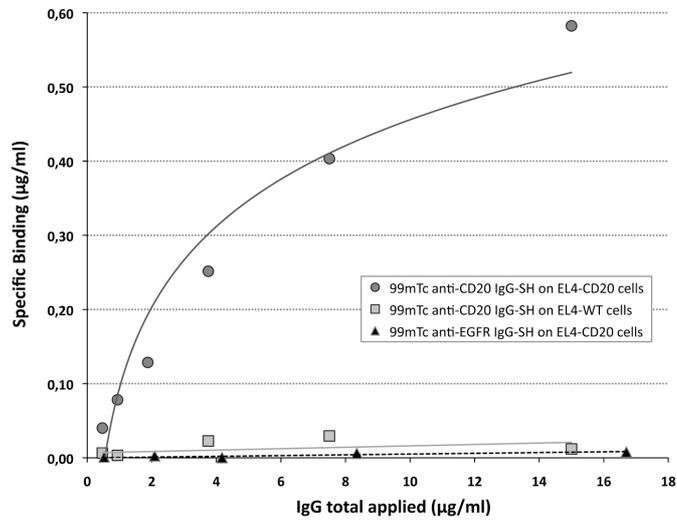


Fig 6. Binding experiments of ^{99m}Tc anti-CD20 IgG-SH or ^{99m}Tc anti-EGFR IgG-SH on EL4-hCD20 or EL4-WT cells.

doi:10.1371/journal.pone.0139835.g006

and kidneys radioactivity uptake was related to antibody metabolism and radioactivity elimination. High radioactivity uptake in the spleen and lungs (highly vascularized organs) was correlated with the radioactivity that persisted in plasma at this time (44.0%ID/mL). Different time profiles emerged from these results. A straight decrease profile was observed in plasma (-20% in 14h, and almost -40% in 44h). As expected, spleen and lungs showed the same profile as plasma.

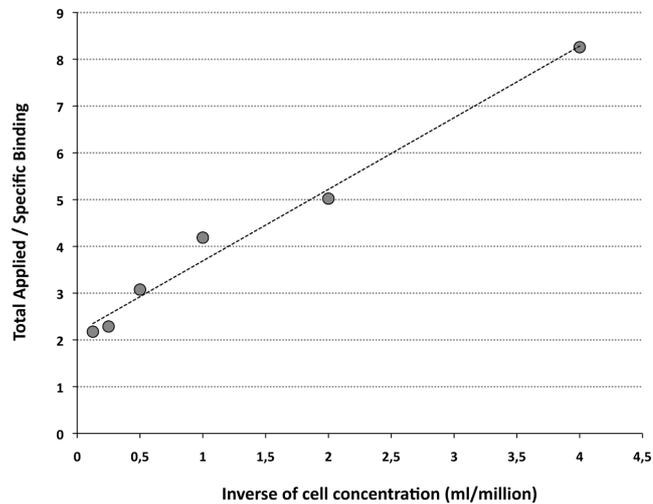


Fig 7. Determination of the immunoreactive fraction (IRF) of ^{99m}Tc anti-CD20 IgG-SH. ($R^2 = 0,984$).

doi:10.1371/journal.pone.0139835.g007

Table 2. Biodistribution of ^{99m}Tc anti-CD20 IgG-SH in healthy BALB/c mice. Values are expressed as the percentage of injected dose per gram (%ID/g) and represent the mean ± S.D. of the %ID/g.

	4h (n = 3)	8h (n = 4)	18h (n = 4)	24h (n = 7)	48h (n = 4)
Heart	8,8±2,3	7,7±3,4	7,9±3,2	3,5±1,1	3,7±1,1
Brain	0,6±0,2	0,5±0,3	0,5±0,2	0,3±0,1	0,2±0,1
Lungs	18,0±1,4	12,0±1,4	8,1±3,2	5,4±1,8	4,8±0,3
Kidneys	16,7±3,2	14,8±3,1	16,5±2,9	9,4±2,2	12,3±3,2
Spleen	27,3±5,6	17,5±8,6	11,0±3,5	9,7±4,3	9,1±2,5
Stomach	3,6±0,7	2,5±0,5	2,7±1,1	0,9±0,4	1,1±0,9
Small intestine	3,8±0,8	3,2±1,0	2,9±0,3	1,7±0,4	2,1±0,9
Cecum	5,0±1,1	4,2±1,0	3,6±1,7	2,7±1,2	2,1±0,6
Colon	3,0±0,5	2,8±0,9	3,6±0,7	1,6±0,4	1,9±0,4
Liver	29,7±5,8	22,3±4,3	29,6±11,5	13,6±3,1	15,9±4,3
Muscle	1,6±0,5	1,1±0,5	2,9±1,7	1,2±1,0	2,8±1,1
Blood cells	4,2±0,5	3,4±0,6	5,2±3,0	1,9±0,8	1,2±0,5
Plasma	44,0±7,9	32,4±8,9	28,3±6,9	13,6±3,7	7,6±2,7
Faeces	3,6±1,0	3,1±0,9	1,9±1,4	2,2±0,8	1,8±1,8

doi:10.1371/journal.pone.0139835.t002

An intermediate decrease profile was observed for the liver and kidneys (constant fixation up to 18h). Organs of the digestive tract (stomach, caecum, colon, and small intestine) described a low fixation rate profile (< 5%ID/g) to the five times, indicating that anti-CD20 IgG showed no particular affinity for these tissues which was confirmed by low fixation level in feces (3.6%ID/g at 4h and 1.8%ID/g at 48h). As expected for IgG, the brain showed no significant uptake (%ID/g from 0.6 to 0.2 at 4h and 48h), because IgG does not cross the blood-brain barrier.

Imaging studies

To quantify ^{99m}Tc-anti-CD20-IgG-SH tumor targeting, nude mice were xenografted with EL4-hCD20 and EL4-WT on the right and left flanks, respectively. ^{99m}Tc-anti-CD20 IgG-SH was injected intravenously and planar gamma scintigraphy was performed 2 h 30, 12 h and 24 h after the injection (Table 3, Fig 8A). A fixation was observed in the EL4-hCD20 tumor on the right flank (Fig 8A light gray arrow), whereas no signal was detected in the EL4-WT tumor on the left flank (Fig 8A dark gray arrow). Tumor semiquantitative uptake, normalized by normal tissue background (TBG) uptake in upper limb differed significantly between CD20⁺ tumor and CD20⁻ tumor at each acquisition time. The most striking difference is observed at 24 h (3.38 ± 1.94 versus 0.61 ± 0.24, respectively). High uptake in the liver, spleen and kidneys was also evident, consistent with the biodistribution studies in healthy mice. No fixation was observed in the tumors 24 h after injection of ^{99m}Tc-anti-EGFR IgG-SH and ^{99m}Tc-IsoLink[®] (Fig 8B and 8C). For both, “CD20⁺ tumor/TBG” and “CD20⁻ tumor/TBG” ratios between 0.8 and 1 were obtained (Fig 9). No significant difference was observed between CD20⁺ and CD20⁻ tumors.

Table 3. Kinetic uptake of ^{99m}Tc anti-CD20 IgG-SH in CD20+ or CD20- Tumor determined by planar scintigraphy. Data are expressed as ratio between tumor and normal tissue background (muscle). Significant differences were observed between CD20+ and CD20- tumor/muscle ratio at 2h30 and 12h (p = 0,03) and at 24 h (p = 0,02).

	2h30	12h	24h
CD20+ Tumor	2.58±1.24	3.02±1.22	3.38±1.94
CD20- Tumor	0.85±0.62	0.84±0.43	0.61±0.24

doi:10.1371/journal.pone.0139835.t003

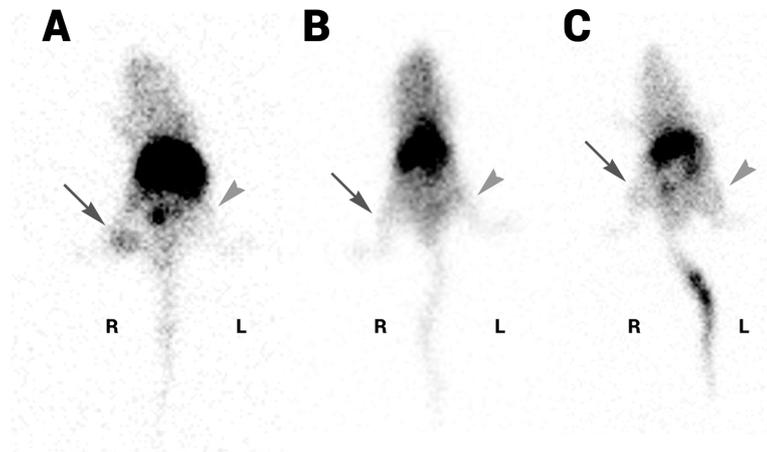


Fig 8. Scintigraphic acquisition of athymic Nude mice bearing CD20+ (R) and CD20- (L) xenografts. Mice were grafted with tumor CD20+ on right flank (R, dark gray arrow) and CD20- on left flank (L, light gray arrow). Mice were injected intravenously with 35–37 MBq of ^{99m}Tc anti-CD20 IgG-SH (A), ^{99m}Tc anti-EGFR IgG-SH (B) or ^{99m}Tc -anti-IsoLink[®] (C). Mice were anesthetized with isoflurane (2%, under O_2 conditions, 1 L/min). Static imaging was acquired, 24h after injection, with a gamma camera (dual-head system fitted with low-energy parallel collimators, 256 × 256 pixels, zoom 2, 10 minutes acquisition).

doi:10.1371/journal.pone.0139835.g008

Discussion

This study presents an optimized method to radiolabel anti-CD20 IgG with ^{99m}Tc and *in vitro* and *in vivo* evaluations of the radiolabeled IgG. ^{99m}Tc is an attractive candidate for radiolabeling due to its specific characteristics: emission, radiation protection, radiochemistry, and ready availability in nuclear medicine department. Due to their high kinetic stability, technetium complexes in a low oxidation state (+I) have recently gained considerable attention for the development of novel site-specific radiopharmaceuticals [15]. The organometallic ^{99m}Tc -tricarboxyl core [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$]⁺ is one of these complexes, characterized by its water- and air-stability. With the IsoLink[®] kit, this complex can be readily synthesized. This ^{99m}Tc -tricarboxyl core is an excellent precursor to radiolabel various biomolecules, especially immunoglobulins. Chen *et al.* [10] radiolabeled native trastuzumab directly with yields of 90%, using commercially available trastuzumab (10 mg). To achieve high synthesis yields with smaller antibody amounts, IgG can be modified before radiolabeling. Dias *et al.* [21] have radiolabeled rituximab with ^{99m}Tc -tricarboxyl, after reduction with 2-mercaptoethanol. After disulfide bond reduction, radiolabeling yields reached 98%, but this pretreatment likely induced IgG structural alterations. To functionalize IgG and add SH- groups under milder conditions, Biechlin *et al.* [15] tried an alternative way to derivatize IgG with 2-iminothiolane, and high radiolabeling yields (> 95%) of IgG-SH were obtained with low polyclonal IgG amounts (0.5 mg). To develop a mild radiolabeling method applicable to noncommercial monoclonal IgGs and other isotypes, available only in limited quantities, we selected the method described by Biechlin *et al.* [15]. Our results confirmed the derivatization step's value: a 40% yield increase was obtained with derivatized IgG versus native IgG (0.0375–0.225mg). A high RCP (> 95%) was achieved with limited IgG amounts (0.150–0.225mg). In comparison, 2 mg of IgG was necessary to reach a RCP of 96% with HYNIC, a standard technology used for protein radiolabeling [22]. As expected, the RCP increased with (the logarithm of) IgG quantity and also with the SH group amount (Fig 3).

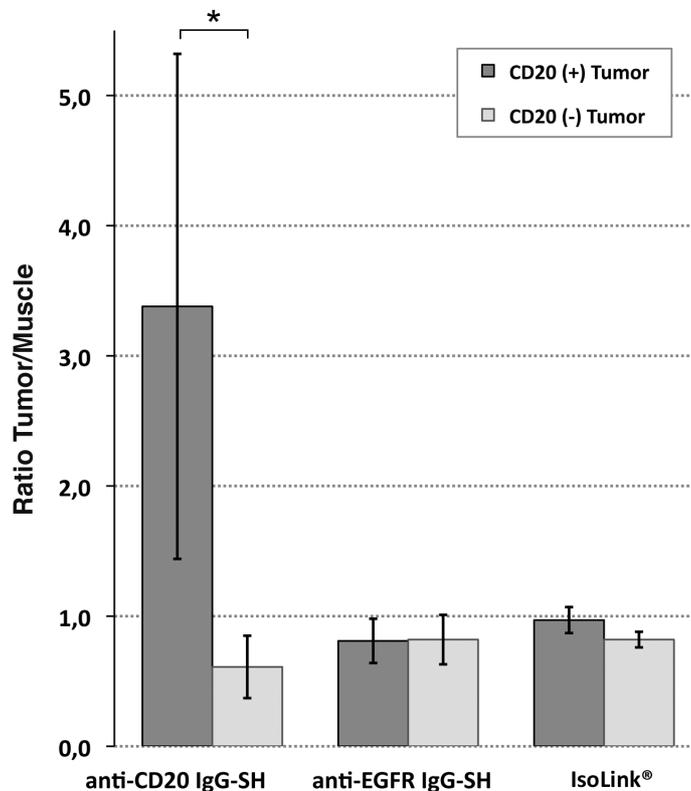


Fig 9. Uptake of ^{99m}Tc anti-CD20 IgG-SH, ^{99m}Tc anti-EGFR IgG-SH or ^{99m}Tc-IsoLink® in CD20+ or CD20- Tumor. Data are expressed as ratio between tumor and normal tissue background (muscle). Significant difference with ^{99m}Tc anti-CD20 IgG-SH was observed between CD20+ and CD20- tumor/muscle ratio (*: $p = 0.018$)

doi:10.1371/journal.pone.0139835.g009

Under our optimized derivatization conditions, an average of 2.5 moles of sulfhydryl groups was grafted per mole of IgG, compared with 3.3 obtained by Biechlin *et al.* [15] with similar 2-IT concentrations. Moreover, after harsher treatment with 2-mercaptoethanol, Dias *et al.* [21] reached 5 ± 1 SH groups per IgG molecule and obtained RCP > 98%. Radiolabeling is normally qualified by yield, but specific activity is another important parameter. In our experiment, using an average activity of 148–185 MBq, the specific activity of IgG radiolabeled was determined at 125 MBq/nmol. In comparison, Dias *et al.* [21] reported a lower specific activity of 35 MBq/nmol and Biechlin *et al.* [15] have obtained 80–155 MBq/nmol.

In summary, although we have obtained lower fixation rates of SH groups, radiolabeling yields are comparable to those of other authors, with IgG amount lower and high specific activity. Additionally, antibody immunoaffinity is supposed to be altered less when fewer SH groups are added to binding sites.

^{99m}Tc-anti-CD20 IgG-SH radiolabeling stability was checked over 24 h. In PBS, we obtained a decrease of <1% and 3% at 1h and 24h respectively. The comparison of these results with published data using standard method as HYNIC (in saline: <1% and 5% at 1h and 24h

respectively) or direct labeling after disulfide bond reduction (decrease of 18% at 22h) showed a better stability of the studied method [22,23]. In plasma, even if our incubation conditions were closer to physiological fluid and harsher than Dias' or Stopar's experiments, our stability results were also consistent with published data with tricarbonyl core (loss of 10–15%) [3,21] or direct labeling after disulfide bond reduction [23]. Nevertheless, Singh *et al.* observed with HYNIC a less important release (< 5%) [22]. To challenge tricarbonyl core fixation, displacement experiments with amino acids were conducted and the data obtained with histidine and cysteine were consistent with the results of Dias and Biechlin [21,15]. Cysteine is the most reactive amino acid against the organometallic aquaion $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$. As described by Dias [21], we observed that a 1500-fold excess was necessary to decrease the RCP to 9%. With HYNIC method, the reduction of the labeled IgG was quite similar to our study: at 1h, even at a molar ratio of 25 times, the decrease was about 5.8%, which increased to 23.7% at 100 times cysteine concentration [22]. Study with MAG3 method gave same result (dissociation of ^{99m}Tc of 18% for an excess of 50) [24].

Furthermore, our optimized radiolabeling process, as observed by Western blot, did not impair the native IgG structure. Few integrity studies have been reported, although protein degradation was described for polyclonal IgG radiolabeled after stannous or 2-mercaptoethanol reduction [24]. This result was consistent with the theoretical advantage of the BFCA method, which should be milder than reduction.

The last step to investigate radiolabeled antibody functionality was to perform binding studies. Two parameters were determined: the dissociation constant and the immunoreactive fraction. Results obtained for Kd with the two methods, on a plate and on cells, were consistent and complementary. The technique on the plate is easy to conduct and provides an approximation of affinity, but variation was observed probably due to inconsistent antigen adsorption on the support. Experiments with cells, are closer to *in vivo* conditions in terms of antigen presentation. Moreover, the same cell lines can then be grafted to induce experimental tumors. However, for a selected cell line, the number of binding sites depends on culture conditions (e.g., the number of cells transplanted, cells confluency states, cell cycle phase). In both experiments, we determined a Kd of ~40 nM, which represents a small loss of affinity compared with native anti-CD20 IgG (Kd = 5.2–11.0 nM) [16]. This slight affinity loss can be explained both by the derivatization with 2-IT and by radiolabeling with the tricarbonyl core. The IRF obtained (46%) indicates that only a portion of the radiolabeled antibodies can bind to antigen, which likely causes background noise during image acquisition. However, the IRF value is close to those obtained in other studies on rituximab radiolabeled with the tricarbonyl core. Surprisingly, despite a good Kd, Dias *et al.* [21] determined a similar IRF of 50%.

The results of the biodistribution studies carried out in normal BALB/c mice with ^{99m}Tc -anti-CD20 IgG-SH were consistent with reported values [11,21]. Thus, high uptake of radioactivity into the lungs and the spleen was observed with IgG and can be explained by the high plasma radioactivity and by the general characteristics of radiolabeled IgG: high initial activity levels in blood and blood-rich tissues [25]. High activity retention in the liver and in kidney can then be attributed to hepatobiliary metabolism of the radiolabeled antibody and renal clearance of the degraded form.

Rituximab is characterized by a half-life of ~3 weeks (17–21 days). Activity in plasma, which remained high, is correlated with this relatively long biological IgG half-life in the bloodstream, which could explain why radioactivity is still present in plasma after 48 h post-injection (10%), and suggests the absence of rapid degradation.

Preliminary imaging studies performed in animals confirmed the *in vitro* affinity results. Mice bearing subcutaneous lymphoma expressing CD20 on the right side and wild type on the left side showed a significant uptake in CD20⁺ tumor versus CD20⁻ tumor. This favorable

uptake of rituximab in the CD20⁺ tumor is comparable with the uptake obtained by Dias *et al.* [21] with a tumor model of a Ramos lymphoma xenograft (CD20⁺ tumor/muscle = 4.0).

Conclusions

The association of a bifunctional synthon (2-iminothiolane) and a preformed technetium complex (^{99m}Tc-tricarbonyl) made it possible to achieve high radiolabeling yields, with high specific activity. Additionally, the radiolabeled IgGs were stable in PBS and in plasma. Their structure and immunoaffinity were not impaired by this method. Specific anti-CD20 binding was conserved both *in vitro* and *in vivo*. Small antibody amounts can be used with our optimized radiolabeling method. This major advantage could be exploited to radiolabel antibodies expensive or available in very limited quantities, such as different Ig isotypes or antibody fragments.

Acknowledgments

Some of the work presented here was supported in part by Comité d'Orientation de la Recherche sur le Cancer (CORC) en Limousin. The authors are grateful to Mallinckrodt Medical for providing IsoLink for the work. We would like to thank F. Dalmy (INSERM UMR-S 1094 NET) for assistance with statistical analyses.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HC IQ JM. Performed the experiments: HC IQ AC. Analyzed the data: HC IQ AC. Contributed reagents/materials/analysis tools: HC IQ. Wrote the paper: HC IQ AC JM.

References

1. Richter W, Ivancevic V, Meller J, Lang O, Le Guludec D, Szilvazi I, et al. ^{99m}Tc-besilesomab (Scintimun[®]) in peripheral osteomyelitis: comparison with ^{99m}Tc-labelled white blood cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011; 38: 899–910. doi: [10.1007/s00259-011-1731-2](https://doi.org/10.1007/s00259-011-1731-2) PMID: [21321791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21321791/)
2. Becker W, Palestro CJ, Winship J, Feld T, Pinsky CM, Wolf F, et al. Rapid imaging of infections with a monoclonal antibody fragment (LeukoScan). *Clin Orthop Relat Res*. 1996; 329: 263–72. PMID: [8769461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8769461/)
3. Stopar TG, Mlinaric-Rascan I, Fettich J, Hojker S, Mather SJ. (99m)Tc-rituximab radiolabelled by photo-activation: a new non-Hodgkin's lymphoma imaging agent. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33(1): 53–59. PMID: [16172899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16172899/)
4. Faintuch BL, Núñez GEF, Teodoro R, Moro AM, Mengatti J. Radiolabeled nano-peptides show specificity for an animal model of human PC3 prostate cancer cells. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011; 66(2): 327–336.
5. Fonti R, Cheung NK, Bridger GJ, Guo HF, Abrams MJ, Larson SM. ^{99m}Tc-monoclonal antibody radiolabeled via hydrazino nicotinamide derivative for imaging disialoganglioside G(D2)-positive tumors. *Nucl Med Biol* 1999; 26(6): 681–686. PMID: [10587107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10587107/)
6. Alberto R, Schibli R, Egli A, Schubiger AP, Abram U, Kaden TA. A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of [^{99m}Tc(OH)₂(CO)₃]⁺ from [^{99m}TcO₄]⁻ in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand. *J Am Chem Soc* 1998; 120(31): 7987–7988.
7. Camacho X, García MF, Calzada V, Fernández M, Chabalgoity JA, Moreno M, et al. [(99m)Tc(CO)(3)]-radiolabeled bevacizumab: in vitro and in vivo evaluation in a melanoma model. *Oncology* 2013; 84(4): 200–209. doi: [10.1159/000338961](https://doi.org/10.1159/000338961) PMID: [23328435](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23328435/)
8. Biechlin ML, Bonmartin A, Gilly FN, Fraysse M, Du Moulinet D'Hardemare A. Radiolabeling of annexin A5 with (99m)Tc: comparison of HYNIC-Tc vs. iminothiolane-Tc-tricarbonyl conjugates. *Nucl Med Biol* 2008; 35(6): 679–687. doi: [10.1016/j.nucmedbio.2008.05.009](https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2008.05.009) PMID: [18678353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18678353/)
9. Alberto R, Ortner K, Wheatley N, Schibli R, Schubiger AP. Synthesis and properties of boranocarbonate: a convenient in situ CO source for the aqueous preparation of [(99m)Tc(OH)(2)3(CO)3]+. *J Am Chem Soc* 4. 2001; 123(13): 3135–3136. PMID: [11457025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11457025/)

10. Chen WJ, Yen CL, Lo ST, Chen KT, Lo JM. Direct ^{99m}Tc labeling of Herceptin (trastuzumab) by ^{99m}Tc(I) tricarbonyl ion. *Appl Radiat Isot* 2008; 66(3): 340–345. PMID: [17996452](#)
11. Pandey U, Kameswaran M, Dev Sarma H, Samuel G. (99m)Tc carbonyl DTPA-Rituximab: Preparation and preliminary bioevaluation. *Appl Radiat Isot* 2014; 86C: 52–56.
12. Egli A, Alberto R, Tannahill L, Schibli R, Abram U, Schaffland A, et al. Organometallic ^{99m}Tc-aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity. *J. Nucl. Med.* 1999; 40(11): 1913–1917. PMID: [10565789](#)
13. Meares CF, Moi MK, Diril H, Kukis DL, McCall MJ, Deshpande SV, et al. Macrocyclic chelates of radiometals for diagnosis and therapy. *Br J Cancer Suppl* 1990; 10: 21–26. PMID: [2383477](#)
14. Goedemans WT, Panek KJ. Bifunctional chelating agents. 1995.
15. Biechlin ML, Du Moulinet D'Hardemare A, Fraysse M, Gilly FN, Bonmartin A. Improvement in radiolabelling proteins with the ^{99m}Tc-tricarbonyl-core [^{99m}Tc(CO)₃]⁺, by thiol-derivatization with iminothiolane: application to γ -globulins and annexin V. *J Labelled Compd Radiopharm* 2005; 48(12): 873–885.
16. FDA. Clinical review of BLA reference NO. BLA 97–0260 AND BLA 97–0244. 1997.
17. Ernst JA, Li H, Kim HS, Nakamura GR, Yansura DG, Vandlen RL. Isolation and characterization of the B-cell marker CD20. *Biochemistry.* 2005; 44: 15150–8. PMID: [16285718](#)
18. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, et al. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol.* 2003; 171(3): 1581–7. PMID: [12874252](#)
19. Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, Fedorko J, Bunn PA Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods* 1984; 72(1): 77–89. PMID: [6086763](#)
20. Lindmo T, Bunn PA Jr. Determination of the true immunoreactive fraction of monoclonal antibodies after radiolabeling. *Methods Enzymol* 1986; 121: 678–691. PMID: [3523136](#)
21. Dias CR, Jeger S, Osso JA Jr, Müller C, De Pasquale C, Hohn A, et al. Radiolabeling of rituximab with (188)Re and (99m)Tc using the tricarbonyl technology. *Nucl Med Biol* 2011; 38(1): 19–28. doi: [10.1016/j.nucmedbio.2010.05.010](#) PMID: [21220126](#)
22. Singh T, Kumar K, Soni S, Rawat H, Mittal G, Singh AK, et al. A new method for radiolabeling of human immunoglobulin-G and its biological evaluation. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012; 4(4): 286–290. doi: [10.4103/0975-7406.103245](#) PMID: [23248561](#)
23. Malviya G, Anzola KL, Podesta E, Lagana B, Del Mastro C, Dierckx RA, et al. ^{99m}Tc-labeled for Imaging B Lymphocyte Infiltration in Inflammatory Autoimmune Disease Patients. *Mol Imaging Biol.* 2012; 14: 637–646.
24. Gano L, Patrício L, Marques E, Cantinho G, Pena H, Martins T, et al. Human polyclonal immunoglobulin labelled with technetium-99m via NHS-MAG3: a comparison of radiochemical behavior and biological efficacy with other labelling methods. *Nucl Med Biol* 1998; 25(4): 395–403. PMID: [9639302](#)
25. Aurlien E, Larsen RH, Kvalheim G, Bruland OS. Demonstration of highly specific toxicity of the alpha-emitting radioimmunoconjugate (211)At-rituximab against non-Hodgkin's lymphoma cells. *Br J Cancer* 2000; 83(10): 1375–1379. PMID: [11044364](#)

D. Principaux résultats et discussion de l'article

Dans cette étude, nous avons présenté une méthode de radiomarquage des IgG anti-CD20 optimisée avec le ^{99m}Tc par méthode indirecte à l'aide du coeur tricarbonyl et d'un synthon le 2-IT. Nos résultats ont confirmé l'intérêt de l'étape de dérivation par le 2-IT avec par exemple une augmentation des rendements de marquage de 40% avec les IgG dérivées par rapport aux IgG natives (0,0375 - 0.225 mg). Des rendements de radiomarquage élevés (> 95%) ont ainsi été obtenus à partir de quantités limitées d'IgG (0,150 - 0.225mg), avec une activité spécifique de 125 MBq / nmol. En comparaison, Dias *et al.* ont radiomarké du rituximab (0,1 - 0,5 mg) avec le coeur tricarbonyl après réduction des ponts disulfure par le 2-mercaptoéthanol (Dias, 2011). Ils ont obtenu des rendements de radiomarquage de 98% avec une activité spécifique plus faible de 35 MBq / nmol. Biechlin *et al.* ont radiomarké des Ig polyclonales (0,5 mg) par une méthode similaire à celle que nous avons utilisée et ont obtenu des rendements de radiomarquage de l'ordre de 95% avec une activité spécifique de 80 à 155 MBq / nmol (Biechlin, 2005). En résumé, les rendements de radiomarquage sont comparables à ceux d'autres auteurs, avec une quantité d'IgG inférieure et une activité spécifique élevée.

Nous avons ensuite évalué *in vitro* les IgG radiomarkées. Les études de conservation montrent que le radiomarquage est stable sur 24h en PBS (à 4 et 25°C). La comparaison de ces résultats avec les données de la littérature a montré que notre radiomarquage était plus stable que les radiomarkages standard utilisant la méthode HYNIC (Singh, 2012 ; Malviya, 2012). Une légère diminution de PRC est à noter en présence de plasma murin (1/10 ; 37°C) sur une période de 24h. Malgré des conditions d'incubation plus proches des conditions physiologiques et plus drastiques que celles d'autres études, nos résultats de stabilité du radiomarquage en plasma sont comparables (Stopar, 2006 ; Dias, 2011 ; Malviya, 2012). Les expériences de déplacement avec des acides aminés comme la cystéine et l'histidine afin d'évaluer les phénomènes de transchélation et ainsi d'expliquer la dégradation dans le plasma, ont montré que la diminution des PRC dépendait de la nature et de la concentration en compétiteur. Ces résultats sont également cohérents avec ceux retrouvés dans les études de Dias et Biechlin. En outre les études d'intégrité par Western blot couplé à l'autoradiographie ont permis de montrer que le processus de radiomarquage n'altérait pas la structure native des IgG, confirmant l'intérêt d'un radiomarquage impliquant un BFCA. La préservation de la fonctionnalité des Ac après radiomarquage a été évaluée à l'aide de deux paramètres : la

constante de dissociation K_d et la fraction immunoréactive IRF. La détermination du K_d a été effectuée avec deux méthodes complémentaires : l'une sur plaque coatée avec l'antigène et l'autre sur cellules exprimant l'antigène. Les deux expériences donnent un résultat comparable, avec un K_d de 40 nM, ce qui représente une légère perte d'affinité par rapport à l'IgG anti-CD20 native ($K_d = 5,2$ à $11,0$ nM) (FDA, 1997). Celle-ci peut être expliquée notamment par la fonctionnalisation avec le 2-IT et par le radiomarquage avec le cœur tricarbonyle qui peuvent gêner l'interaction avec l'antigène. Quant à la valeur de l'IRF obtenue (46%), elle est comparable à celle des autres études et indique que seule une partie des Ac radiomarqués peut se lier à l'antigène (Dias, 2011). Les deux méthodes ont été réalisées en parallèle. L'immunoaffinité sur plaques est une méthode plus rapide et moins fastidieuse que l'immunoaffinité sur cellules. Cependant, la méthode sur cellules nous permet d'avoir des conditions d'étude plus proches de l'*in vivo*, d'autant plus que les mêmes lignées cellulaires ont ensuite été greffées pour induire des tumeurs chez la souris et suivre la fixation tumorale *in vivo*. Cette technique est plus contraignante puisqu'elle nécessite de mener en parallèle des cultures cellulaires. La liaison non spécifique reste assez importante. Elle est générée par la liaison non spécifique sur les tubes et les filtres, même si elle a été réduite par une pré-incubation des supports en PBS-BSA. De plus, malgré la détermination de la concentration nécessaire en Ac froid afin d'optimiser le déplacement de la liaison spécifique, nous observons que la liaison non spécifique des IgG anti-CD20 sur les EL4 CD20 est supérieure à celle de l'IgG anti-EGFR ou à celle sur les EL4 WT. A fortes concentrations, il semble donc que le déplacement ne soit pas maximal.

Des études *in vivo* ont enfin été réalisées. L'étude de biodistribution des ^{99m}Tc -IgG-SH anti-CD20 a été menée chez des souris saines BALB/c à différents temps (4h, 8h, 18h, 24h et 48h). Elle a montré une importante captation dès 4h suivie d'une diminution progressive, des IgG radiomarquées dans les poumons et la rate. Ces données peuvent être expliquées par le fort comptage de radioactivité dans le plasma qui diminue ensuite régulièrement (encore 10% ID/g à 48h post-injection), due aux caractéristiques générales des IgG et à sa demi-vie plasmatique de 3 semaines. Ce comptage élevé est donc ultérieurement retrouvé dans les tissus richement vascularisés comme précédemment décrit (Aurlien, 2000). Un taux important de comptage est également retrouvé à 4h dans le foie et les reins, avec une rétention d'activité au-delà de 18h. Ces dernières observations peuvent être attribuées à un métabolisme hépatobiliaire de l'anticorps radiomarqué et à la clairance rénale de la forme dégradée. Les

organes digestifs montrent un faible taux de captation et le cerveau ne présente pas de fixation. Ces études de biodistribution sont comparables avec celles retrouvées dans la littérature (Dias, 2011 ; Pandey, 2014).

Les études d'imagerie réalisées chez l'animal porteur de lymphome sous-cutané exprimant le CD20 sur une patte et ne l'exprimant pas sur l'autre patte ont confirmé les résultats d'immunoaffinité des ^{99m}Tc -IgG-SH anti-CD20 avec une fixation importante sur la tumeur CD20+. En effet, leur taux de fixation dans la tumeur CD20+ (CD20 + tumeur / muscle = 4,0) est élevé et comparable à celui obtenu par Dias *et al.* avec un modèle de tumeur de xéno greffe de lymphome de Ramos (Dias, 2011).

Au final, la technique de radiomarquage mise au point et optimisée avec les IgG, est simple et n'altère pas la fonctionnalité des Ac radiomarqués. En outre, comme elle utilise peu d'Ac elle pourra être applicable à d'autres isotypes d'Ac en particulier aux IgA.

II. Deuxième partie : Radiomarquage des Immunoglobulines A anti-ACE par le ^{99m}Tc et études de biodistribution

A. Introduction

La seconde partie de notre travail a consisté en l'optimisation du radiomarquage des IgA à partir de la technique mise au point pour les IgG. Après évaluation *in vitro* des IgA radiomarquées, ces IgA ont fait l'objet d'études de biodistribution chez l'animal sain puis chez l'animal porteur de tumeur. Pour exploiter le tropisme connu des IgA vis-à-vis des épithéliums muqueux, l'ACE marqueur tumoral du cancer colorectal a été choisi comme antigène d'intérêt. Nous avons ainsi effectué notre étude avec des IgA anti-ACE en comparaison aux IgG anti-ACE.

Les immunoglobulines A représentent un isotype d'Ac « unique » chez l'homme en raison notamment de leur hétérogénéité dans les formes moléculaires : monomérique, dimérique, polymérique et sécrétoire. Notre travail, dans un premier temps, s'est focalisé sur les IgA monomériques et polymériques. Ce travail fait l'objet d'une publication en préparation.

Le radiomarquage des IgA a comporté, comme dans la technique mise au point sur les IgG, trois étapes :

- fonctionnalisation des Ig avec le 2-Iminothiolane
- formation du ^{99m}Tc -tricarboxyl
- complexation du ^{99m}Tc -tricarboxyl aux Ig-SH

Suite au radiomarquage, l'évaluation *in vitro* des Ig radiomarquées a été menée. Elle incluait des études de stabilité (en PBS et en plasma murin) sur 24h, des études d'intégrité par Western blot et des études d'immunoaffinité par RadioImmunoAssay et par binding sur cellules exprimant l'antigène d'intérêt. Pour les épreuves de binding sur cellules, les IgA à tester ciblant l'ACE, les cellules WiDr exprimant l'ACE et les cellules DLD1 ne l'exprimant pas, ont été utilisées. En effet, il a été montré par Guadagni *et al.*, dans des extraits cellulaires, que les cellules DLD1 ne produisent pas d'ACE, alors que les WiDr en produisent à raison de 93 ng/mg de protéines cellulaires (Guadagni, 1990). Les WiDr sont des cellules provenant d'un adénocarcinome primaire du côlon rectosigmoïdien de stade TNM II (Flatmark, 2004), et les DLD1 sont issues d'un adénocarcinome colique de stade Duke C (Baker, 2011). Il est à

noter, dans le cadre des études *in vitro*, que l'évaluation des IgA radiomarquées a été réalisée avec un « mélange » d'IgA monomérique (mIgA) et polymérique (pIgA) en proportion égale.

Les études de biodistribution après injection intraveineuse (*i.v.*) ont ensuite été réalisées chez l'animal sain (souris BALB/c) en comparant les IgA aux IgG de même antigénicité. Pour ces études, des fractions enrichies en IgA monomériques d'une part et en IgA polymériques d'autre part (pureté d'environ 95% et 85% respectivement) ont été testées.

Des études de biodistribution ont ensuite été effectuées dans un modèle de souris porteuse de cancer colorectal humain afin d'évaluer la capacité des IgA à cibler des tumeurs, et plus particulièrement des tumeurs développées au niveau des muqueuses. Des IgA anti-ACE polymériques radiomarquées ont été injectées et évaluées en comparaison d'IgA irrelevantes (anti-arachide).

Suite aux études de biodistribution des mIgA et des pIgA après injection *i.v.*, des études de biodistribution ont été réalisées après administration orale d'IgA sécrétoires (sIgA) chez l'animal sain. La biodistribution de l'IgA a été comparée à celle des IgG. Il est à noter que ces études n'ont pu être réalisées avec une IgG de même antigénicité que l'IgA, l'IgG anti-ACE n'étant pas disponible en quantités suffisantes. En effet, les quantités d'IgG produites par les clones sélectionnés pour obtenir l'IgG anti-ACE étaient trop faibles.

En complément de l'article en préparation, les études préliminaires aux résultats décrits dans cet article et les données de biodistribution après administration orale sont présentées ci-dessous.

B. Etudes préliminaires

1. Choix des lignées cellulaires pour les expériences de binding

Les premières études d'affinité ont été réalisées sur la lignée HT29, déjà utilisée dans le laboratoire. Il s'agit d'une lignée cellulaire provenant d'un cancer du côlon primaire modérément différencié (Flatmark, 2004). L'étude de l'affinité des IgA anti-ACE radiomarquées sur les cellules HT29 montre une fixation totale et une fixation non spécifique qui augmentent de façon parallèle lorsque les concentrations en IgA anti-ACE augmentent (Figure 39). Une liaison spécifique est mise en évidence, toutefois elle est très faible (< 0,05 µg/ml) alors qu'il semble que le plateau de saturation soit atteint. La liaison spécifique étant très inférieure à la liaison non spécifique, il est possible que le déplacement par l'anticorps

froid n'ait pas été suffisant. Ces expériences ont été réalisées avec une concentration en Ac froid de 100 µg/ml, par analogie aux résultats obtenus pour les IgG. En augmentant la concentration, nous n'avons pas vu d'amélioration de la liaison spécifique. De plus, ces expériences de déplacement par concentration croissante d'Ac froid consommant beaucoup d'Ac, et la quantité d'IgA à disposition étant limitée, il nous fallait choisir une concentration d'Ac froid raisonnable. D'autre part, les liaisons, et notamment la liaison totale, sont faibles par rapport à celles observées pour les IgG anti-CD20 sur les cellules EL4 CD20 (de l'ordre de 1 µg/ml), ce qui suggèrent que l'antigène est peu exprimé sur ces cellules.

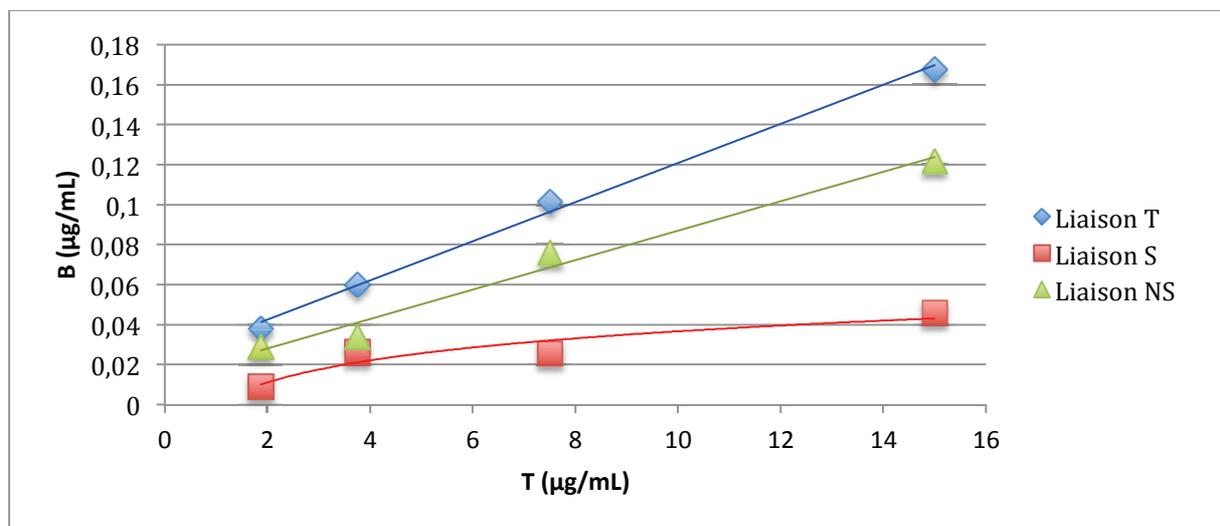


Figure 39 : Immunoaffinité des IgA anti-ACE après radiomarquage sur cellules HT29

Détermination de la liaison des IgA anti-ACE sur cellules HT29 en fonction des concentrations totales d'Ac ajouté $B = f(T)$

- ◆ : Représente la fixation totale des IgA anti-ACE radiomarquées (BT)
- : Représente la fixation spécifique des IgA anti-ACE radiomarquées (déterminée par BT-BNS)
- ▲ : Représente la fixation non spécifique des IgA anti-ACE radiomarquées. Fixation des IgA radiomarquées en présence d'excès d'Ac froid.

Les cellules HT29 sécrétant de l'ACE en quantité moindre (12,5 ng/mg de protéines cellulaires) par rapport à d'autres lignées cellulaires de cancer colorectal, nous avons décidé de tester d'autres lignées. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux cellules WiDr exprimant davantage cet antigène (93 ng/mg de protéines cellulaires) (Guadagni, 1990). Ces cellules ayant donné des résultats de liaison spécifique plus élevée, c'est ensuite sur ces lignées que les différents travaux ont été réalisés.

2. Choix du modèle murin tumoral

L'objectif était de disposer d'un modèle murin de cancer colorectal humain à partir de lignées cellulaires exprimant suffisamment l'ACE, antigène ciblé par l'anticorps étudié. De plus, le modèle devait mimer le micro-environnement physiopathologique de ce type de cancer, avec une insertion dans la muqueuse colique. Pour élaborer ce modèle, nous nous sommes basés sur le modèle développé par Cespedes *et al.* avec des cellules HCT-116, SW-620 et DLD1 (Céspedes, 2007). Des souris immunodéprimées de type nude ont été greffées par laparotomie, après micro-injection (sous loupe binoculaire) de suspension cellulaire de WiDr entre la muqueuse et la musculature du caecum. Afin de suivre l'évolution tumorale et de déterminer le moment le plus adapté pour l'étude de fixation tumorale des Ig, une première série d'animaux a été étudiée avec sacrifice à différents jours post greffe. De façon synchrone, une greffe était également réalisée au niveau de la patte pour suivre l'évolution de la croissance tumorale. Lors de la dissection des animaux, la tumeur au niveau colique se présentait sous la forme de petites protubérances blanches en surface du caecum. Dans les stades plus avancés, la tumeur infiltrait de manière plus ou moins importante le caecum sain. Macroscopiquement, aucune tumeur n'était observée dans les autres organes, si ce n'est parfois au niveau du péritoine. Les tumeurs du péritoine semblaient être liées à une dissémination des cellules après injection (localisation en regard de la tumeur colique), la technique de microinjection a été améliorée pour que la suspension de cellules reste bien entre la muqueuse et la musculature. Cependant, chez quelques animaux, des tumeurs extra-caecales étaient présentes au niveau du péritoine et ont été prélevées et analysées lors des dissections.

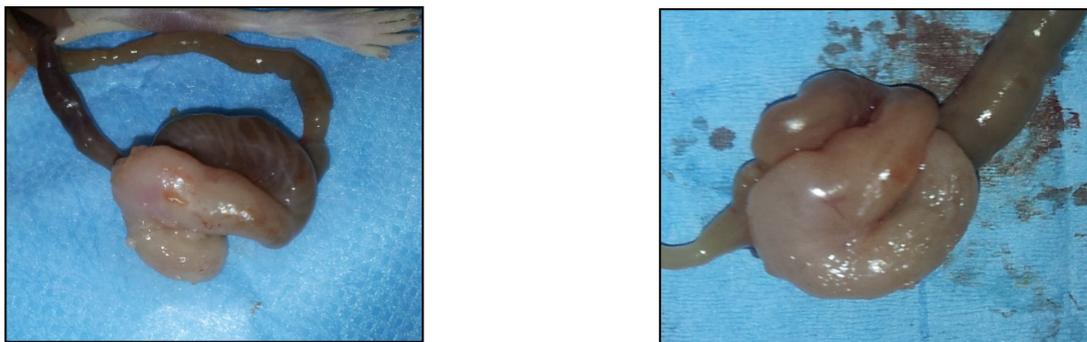


Figure 40 : Photographies de caecums tumoraux après greffe orthotopique de cellules WiDr

C. Article : “^{99m}Tc radiolabeling of anti-CEA IgA: biodistribution and tumor uptake studies”

Les travaux sur les IgA nous ont permis de réaliser un article qui est en cours de préparation.

^{99m}Tc radiolabeling of anti-CEA IgA: biodistribution and tumor uptake studies

Authors:

H. Carpenet^{1,2}, A. Cuvillier³, A. Perraud², J. Monteil^{1,2}, G. Champier³, MO. Jauberteau², I. Quelven^{1,2}

Address:

1. Nuclear Medicine Department, Dupuytren University Hospital, 2 avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex
2. EA 3842, Faculty of Medicine and Pharmacy, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex
3. B Cell Design Society, 98 rue Charles Legendre, 87000 Limoges

Corresponding author:

I. Quelven

Nuclear Medicine Department, Dupuytren University Hospital, 2 avenue Martin Luther King,
87042 Limoges Cedex

Tel: +33 5 55 05 64 93

Fax: +33 5 55 05 61 95

E-mail: isabelle.quelven@unilim.fr

Keywords:

Radiolabeling, anti-CEA Immunoglobulin A, affinity, biodistribution, tumor uptake

ABSTRACT

Through the radiolabeling of monomeric (m) and polymeric (p) IgA with Technetium 99m (^{99m}Tc), this study assesses IgA biodistribution and tumor targeting potency. IgA directed against carcinoembryonic antigen (CEA), a colorectal cancer marker, was retained to exploit the IgA mucosal tropism.

Ig were radiolabeled with ^{99m}Tc -tricarbonyl after derivatization by 2-iminothiolane. ^{99m}Tc -IgA was evaluated by *in vitro* analysis (stability, integrity, immunoaffinity). Biodistributions of radiolabeled anti-CEA mIgA, pIgA and IgG were compared in normal mice. Anti-CEA pIgA tumor uptake was studied in mice bearing WiDr orthotopic graft in cecum.

IgA radiolabeling was obtained with high yields, stable in PBS and murine plasma, and did not alter IgA binding functionality ($K_d \approx 25\text{nM}$). Biodistribution studies in normal mice confirmed that radiolabeled pIgA and, in a lesser extent, mIgA presented a strong and fast mucosal tropism and a shorter serum half-life than IgG. Evaluations of anti-CEA-pIgA, in cecal tumor model mice, showed a high lungs uptake correlated with metastasis confirmed in histological analysis. However, no specific radioactivity uptake by tumoral cecum was observed probably hindered by high IgA physiological uptake in cecum.

In vivo experiments highlighted significant differences of ^{99m}Tc -IgA and ^{99m}Tc -IgG biodistributions. Furthermore, tumoral model studies suggested interesting targeting pIgA potency in mucosal tissues.

INTRODUCTION

Since their discovery in 1975 by Kohler and Milstein, monoclonal antibodies (mAb) have substantially been developed in particular, through molecular engineering progresses. Although initially used for research and diagnostic, mAb have today many applications in therapy and represent one of the major biotherapy implements particularly in oncology.

Most therapeutic mAb actually approved by the FDA (Food and Drug Administration) or undergoing clinical trials are immunoglobulins G (IgG) more specifically IgG1 isotype. This IgG subclass has interesting functional characteristics. Indeed, these mAb induce targeted cell cytotoxicity through indirect mechanisms, such as Antibody Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity and Complement Dependent Cytotoxicity. Constant domains interactions allow recruiting humoral or cellular effectors (1). In addition, mAb will interact with Tumor-Associated Antigens (TAA), antigens which will occur on cells when tumor cells undergo genetic and epigenetic alterations (2). This interaction mediated by variable regions of mAb induces direct tumor cells effects: cellular development inhibition, apoptosis induction or growth factors production reduction (3).

However, some IgG limitations, as slow diffusion rates across cell membranes, high serum half-life, and impaired interactions with effector cells, could restrict their use. These constraints promote the development of antibody fragments and/or the use of other antibodies isotypes.

This study focuses on an under-studied immunoglobulin class: the Immunoglobulin A (IgA) isotype. IgA presented numerous interesting advantages. Widely represented in serum and predominant in secretions, IgA have a preferential tropism for mucous membranes. It emerges as a particularly attractive diagnostic and therapeutic candidate to target many mucosal tumors. IgA could concentrate naturally in the mucous membranes and associated glands, regardless of the vascularization (1). Furthermore, dimeric IgA (dIgA) have a cell signaling capacity greater than monomeric Ig, since IgA carries twice as much paratopes. Finally, secretory IgA (SIgA), association of dimeric form and secretory component, is particularly resistant to enzymatic degradation and stringent conditions present in the light of mucous membrane (4). This property could permit SIgA oral administration, whereas IgG are routinely intravenously injected. IgA knowledge and their applications are limited, partly due to difficulties in the identification of IgA producing B cells and in the stable production of IgA antibodies. Indeed, even if IgA are the antibodies physiologically the more produced in

human (66 mg/kg IgA/day) and the second class of serum antibodies in quantity, IgA secreting B lymphocytes represent less than 1% in normal mouse splenocytes (even less in mucosal lymphoid compartments, $2 \cdot 10^4$ B220⁺IgA⁺/mouse in *lamina propria* (0.01%), $2 \cdot 10^5$ B220⁺IgA⁺ cells/mouse in Peyer Patches (0.1%);(5)). The HAMIGATM (Humanized Antibody Made Up Of Monoclonal Immunoglobulin A) technology, recently developed, allows bypassing this limitation (6). By replacement of S μ domain by a human alpha 1 constant gene downstream of variable gene segments, the population of IgA secreting lymphocytes B in spleen increased significantly (6).

The aim of this study is to evaluate IgA biodistribution and tumor targeting potency, in particular in mucosal tumors. For this objective, radiolabeled IgA was synthesized and cecal tumor model was induced in nude mice.

To radiolabel protein and antibodies for scintigraphic imaging, various radionuclides are used, as Technetium-99m (^{99m}Tc) (7), Indium-111 (8), Iodine-124 (9) or Yttrium-86 (10). However, ^{99m}Tc remains the most widely used isotope for diagnosis, thanks to its suitable nuclear properties, its availability, and its chemistry (11). This radionuclide has favorable physical characteristics for high-efficiency detection in molecular imaging with a γ -radiation of 140 keV and for radiation protection with a short half-life ($T_{1/2} = 6$ h). This short half-life is not optimal for IgG (half life: 20 days) radiolabeling but seems suitable considering the IgA shorter half-life (3-6 days). Moreover, technetium chemistry is dominated by the formation of metal-ligand complexes. Even if direct radiolabeling methods are easy to conduct, indirect radiolabeling *via* a bifunctional chelating agent (BFCA) is more suitable to preserve physico-chemical and biological properties of the bioactive molecule. Among the BFCA, the tricarbonyl core $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ presents a high kinetic stability and allows proteins labeling with ^{99m}Tc, under mild physiological conditions. Biechlin *et al.* showed that the addition of a spacer, 2-iminothiolane (2-IT), on proteins such as polyvalent IgG, improved the radiolabeling yields (12). Furthermore, in a previous study, we have shown that this radiolabeling method, optimized with limited antibody amounts, provide high radiolabeling yields, with high specific activity, and preserve IgG structure and immunoaffinity (13). Considering these various advantages, the radiolabeling technique with tricarbonyl core $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ was chosen to perform IgA studies. For all our experiments, an IgA directed against carcinoembryonic antigen (CEA) was selected. Actually, CEA is a 180 kDa glycoprotein frequently expressed on adenocarcinomas of various origin tissues. CEA was

identified in colorectal cancer (CRC), for the first time in 1965 (14). This TAA expression is upregulated in approximately 90% of advanced CRC (15).

In our study, the radiolabeled antibody was initially characterized *in vitro*. Stability, integrity and immunoaffinity were evaluated. Radiolabeled IgA biodistribution was assessed in normal mice and compared with radiolabeled IgG of same antigenicity. Finally, to study IgA tumor targeting potency and to exploit the IgA interesting tropism towards the mucosal epitheliums, the radiolabeled IgA was injected in a colorectal cancer model. This model was promoted, in nude mice, after microinjection of human colorectal cancer cells (WiDr) in cecum. This cell line was chosen considering its CEA expressing level.

METHODS

All chemicals and reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), unless otherwise specified.

- Immunoglobulins production

All Ig were produced by B Cell Design Society (Limoges, France). Monomeric and polymeric anti-CEA (relevant) or anti-peanut (irrelevant) human chimeric IgA1 were synthesized using HAMIGA™ technology (6). For *in vitro* studies, a monomeric and polymeric mixture (mpIgA) was used, whereas for *in vivo* studies, enriched fraction of monomeric (mIgA) or polymeric (pIgA) form was tested separately (purity of 95% and 85% respectively). Anti-CEA human recombinant IgG1 was synthesized after cloning the variable regions of heavy and light chains of anti-CEA human chimeric IgA1. It was then produced in Human Embryonic Kidney cells (HEK 293-6E, NRC, Canada). All antibodies were both purified by affinity chromatography using a Tricorn Column 5/100 resin Protein A-Sepharose at a flow rate of 1.0 mL/min (GE Healthcare, US), eluted with glycine (0.1 M pH 2.7) equilibrated in Tris/base (1.0 M). Subsequently, IgA and IgG were dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS) by centrifugation (1000 × g, 15 min) using Amicon 30 kDa (Millipore, France). Protein concentrations were determined, before and after radiolabeling, using bicinchoninic assay kits Micro BC Assay® (Fisher Scientific, France), using Bovine Serum Albumine (BSA) as standard with quantification limits of 2.5 and 100 µg/mL.

- Cell culture

Two human colorectal cell lines were used: WiDr a primary adenocarcinoma of the rectosigmoid (16) and DLD1 a colorectal glandular carcinoma (17). WiDr, CEA-expressing cells, and DLD1, CEA-negative cells (18) were purchased from ATCC (VA, USA). The two cell lines were routinely grown in RPMI and in minimum essential medium respectively, supplemented with 10% fetal calf serum, 1% sodium pyruvate, 1% penicillin (100 U/mL) - streptomycin (100 µg/mL). For WiDr, medium was also supplemented with 1% glutamine and 1% nonessential amino acids.

- Immunoglobulins radiolabeling with $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

The radiolabeling method used was previously described (13). Briefly, the first step was the thiol-derivatization of Ig with 2-iminothiolane. 0.5 to 2.2 nmol IgA and IgG (300 µL in PBS) were incubated with 2-IT (3.8 µM, 25°C, 120 min). Solutions were purified by size exclusion chromatography. The number of thiol groups was determined with a micromethod using Ellman's reagent (5.5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB). The second step was the synthesis of the tricarbonyl precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. 0.8-1 mL of freshly eluted $[\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4]$ (CisBio, France) in fixed activities (2220-3700 MBq) was added to IsoLink[®] kit (Covidien, Netherlands), incubated 25 min at 100°C. Radiochemical purity (RCP) analysis was performed by thin-layer chromatography (TLC) with two systems to separate the $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ from free $[^{99m}\text{Tc}]$ -pertechnetate, ^{99m}Tc reduced and hydrolyzed $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_n(\text{H}_2\text{O})_y]$ (Baker Flex Aluminium, MeOH/HCl (95/5 v/v) ; ITLC-SG, MeOH). The ^{99m}Tc -IsoLink[®] labeling yields were superior to 98%. The third and last step was the radiolabeling of native or derivatized Ig with $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. 0.5-2,2 nmol of non-derivatized IgA or derivatized IgA-SH or 1.5 nmol IgG-SH in 300 µL PBS was incubated 120 min (25°C) with 150 µL (148–185 MBq) of a ^{99m}Tc -tricarbonyl solution, previously neutralized to pH 7.0 (0.5 M HCl). RCP was determined by TLC with ITLC-SG/NaCl 0.9%.

- *In vitro* stability of ^{99m}Tc -IgA-SH

Stability of radiolabeled IgA-SH was checked for 24h in PBS (4°C and 25°C) and in murine plasma (1/10, 37°C). Aliquots of 5 µL were analyzed by TLC (ITLC-SG/NaCl 0.9%) at various time points (1h, 2h, 4h, 16h and 24h).

- Structural integrity of ^{99m}Tc -IgA-SH

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed under non-reducing conditions with the native or labeled Ig. Proteins (1.5–10 µg per lane) and molecular weight standards (Bio-Rad) were loaded and resolved with a Mini-Protean TGX Precast Gel using a Bio-Rad (Hercules, CA, USA) apparatus. Proteins were immediately transferred on a PVDF membrane. Membrane was washed, blocked with a 3% milk phosphate buffer and incubated (90 min, 25°C) in diluted primary antibody solution (1/1000, goat antihuman IgA-horseradish peroxidase; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). Membrane signals were revealed with a diaminobenzidine (DAB) substrate.

- Affinity of ^{99m}Tc-IgA-SH

Binding affinity was evaluated by two complementary methods: in plate with coated CEA antigen and directly on cells expressing CEA antigen.

Binding affinity by RadioImmunoAssay (RIA)

To evaluate anti-CEA IgA binding to human CEA, removable-well plates were coated with 1 µg/well of CEA antigen (Abcys SA, Courtaboeuf, France) and incubated (overnight, 4°C) in PBS pH 7.4. Then, they were blocked with PBS-gelatin 2% (1h, 37°C). Radiolabeled IgA relevant (anti-CEA IgA) or irrelevant (anti-peanut IgA) (100 µl, 0.5-16 µg/mL) were added in two series to antigen coated wells. The first series was diluted in PBS-gelatin 0.2% and the second in PBS-gelatin 0.2% containing unlabeled antibody at 500 µg/mL (non-specific binding). Plates were incubated (2 h, 37°C) and washed three times with PBS pH 7.4. Radioactivity contained in wells was determined by gamma counting (Packard Cobra 5003, Canberra Company, Germany).

Binding affinity on cells

Saturation binding studies were assessed according to the method of Lindmo *et al* (19)(20). ^{99m}Tc-IgA-SH binding affinity experiments were performed on WiDr (anti-CEA and anti-peanut IgA) and DLD1 (anti-CEA IgA). Samples of cells (1 million cells / 250 µL) were first pre-incubated (1/250, 25°C, 30 min) with an anti-mouse CD16/CD32 IgG2Bk (BD Biosciences, Pharmingen, India) to block Fc receptor. They were then pre-incubated with PBS-BSA 3% or with unlabeled antibody (final concentration of 100 µg/mL in PBS-BSA 3%) to saturate the binding sites for nonspecific binding determination (25°C, 90 min). Then, duplicate samples were incubated with ^{99m}Tc-IgA-SH increasing concentrations (125 µL, 0,1

to 10-13 µg/mL). After incubation (2h, 25°C) with continuous rotation, the cells were filtered using Manifold® (Millipore, Molsheim, France) and washed with PBS. Filter radioactivity was evaluated with a gamma-counter.

Affinity data analysis

For wells and cell-binding affinity studies, specific binding was evaluated by subtracting nonspecific binding (determined after incubation with unlabeled antibody) from total binding. Data analysis was performed using a Scatchard plot of binding of ^{99m}Tc-anti-CEA IgA-SH, and the dissociation constant (Kd), the number of antibody binding sites/wells or cells, and the B_{max} of ^{99m}Tc-anti-CEA IgA-SH were determined.

- Biodistribution of ^{99m}Tc-anti-CEA IgA-SH and ^{99m}Tc-anti-CEA IgG-SH in normal mice

All *in vivo* experiments were performed in accordance with animal ethical rules and all efforts were made to minimize suffering. The protocol was approved by Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin (CREEAL). Biodistribution experiments were carried out in 7-week-old male BALB/c mice (Charles River Laboratories, Chatillon-sur-Chalaronne, L'Arbresle Cedex). ^{99m}Tc-IgA-SH monomeric or ^{99m}Tc-IgA-SH polymeric or ^{99m}Tc-IgG-SH (40 MBq, 170 µg of antibodies) was injected intravenously (tail vein). Animals were euthanized, by anesthesia and cervical dislocation, at different times after administration (4h, 8h, 18h, 24h, 48h post-injection). Selected tissues were excised, rinsed, and weighed, and their radioactivity levels were measured with a gamma-counter. Uptake of radioactivity in these organs was expressed as a percentage of the injected dose per gram of tissue (% ID/g) after correcting for radioactive decay for each time point. Blood cells, plasma, and feces were also collected and measured. Feces correspond to fecal matter collected in the small intestine and in the colon during dissection.

- Biodistribution and tumor uptake of ^{99m}Tc-anti-CEA pIgA-SH in nude mice bearing Human Colon Carcinoma

• *Direct orthotopic cell microinjection (OCMI) according to Cespedes et al. method (21)*

Seven-week-old female nude mice (athymic nu/nu, Harlan Laboratories, Gannat, France) were anesthetized with ketamine (80 mg/kg; Imalgène (100 mg/mL), Merial, Lyon, France) and xylazine (9.6 µg/kg; Rompun 2%, Bayer, Lyon, France) to exteriorize their cecum by a laparotomy. $2 \cdot 10^5$ WiDr cells, suspended in 10 µL of PBS in a sterile micropipette (30 G needle, 30 µL syringe) were slowly injected between the mucosa and the *muscularis externa* layers of the cecal wall, under a binocular lens, with an approximate 30° angle. After injection, the cecum was extensively washed by sterile PBS before reintroduction in the abdominal cavity. The laparotomy was closed by surgical suture. Animals were weight each day. If animals demonstrated clinical alteration or weight loss, animals were euthanized, by anesthesia and cervical dislocation.

Biodistribution and tumor uptake

6 weeks after OCMI procedure, animals were divided into 2 groups. The first group ($n = 6$) received intravenously 170 µg ^{99m}Tc -anti-CEA pIgA-SH and the second ($n = 6$), 170 µg irrelevant ^{99m}Tc -pIgA-SH. All the mice were subjected to an activity of 35-37 MBq. Nude mice controls received the same ^{99m}Tc -anti-CEA pIgA-SH. Animals were euthanized, by anesthesia and cervical dislocation, at 4h and 8h after administration. Finally, the procedure described in biodistribution studies in normal mice was applied. Furthermore, cecums and lungs were fixed with buffered formalin during radioactive decay (48 h).

Histological analysis of human colorectal orthotopic grafts

Mice organs were transferred to 4% formol and include in paraffin after an automated cycling of deshydration system (Leica, ASP200S). 4 µm sections were prepared using microtome. For histological analysis, slides were stained with hematoxylin, eosin and safran (HES analysis) or with alcian blue (secretion mucus analysis). For vascularization analysis, CD31 staining was made using VENTANA robot from the Pathology department of Limoges University Hospital. In each case, a pathologist has been solicited to interpret staining.

- Statistical analysis

Statistical analyses were made by applying the nonparametric Kruskal Wallis for antibodies comparison. Tests were made using the Stview software (ver. 5.0 ; SAS Institute, Cary, NC, USA). A p value < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

RESULTS

- IgA radiolabeling and ^{99m}Tc -IgA-SH *in vitro* stability

To optimize IgA radiolabeling with the tricarbonyl core, increasing antibody quantities and derivatization with 2-IT were tested (Fig. 1). Native and functionalized IgA radiolabeling yields were correlated with IgA amounts. The maximal quantity usable prior to IgA precipitation (maximum concentration = 2 mg/mL) is 2.2 nmol of IgA. With this amount of native IgA only 45% of RCP was reached. With IgA derivatized, much higher yields were achieved (RCP = 98%) for this maximum IgA quantity and a RCP > 85% was obtained from only 1 nmol IgA. These results confirm that derivatization of IgA is necessary to obtain high radiolabeling RCP. After determining sulfhydryl groups, with the micromethod and Ellman's reagent, a correlation between radiolabeling yields and the number of thiol moieties on IgA was clearly found, confirming derivatization interest (data not shown). A number of sulfhydryl groups grafted per IgA on average 1.7 ± 0.4 ($n = 3$) was obtained with derivatized IgA, whereas with native IgA, the number was below the limit of quantification. With these optimized conditions (1.4 nmol of derivatized IgA), radiolabeling yields $> 96.6 \pm 2.1\%$ ($n = 13$) were obtained. The specific activity corresponded to 115 MBq/nmol (511 MBq/mg). Stability of ^{99m}Tc -IgA-SH was performed during 24 h in PBS with storage at 4°C or 25°C and in murine serum (1/10 dilution) at 37°C. In PBS, no appreciable loss in RCP was observed (at 24h: $\Delta\text{RCP} = 4\%$ and 8% , at 4°C or 25°C, respectively). However, after incubation in murine serum (1/10 dilution) at 37°C, a slow decrease of radiolabeled IgA RCP was obtained (at 18h and 24h: $\Delta\text{RCP} = 13\%$ and 23% , respectively).

- Integrity of ^{99m}Tc -IgA-SH

To demonstrate full preservation of the molecular integrity during the radiolabeling process, unlabeled and radiolabeled IgA samples of monomeric and polymeric mixture (mpIgA) were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 2).

Western blot profiles of mpIgA show major bands at 150 kDa and 300-400 kDa corresponding to the molecular weight of monomeric and polymeric forms respectively for both unlabeled IgA (lanes 2–3) and radiolabeled IgA (lanes 4–5). As expected, the structure

of IgA was preserved after radiolabeling; no low molecular weight band corresponding to free heavy chain release appeared for either radiolabeled antibody. A slight decrease in intensity was observed between unlabeled and radiolabeled antibodies due to Ig loss during purification after incubation with 2-IT.

- Affinity of ^{99m}Tc -IgA-SH

Immunoaffinity evaluation by RIA allowed us to observe that the radiolabeled anti-CEA IgA-SH have a high affinity for the target antigen (Fig. 3A). Specific binding of ^{99m}Tc -anti-CEA IgA-SH was confirmed by displacement with unlabeled anti-CEA IgA. The dissociation constant and the maximum number of antibody binding sites/bound per well of ^{99m}Tc -anti-CEA IgA-SH were estimated using a saturation binding assay and a Scatchard analysis. The assays provided a value of 20.3 nM for the Kd and 3.2 nM for the binding capacities (B_{max}). Specific binding is also confirmed by the lack of fixation of an irrelevant IgA (^{99m}Tc anti-peanut IgA-SH).

Immunoaffinity of ^{99m}Tc anti-CEA IgA-SH was also assessed by using a saturation binding assay on a colon adenocarcinoma cell line, WiDr cells, which expressed fully folded antigen (Fig. 3B). This assay showed a specific saturable binding. Using the data obtained and the Scatchard representation, the calculated Kd and B_{max} were 30.5 nM and 1.2 nM, respectively. Controls were performed with ^{99m}Tc -anti-CEA IgA-SH on non-expressing CEA cells (DLD1, another colon adenocarcinoma cell line) and with irrelevant IgA on WiDr cells. As expected, no binding was observed under either of these conditions.

- Biodistribution of ^{99m}Tc -anti-CEA IgA-SH and ^{99m}Tc -anti-CEA IgG-SH in normal mice

The results of the *in vivo* biodistribution at 4h, 8h, 18h, 24h and 48h of ^{99m}Tc -anti-CEA polymeric IgA-SH, ^{99m}Tc -anti-CEA monomeric IgA-SH and ^{99m}Tc -anti-CEA IgG-SH in healthy BALB/c mice are presented for all studied organs in Table 1, 2 and 3 respectively and for selected organs in Figure 4.

Global analysis (whole organs studied) of radioactivity uptake (% ID/g) showed significant ($p < 0.002$) difference between the three Ig at 8h, 24h and 48h. Whereas no significant difference was observed in global analysis at 4h between the three Ig, an important difference radioactivity uptake was observed in cecum and in feces. At this early time, high uptake was

measured in cecum and in feces for ^{99m}Tc -anti-CEA pIgA-SH (27.0 ± 4.9 %ID/g and 30.6 ± 9.3 %ID/g respectively) and to a lesser extent for ^{99m}Tc -anti-CEA mIgA-SH (16.7 ± 4.0 / 14.3 ± 4.6), whereas uptake was weaker for ^{99m}Tc -anti-CEA IgG-SH (6.1 ± 3.6 / 5.2 ± 3.8). Eight hours post-injection, significant differences between the three Ig were observed in plasma and in blood-rich tissues (heart, spleen, lungs). Higher radioactivity was observed with IgG (in plasma: 29.3 ± 8.0 %ID/g and 12.1 ± 4.1 %ID/g at 8h and 24h, respectively), than with mIgA (14.3 ± 1.5 / 4.7 ± 1.6) and pIgA (10.0 ± 1.3 / 2.8 ± 1.9). Furthermore, beyond 18h, a strong radioactivity uptake was observed for mIgA in spleen (at 18h: 52.6 ± 14.1 %ID/g and at 48h: 41.4 ± 8.7 %ID/g), whereas this uptake was not present for pIgA and IgG. High radioactivity uptake was also observed in liver for the three Ig. This uptake was more important for pIgA at 4h, but the difference between the three Ig was not significant.

- Biodistribution of ^{99m}Tc -anti-CEA IgA-SH and ^{99m}Tc -irrelevant IgA-SH in a mouse colorectal tumor model

In mouse with colorectal orthotopic grafts biodistribution studies of ^{99m}Tc -anti-CEA pIgA-SH at 4h or 8h are presented in [table 4](#) and compared with irrelevant IgA (^{99m}Tc -anti-peanut pIgA-SH) and with healthy nude mice. All mice included in the studies had a macroscopic colorectal tumors in cecum observed after dissection for biodistribution studies. A notable accumulation of radioactivity was found in « empty » tumoral cecum (15.8 ± 5.5 %ID/g and 18.5 ± 8.5 %ID/g at 4h and 8h, respectively), but this radioactivity uptake was not significantly different from the two controls (^{99m}Tc -irrelevant pIgA-SH: 16.7 ± 6.9 %ID/g and 11.5 ± 6.5 %ID/g; nude mice control: 7.9 ± 2.5 %ID/g and 19.9 ± 1.4 %ID/g). The pattern of distribution between the different organs in mouse colorectal tumor model was similar to that observed in healthy mouse, except a significant uptake in lungs for ^{99m}Tc -anti-CEA pIgA-SH, as soon as 4h (at 4h: 42.8 ± 59.4 %ID/g, at 8h: 97.6 ± 29.5 %ID/g). This uptake was significantly different ($p<0.001$) from the low fixation observed in the lungs at 4h or 8h after injection of irrelevant ^{99m}Tc -pIgA-SH and also in nude mice control. For few animals ($n = 1$ to 3 depending on group), a tumor was present in the peritoneal cavity placed opposite the injection site. When this tumor existed, uptake was measured and was different between anti-CEA pIgA and irrelevant pIgA (at 4h: 2.6 ± 1.0 %ID/g and 1.6 ± 0.4 %ID/g respectively).

- Pathological analysis of cecum and lungs

Cecum and lungs in mouse colorectal tumor model have been sliced and analyzed by coloration techniques and immunohistochemistry (Fig. 5). The HES analysis has confirmed the presence of tumor mass in the cecal wall, in particular in sub-mucosa (Fig. 5A and B). Moreover, tumor cells were able to secrete mucus revealed with Alcian blue staining (black arrows in Fig. 5C). Tumors were vascularized and CD31 positive endothelial cells were detected within tumor mass (white arrows in Fig. 5D). This data confirmed that this model mimics an adenocarcinoma. CD31 analysis within tumor mass revealed that tumor cells were present within tumor vessels (black arrows in Fig. 5E and F). HES analysis in lungs revealed the presence of thick and large cells within pulmonary parenchyma corresponding to lungs metastasis (Fig. 5G).

Besides the various presented staining, CEA analysis by immunohistochemistry was realized in cecum and lungs. However, a strong staining was observed in the whole tissue, not allowing differentiating tumor cells from normal cells (data not shown).

DISCUSSION

This study focuses on IgA, a class of Ig to date under-studied in comparison with IgG. Today IgG is the most used antibody in therapy and in clinical trials. However, some functional limitations of IgG such as inadequate tissue accessibility and pharmacokinetics or impaired interactions with effector cells had been highlighted (Beckman 2007). IgA could represent a promising alternative to IgG particularly to target mucosal tumors, considering that IgA constitutes the major Ig class at the mucosal surfaces.

This work reports anti-CEA IgA radiolabeling with ^{99m}Tc to evaluate IgA biodistribution in comparison to IgG and finally to estimate IgA tumor targeting potency.

To develop a soft ^{99m}Tc radiolabeling method applicable to IgA, a breakable antibody and available only in limited quantities, we selected the method initially developed by Biechlin *et al.* (12) and optimized and evaluated by Carpenet *et al.* (13). This method involved two steps: Ig derivatization with a synthon, the 2-Iminothiolane, and Ig-SH radiolabeling by an indirect method using the ^{99m}Tc -tricarbonyl core. The ^{99m}Tc -tricarbonyl core is a complex with a high kinetic stability and an excellent precursor to radiolabel various biomolecules, especially immunoglobulins. To functionalize Ig by adding SH- groups under milder conditions, and to obtain high radiolabeling yields, the 2-IT synthon was used. Our results confirmed the

significant additional value of the derivatization step for IgA, as previously observed for IgG (14), allowing to reach RCP > 95%. High RCP enable radiolabeled Ig administration, without purification additional step. Stability of radiolabeled IgA was checked over 24 h in PBS and in murine plasma and showed that IgA radiolabeling was stable, even if after incubation in murine plasma, the RCP decreased more strongly, suggesting a slight degradation in plasma. Our stability results were also consistent with published data on Ig studies with tricarbonyl core (loss of 10-15 %) (22)(23) or direct labeling after disulfide bond reduction (24). Western blot analyses indicated that radiolabeling process did not alter IgA. Affinity studies confirmed that radiolabeled IgA keep a good binding affinity ($K_d \approx 25\text{nM}$). Concordant K_d were obtained with the two affinity determination methods. All these *in vitro* studies suggest that radiolabeling preserve IgA functionality.

Biodistribution studies in healthy mice have compared radiolabeled pIgA, mIgA and IgG, all directed against CEA antigen. At different point times, the biodistribution data were significantly different. The mIgA presented an intermediate fixation profiles between pIgA and IgG, except in spleen. This study confirms IgA strong and fast tropism for cecum at *lamina propria* as described in the literature (25). In comparison with IgG, a high and quick uptake (at 4h) was observed in cecum and feces for pIgA and, to a lesser extent, for mIgA. Rapid elimination (4h) in feces was observed, whereas, for IgG, radioactivity was maximal in feces at 24h. Significant differences between pIgA/mIgA and IgG were also observed in plasma and blood-rich tissues. The rapid plasma radioactivity decrease for mIgA and pIgA was associated in particular with their rapid elimination, as observed in feces, and correlated also with their shorter biological half-life (26). In contrast, IgG is characterized by a relatively long biological half-life in the bloodstream. Unlike IgA, IgG bind to the neonatal receptor FcRn, expressed on vascular endothelial cells, macrophages and monocytes. This interaction could be one explanation of the IgG longer serum half-life (27). Concerning the liver, a high uptake was observed for the three Ig isotypes studied. This uptake is explained by Ig metabolism. For IgA, a receptor called ASGP (asialoglycoprotein receptor), present on the hepatocytes surface, could also be involved. ASGP is known to play an important role in the plasma clearance of IgA (28).

To evaluate IgA targeting potency, a colorectal cancer tumor model was promoted. Pathological microscopic analysis revealed a structural glandular architecture of the tumor grafted and the presence of muco-secretions. WiDr cells invaded the normal cecum in the

muscle from the outside inward, from muscle to mucous membrane. Depending on the delay after direct orthotopic cell microinjection, different stages of CCR have been observed from localized tumors to metastasis in lungs. Immunohistochemical analysis in tumor revealed that tumor cells were present within tumor vessels, suggesting cellular dissemination by the vascular system. All these criteria led us to consider that colorectal orthotopic grafts were useful models of human colorectal cancer, due to they shared the same characteristics as human tumors. Surprisingly, no significant difference uptake in cecum was observed after injection of radiolabeled anti-CEA IgA, irrelevant IgA or in healthy nude mice. Tumor implanted in the cecum externa layers progresses by infiltrating the whole cecum, without cleavage plane to resect only tumor tissue to count it solely. Cecal tumors were partly necrotic and weakly vascularized in some regions. Furthermore, polymeric IgA, whatever their antigenicity, have a strong tropism for cecal mucosa. Finally, tumor to background ratio was not optimal and radioactivity determination of the whole cecum has probably hamper the tumor specific signal detection. In a interesting way, important anti-CEA pIgA uptake was observed in lungs. This uptake is significantly different from uptake obtained after injection of radiolabeled irrelevant IgA or in healthy nude mice. This result is consistent with lungs metastasis presence proved by pathological analysis. Even if no significant uptake has been highlighted in tumoral cecum with anti-CEA pIgA, this antibody allowed targeting lungs metastasis derived from the initial colorectal tumor. This uptake is also probably favored by IgA tropism for mucosal epitheliums (25).

CONCLUSION

Monomeric and polymeric IgA were efficiently radiolabeled with Technetium 99m by indirect method, using limited antibody amounts. *In vitro* studies showed that IgA radiolabeling was stable and did not alter IgA functionality. Biodistribution studies in normal BALB/c mice of ^{99m}Tc -anti-CEA mIgA-SH and ^{99m}Tc -anti-CEA pIgA-SH confirmed their shorter serum half-life and the fast and strong mucosal tropism of pIgA and to a lesser extent mIgA. High lungs uptake of ^{99m}Tc -anti-CEA pIgA-SH in mice tumor model suggested efficient targeting potency of pIgA, even if significant specific uptake in cecum was not observed. In a promosing way, as secretory IgA are resistant to intestinal degradation, it would be interesting to explore SIgA biodistribution after oral administration. SIgA reverse

transcytosis, mediated by epithelial M cells, remains under-studied. In human, several receptors seem to be involved (Dectin-1, DC-SIGN (29) ; CD71 (30)). Oral administration of SIgA may serve as a vehicle pathway for delivering radiolabeled antibody through mucosal epithelial towards *lamina propria*.

Finally, this work is a first step to develop IgA modalities in diagnostic imaging and mandatory to envisage, in a near future, IgA therapeutic strategies targeting tumor in mucosal epitheliums.

ACKNOWLEDGMENTS

Some of the work presented here was supported in part by Comité d'Orientation de la Recherche sur le Cancer (CORC) en Limousin. The authors are grateful to Mallinckrodt Medical for providing IsoLink[®] for the work. We would like to thank F. Dalmay (INSERM UMR-S 1094 NET) for assistance with statistical analyses and Pathology department of Limoges University Hospital for assistance with histological analysis.

BIBLIOGRAPHY

1. Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S41–52.
2. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*. 2003;21:807–39.
3. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*. 2005 Sep;23(9):1147–57.
4. Yoo EM, Morrison SL. IgA: An immune glycoprotein. *Clinical Immunology*. 2005 Jul;116(1):3–10.
5. Fagarasan S, Kinoshita K, Muramatsu M, Ikuta K, Honjo T. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature*. 2001 Oct 11;413(6856):639–43.
6. Ducheux S, Amin R, Cogné N, Delpy L, Sirac C, Pascal V, et al. Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Feb

16;107(7):3064–9.

7. Richter WS, Ivancevic V, Meller J, Lang O, Le Guludec D, Szilvazi I, et al. ^{99m}Tc -besilesomab (Scintimun) in peripheral osteomyelitis: comparison with ^{99m}Tc -labelled white blood cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011 May;38(5):899–910.
8. Misri R, Saatchi K, Ng SSW, Kumar U, Häfeli UO. Evaluation of ^{111}In labeled antibodies for SPECT imaging of mesothelin expressing tumors. *Nuclear Medicine and Biology*. 2011 Aug;38(6):885–96.
9. Koehler L, Gagnon K, McQuarrie S, Wuest F. Iodine-124: a promising positron emitter for organic PET chemistry. *Molecules*. 2010 Apr;15(4):2686–718.
10. Garmestani K, Milenic DE, Plascjak PS, Brechbiel MW. A new and convenient method for purification of ^{86}Y using a Sr(II) selective resin and comparison of biodistribution of ^{86}Y and ^{111}In labeled Herceptin. *Nucl Med Biol*. 2002 Jul;29(5):599–606.
11. Camacho X, García MF, Calzada V, Fernández M, Chabalgoity JA, Moreno M, et al. [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$]-radiolabeled bevacizumab: in vitro and in vivo evaluation in a melanoma model. *Oncology*. 2013;84(4):200–9.
12. Biechlin M-L, d'Hardemare A du M, Fraysse M, Gilly F-N, Bonmartin A. Improvement in radiolabelling proteins with the ^{99m}Tc -tricarbonyl-core [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$] $^+$, by thiol-derivatization with iminothiolane: application to γ -globulins and annexin V. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2005;48(12):873–85.
13. Carpenet H, Cuvillier A, Monteil J, Quelven I. Anti-CD20 Immunoglobulin G Radiolabeling with a ^{99m}Tc -Tricarbonyl Core: In Vitro and In Vivo Evaluations. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0139835.
14. Brämswig KH, Knittelfelder R, Gruber S, Untersmayr E, Riemer AB, Szalai K, et al. Immunization with Mimotopes Prevents Growth of Carcinoembryonic Antigen-Positive Tumors in BALB/C Mice. *Clin Cancer Res*. 2007 Nov 1;13(21):6501–8.
15. Pakdel A, Naghibalhossaini F, Mokaram P, Mansooreh Jaberipour M, Hosseini A. Regulation of carcinoembryonic antigen release from colorectal cancer cells. *Clinical Biochemistry*. 2011 Sep;44(13, Supplement):S68–9.
16. Flatmark K, Mælandsmo GM, Martinsen M, Rasmussen H, Fodstad Ø. Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. *European Journal of Cancer*. 2004 Jul;40(10):1593–8.
17. Maréchal R, De Schutter J, Nagy N, Demetter P, Lemmers A, Devière J, et al. Putative

contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2010 Jun 30;10:340.

18. Guadagni F, Witt PL, Robbins PF, Schlom J, Greiner JW. Regulation of carcinoembryonic antigen expression in different human colorectal tumor cells by interferon-gamma. *Cancer Res*. 1990 Oct 1;50(19):6248–55.
19. Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, Fedorko J, Bunn PA Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods*. 1984 Aug 3;72(1):77–89.
20. Lindmo T, Bunn PA Jr. Determination of the true immunoreactive fraction of monoclonal antibodies after radiolabeling. *Meth Enzymol*. 1986;121:678–91.
21. Céspedes MV, Espina C, García-Cabezas MA, Trias M, Boluda A, Gómez del Pulgar MT, et al. Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. *Am J Pathol*. 2007 Mar;170(3):1077–85.
22. Stopar TG, Mlinaric-Rascan I, Fettich J, Hojker S, Mather SJ. (99m)Tc-rituximab radiolabelled by photo-activation: a new non-Hodgkin's lymphoma imaging agent. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006 Jan;33(1):53–9.
23. Dias CR, Jeger S, Osso JA Jr, Müller C, De Pasquale C, Hohn A, et al. Radiolabeling of rituximab with (188)Re and (99m)Tc using the tricarbonyl technology. *Nucl Med Biol*. 2011 Jan;38(1):19–28.
24. Malviya G, Anzola KL, Podestà E, Laganà 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*. 2012 Oct;14(5):637–46.
25. van Egmond M, Damen CA, van Spriel AB, Vidarsson G, van Garderen E, van de Winkel JG. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol*. 2001 Apr;22(4):205–11.
26. Monteiro RC. Role of IgA and IgA fc receptors in inflammation. *J Clin Immunol*. 2010 Jan;30(1):1–9.
27. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2007 Sep;7(9):715–25.
28. Rifai A, Fadden K, Morrison SL, Chintalacheruvu KR. The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes. *J Exp Med*. 2000 Jun 19;191(12):2171–82.
29. Rochereau N, Drocourt D, Perouzel E, Pavot V, Redelinguys P, Brown GD, et al.

Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol.* 2013 Sep;11(9):e1001658.

30. Lebreton C, Ménard S, Abed J, Moura IC, Coppo R, Dugave C, et al. Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. *Gastroenterology.* 2012 Sep;143(3):698–707.e1–4.

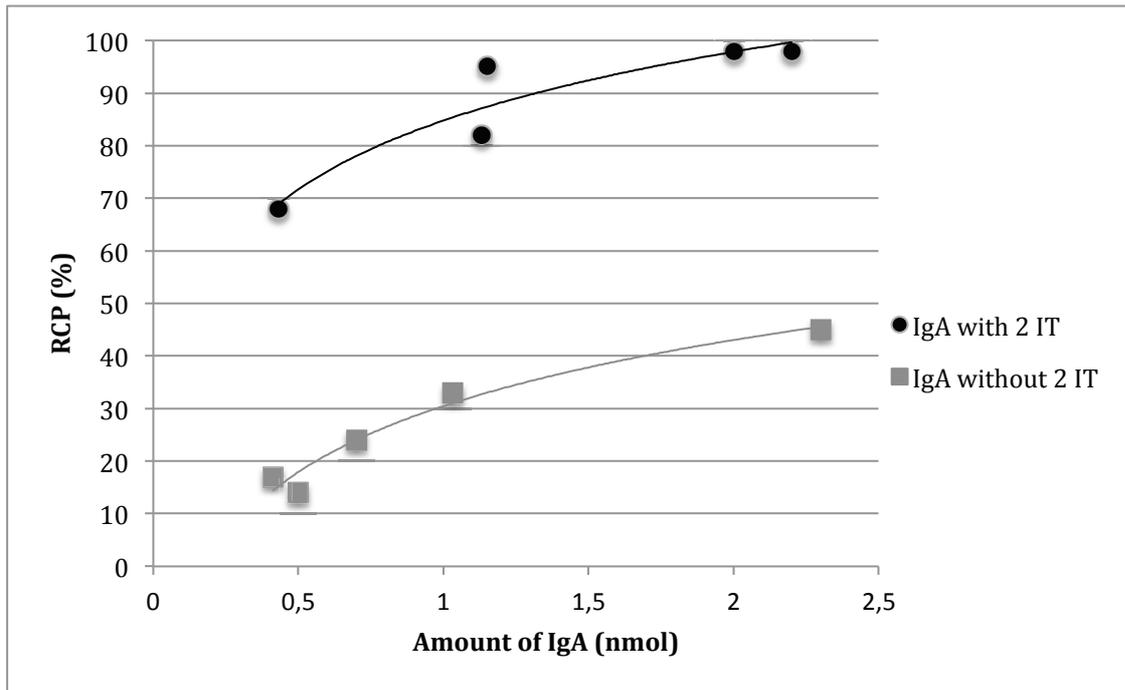


Figure 1 : Comparison of native (grey) and 2-IT derivatized (black) radiolabeled IgA yields depending on IgA amount (nmol).

RCP were performed by ITLC-SG/normal saline.

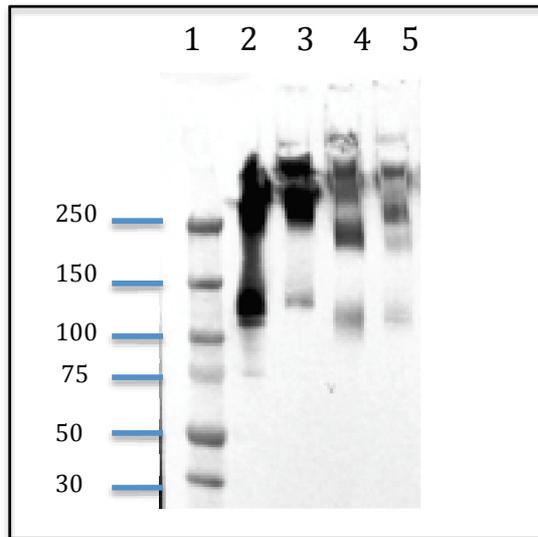


Figure 2 : Comparison of unlabeled and radiolabeled anti-CEA mIgA, and of unlabeled and radiolabeled irrelevant mIgA molecular structure evaluated by Western blot.

Molecular weights in kDa are specified on the left and well numbers on the top : 1. Molecular weight Marker, 2. Unlabeled anti-CEA mIgA-SH (monomeric \approx 150 kDa and polymeric $>$ 250 kDa) (1.5 μ g), 3. Unlabeled irrelevant mIgA-SH (1.5 μ g), 4. Radiolabeled anti-CEA mIgA (1.5 μ g), 5. Radiolabeled irrelevant mIgA-SH (1.5 μ g)

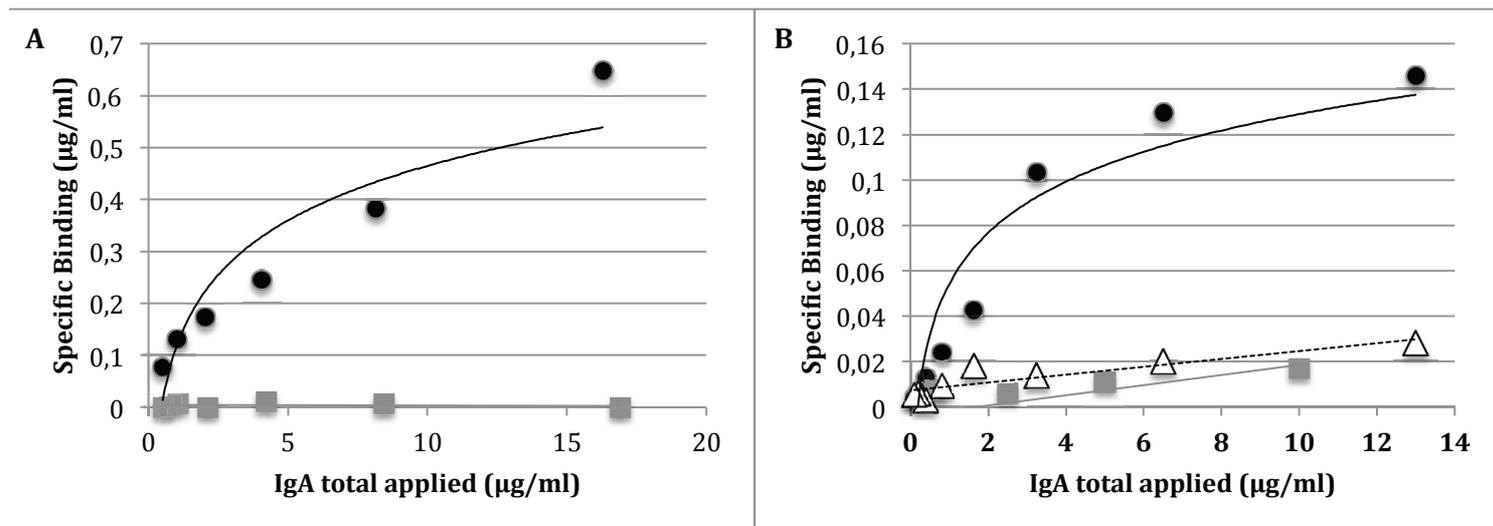


Figure 3: *In vitro* binding of ^{99m}Tc -anti-CEA IgA-SH and ^{99m}Tc -irrelevant (anti-peanut) IgA-SH.

A. By RIA protocol

(●) specific binding of ^{99m}Tc -anti-CEA IgA-SH

(■) specific binding of ^{99m}Tc -irrelevant IgA-SH

B. On cells

(●) specific binding of ^{99m}Tc -anti-CEA IgA-SH on WiDr cells (CEA pos).

(■) specific binding of ^{99m}Tc -anti-CEA IgA-SH on DLD1 cells (CEA neg).

(Δ) specific binding of ^{99m}Tc -irrelevant IgA-SH on WiDr cells.

Table 1: Biodistribution of ^{99m}Tc -anti-CEA IgA polymeric-SH in healthy Balb-c mice at 4, 8, 18, 24 and 48h expressed as the percentage of injected (IV) dose per gram %ID/g (Values represent the mean \pm S.D. of the %ID/g).

	4h (n=4)	8h (n=4)	18h (n=4)	24h (n=8)	48h (n=4)
Heart	5.4 \pm 2.5	3.0 \pm 0.3	2.4 \pm 0.1	1.9 \pm 0.8	1.2 \pm 0.4
Brain	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.04	0.1 \pm 0.03	0.1 \pm 0.04	0.05 \pm 0.01
Lungs	7.8 \pm 2.7	5.2 \pm 0.7	3.4 \pm 1.1	3.3 \pm 1.1	2.3 \pm 1.0
Kidneys	21.4 \pm 6.9	16.05 \pm 5.1	11.6 \pm 6.1	11.0 \pm 6.6	7.9 \pm 4.6
Spleen	16.5 \pm 6.0	12.2 \pm 3.5	6.9 \pm 2.7	6.5 \pm 1.1	3.9 \pm 1.7
Stomach	2.7 \pm 1.5	1.1 \pm 0.4	1.5 \pm 1.3	0.7 \pm 0.3	0.5 \pm 0.2
Small intestine	5.2 \pm 1.0	3.2 \pm 0.6	1.5 \pm 0.7	1.1 \pm 0.4	0.6 \pm 0.2
Cecum	27.0 \pm 4.9	11.2 \pm 4.5	2.8 \pm 1.7	3.2 \pm 2.1	1.4 \pm 0.7
Colon	6.7 \pm 2.0	3.4 \pm 1.3	1.5 \pm 0.8	1.1 \pm 0.4	0.7 \pm 0.4
Liver	66.4 \pm 19.4	49.0 \pm 18.4	19.2 \pm 3.9	24.4 \pm 11.0	16.9 \pm 7.6
Muscle	1.6 \pm 0.5	1.4 \pm 0.6	0.9 \pm 0.5	0.6 \pm 0.2	0.5 \pm 0.3
Blood cells	3.3 \pm 0.8	2.0 \pm 0.5	4.6 \pm 2.0	2.1 \pm 1.2	1.3 \pm 0.5
Plasma	19.2 \pm 4.3	10.0 \pm 1.3	1.3 \pm 0.5	2.8 \pm 1.9	0.9 \pm 0.4
Feces	30.6 \pm 9.3	6.9 \pm 4.4	3.9 \pm 2.6	2.1 \pm 1.2	0.9 \pm 0.6
Mesenteric Ganglion	4.9 \pm 3.1	3.0 \pm 1.6	1.05 \pm 0.3	1.8 \pm 1.7	0.5 \pm 0.2

Table 2: Biodistribution of ^{99m}Tc -anti-CEA IgA monomeric-SH in healthy Balb-c mice at 4, 8, 18, 24 and 48h expressed as the percentage of injected (IV) dose per gram %ID/g (Values represent the mean \pm S.D. of the %ID/g).

	4h (n=4)	8h (n=4)	18h (n=3)	24h (n=7)	48h (n=4)
Heart	6.0 \pm 0.8	3.4 \pm 0.3	3.4 \pm 1.4	1.7 \pm 0.8	1.6 \pm 0.3
Brain	0.4 \pm 0.06	0.3 \pm 0.04	0.2 \pm 0.1	0.12 \pm 0.04	0.07 \pm 0.02
Lungs	7.8 \pm 1.6	5.3 \pm 0.7	5.8 \pm 3.0	3.4 \pm 1.2	3.0 \pm 1.3
Kidneys	20.0 \pm 4.0	15.8 \pm 6.0	16.2 \pm 9.2	12.1 \pm 6.9	9.8 \pm 3.5
Spleen	27.2 \pm 4.0	18.6 \pm 6.5	52.6 \pm 14.1	34.8 \pm 19.5	41.4 \pm 8.7
Stomach	2.7 \pm 1.7	0.9 \pm 0.4	0.9 \pm 0.7	1.0 \pm 0.7	0.8 \pm 0.5
Small intestine	1.9 \pm 1.8	3.1 \pm 0.5	2.2 \pm 1.2	1.9 \pm 0.6	1.5 \pm 0.4
Cecum	16.7 \pm 4.0	9.8 \pm 4.8	3.9 \pm 2.2	3.0 \pm 1.3	2.1 \pm 1.3
Colon	4.7 \pm 1.2	3.0 \pm 1.3	1.8 \pm 1.0	1.9 \pm 1.1	2.8 \pm 2.7
Liver	50.6 \pm 12.4	34.7 \pm 11.5	32.3 \pm 8.7	24.1 \pm 8.1	21.3 \pm 4.4
Muscle	1.7 \pm 0.6	1.5 \pm 0.8	1.7 \pm 1.2	0.8 \pm 0.6	0.5 \pm 0.1
Blood cells	4.6 \pm 2.4	3.1 \pm 1.7	1.5 \pm 0.8	1.3 \pm 0.7	2.2 \pm 0.6
Plasma	29.6 \pm 5.7	14.3 \pm 1.5	6.5 \pm 1.8	4.7 \pm 1.6	2.0 \pm 0.9
Feces	14.3 \pm 4.6	14.1 \pm 13.9	4.7 \pm 2.9	2.4 \pm 1.5	2.6 \pm 1.9
Mesenteric Ganglion	4.5 \pm 2.9	3.0 \pm 0.7	2.0 \pm 0.8	1.4 \pm 0.3	0.8 \pm 0.2

Table 3: Biodistribution of ^{99m}Tc -anti-CEA IgG-SH in healthy Balb-c mice at 4, 8, 18, 24 and 48h expressed as the percentage of injected (IV) dose per gram %ID/g (Values represent the mean \pm S.D. of the %ID/g).

	4h (n=4)	8h (n=4)	18h (n=4)	24h (n=4)	48h (n=4)
Heart	9.8 \pm 4.8	8.9 \pm 1.7	4.0 \pm 2.1	3.6 \pm 1.6	2.7 \pm 1.3
Brain	0.6 \pm 0.4	0.6 \pm 0.07	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.08	0.2 \pm 0.1
Lungs	16.5 \pm 9.3	16.0 \pm 6.0	7.9 \pm 3.4	6.9 \pm 2.0	5.0 \pm 1.3
Kidneys	28.2 \pm 13.9	29.5 \pm 3.3	16.3 \pm 7.2	15.6 \pm 6.6	10.9 \pm 5.0
Spleen	37.6 \pm 16.2	28.3 \pm 8.5	18.9 \pm 13.2	17.9 \pm 8.7	12.6 \pm 4.2
Stomach	3.3 \pm 2.7	3.9 \pm 0.3	1.3 \pm 0.4	1.6 \pm 0.7	1.1 \pm 0.3
Small intestine	5.3 \pm 2.3	4.9 \pm 0.7	3.5 \pm 1.6	3.2 \pm 0.6	1.6 \pm 0.4
Cecum	6.1 \pm 3.6	7.9 \pm 1.9	3.7 \pm 2.1	4.4 \pm 1.4	2.0 \pm 0.3
Colon	3.8 \pm 2.0	4.5 \pm 0.2	2.2 \pm 1.0	3.2 \pm 1.2	1.5 \pm 0.5
Liver	29.8 \pm 16.3	45.5 \pm 16.1	18.6 \pm 7.3	21.4 \pm 4.5	15.7 \pm 2.0
Muscle	1.6 \pm 1.0	3.3 \pm 0.9	1.2 \pm 0.7	1.2 \pm 0.7	0.9 \pm 0.5
Blood cells	6.6 \pm 2.7	6.8 \pm 4.5	1.9 \pm 0.9	1.6 \pm 0.5	1.6 \pm 0.7
Plasma	45.3 \pm 21.0	29.3 \pm 8.0	13.7 \pm 7.9	12.1 \pm 4.1	8.0 \pm 1.8
Feces	5.2 \pm 3.7	6.5 \pm 2.5	2.9 \pm 0.9	8.1 \pm 2.7	1.8 \pm 0.5
Mesenteric Ganglion	3.6 \pm 3.6	5.9 \pm 1.9	2.1 \pm 1.4	2.8 \pm 2.3	2.0 \pm 1.5

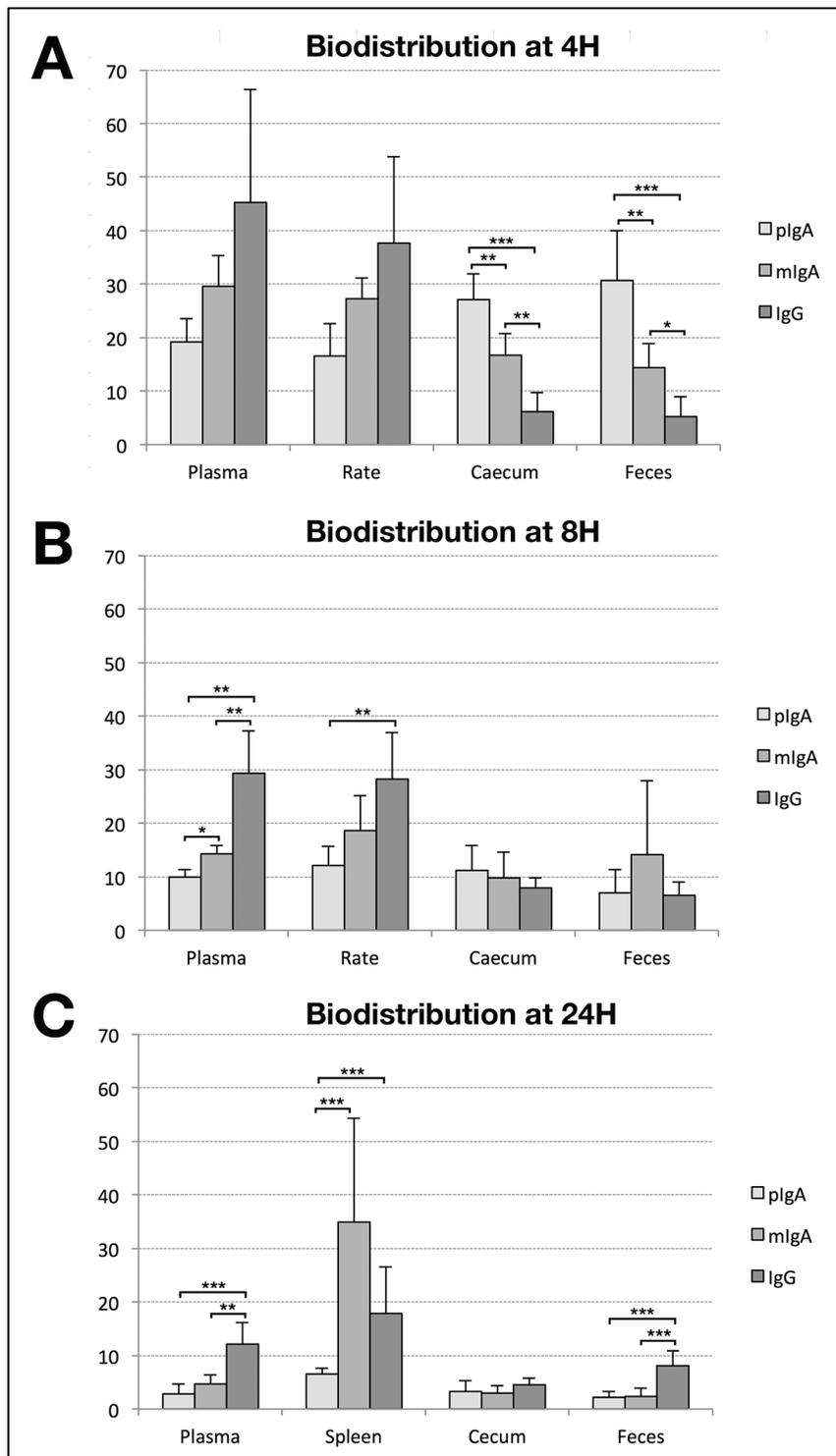
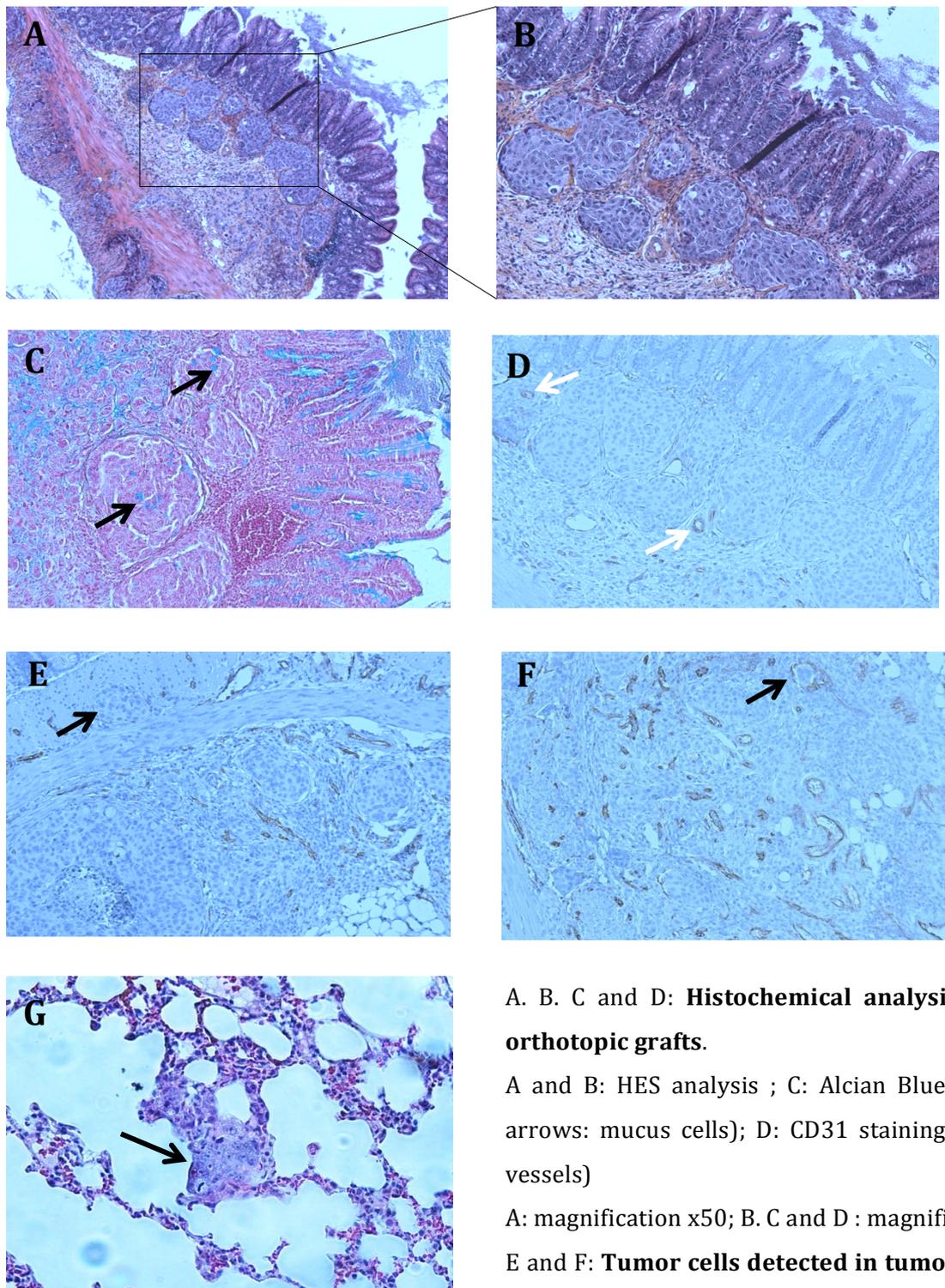


Figure 4: Biodistribution of ^{99m}Tc -anti-CEA pIgA-SH, ^{99m}Tc -anti-CEA mIgA-SH. and ^{99m}Tc -anti-CEA IgG-SH in plasma, spleen, cecum and feces at 4, 8 and 24 h post-injection. *: p value < 0.05 ; **: p value < 0.01 ; *: p value < 0.005**

Table 4: Biodistribution of ^{99m}Tc -IgA-SH in nude mice bearing intracecal tumors and in nude healthy mice at 4h and 8h expressed as the percentage of injected dose per gram %ID/g (Values represent the mean \pm SD of the %ID/g).

	Nude mice bearing intracecal tumors				Nude healthy mice	
	Anti-CEA IgA	Anti-CEA IgA	Irrelevant IgA	Irrelevant IgA	Anti-CEA IgA	Anti-CEA IgA
	4h (n=6)	8h (n=6)	4h (n=6)	8h (n=6)	4h (n=4)	8h (n=4)
Heart	2.5 \pm 0.6	2.4 \pm 1.2	2.2 \pm 0.7	1.3 \pm 0.08	3.2 \pm 0.6	2.1 \pm 0.7
Brain	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.04	0.2 \pm 0.06	0.1 \pm 0.01	0.2 \pm 0.08	0.2 \pm 0.03
Lungs	42.8 \pm 59.4	97.6 \pm 29.5	3.8 \pm 1.5	4.8 \pm 1.3	13.5 \pm 10.4	19.0 \pm 6.6
Kidneys	16.0 \pm 2.3	17.1 \pm 4.7	16.6 \pm 5.8	10.4 \pm 1.5	16.0 \pm 6.0	12.1 \pm 0.1
Spleen	17.6 \pm 12.4	14.5 \pm 7.8	9.9 \pm 4.9	20.9 \pm 8.1	8.2 \pm 2.3	7.1 \pm 1.3
Stomach	1.8 \pm 1.0	1.7 \pm 0.8	1.3 \pm 0.8	0.9 \pm 0.3	1.9 \pm 0.7	1.9 \pm 1.5
Small intestine						
Cecum (empty)	15.8 \pm 5.5	18.5 \pm 8.5	16.7 \pm 6.9	11.5 \pm 6.5	7.9 \pm 2.5	19.9 \pm 1.4
Colon	6.4 \pm 2.6	3.4 \pm 1.8	7.2 \pm 4.9	3.2 \pm 0.8	10.0 \pm 0.6	4.4 \pm 0.7
Liver	50.5 \pm 20.3	46.3 \pm 21.8	50.3 \pm 7.2	41.9 \pm 9.2	34.4 \pm 1.2	40.2 \pm 3.3
Muscle	0.7 \pm 0.3	0.9 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1
Blood cells	3.1 \pm 0.8	2.3 \pm 0.9	2.5 \pm 1.2	1.3 \pm 0.2	2.2 \pm 1.3	0.8 \pm 0.1
Plasma	9.8 \pm 2.7	8.2 \pm 5.1	7.9 \pm 2.2	4.4 \pm 0.4	9.7 \pm 2.1	5.6 \pm 0.6
Feces	34.2 \pm 24.0	13.3 \pm 9.5	34.9 \pm 22.9	9.7 \pm 6.2	35.2 \pm 12.9	35.0 \pm 10.1



A. B. C and D: **Histochemical analysis of colorectal orthotopic grafts.**

A and B: HES analysis ; C: Alcian Blue staining (black arrows: mucus cells); D: CD31 staining (white arrows: vessels)

A: magnification x50; B. C and D : magnification x100

E and F: **Tumor cells detected in tumor vessels** (black arrows). CD31 analysis of colorectal orthotopic grafts (magnification x100).

G: **HES analysis in lungs** (magnification x100).

Figure 5: Pathological analysis of cecum and lungs of tumor mice model.

D. Résultats et discussion du deuxième article

Les travaux présentés dans cet article se sont focalisés, dans un premier temps, sur l'optimisation du radiomarquage des IgA avec le ^{99m}Tc par la méthode indirecte associant le 2-IT et le cœur tricarbonyl que nous avons initialement développée et perfectionnée avec les IgG. Grâce à cette méthode, des rendements de radiomarquage élevés ($96,6 \pm 2,1\%$) ont pu être obtenus à partir d'une quantité limitée en IgA (1,4 nmol). Nos résultats ont de surcroît confirmé l'intérêt de l'étape de dérivatisation par le 2-IT avec notamment une augmentation des rendements de marquage de 55% avec les IgA greffées par rapport aux IgA natives (1 nmol).

Le radiomarquage des IgA a ensuite été évalué par des études *in vitro*. Les études de stabilité ont indiqué que le radiomarquage des IgA était stable sur 24h en PBS (4°C et 25°C) et en plasma murin (dilution au 1/10, 37°C). Cependant, il a été constaté une dégradation lente en plasma murin avec une diminution des PRC à 18h et 24h de 13% et 23%, respectivement. Les études d'intégrité par Western blot ont, quant à elles, montré que la structure des IgA natives était conservée après radiomarquage. Les études d'immunoaffinité, vis à vis de l'ACE, réalisées avec deux méthodes complémentaires (sur plaque et sur cellules) ont permis de confirmer que la fonctionnalité des IgA était préservée après radiomarquage. Elles ont permis aussi de déterminer un Kd aux alentours de 25 nM, montrant que les IgA présentent une bonne affinité pour l'ACE. La méthode de binding sur cellules a été effectuée avec les cellules WiDr, du même type que celles que nous avons utilisées dans notre modèle tumoral (greffe intracécale chez des souris nude).

Des études *in vivo* de biodistribution après injection i.v. des mIgA, des pIgA ou des IgG anti-ACE ont été réalisées chez des souris BALB/c après sacrifice à 4h, 8h, 18h, 24h et 48h. Les résultats obtenus ont révélé que les données de biodistribution étaient significativement différentes pour les trois Ac aux temps 8h, 24h et 48h. L'IgA monomérique présente un profil de biodistribution intermédiaire aux pIgA et aux IgG. Il est à noter toutefois que dans la rate, une fixation très intense est retrouvée pour les mIgA à partir de 18h post-injection qui est significativement supérieure à celle obtenue pour les pIgA et les IgG (à 18h: $52,6 \pm 14,1$ %ID/g et à 48h: $41,4 \pm 8,7$ %ID/g). Ces études ont permis de confirmer le rapide et important tropisme pour les épithéliums muqueux des pIgA et dans une moindre mesure des mIgA. En effet, une forte fixation est retrouvée dès 4h dans le caecum et les fèces pour les pIgA ($27,0 \pm 4,9$ %ID/g et $30,6 \pm 9,3$ %ID/g respectivement) et pour les mIgA ($16,7 \pm 4,0$ %ID/g

et $14,3 \pm 4,6\%$ ID/g) à la différence des IgG ($6,1 \pm 3,6\%$ ID/g et $5,2 \pm 3,8\%$ ID/g). De plus, des différences significatives de comptage ont été observées entre les différentes Ig dans le plasma et les organes richement vascularisés (cœur, rate, poumons). Ces résultats sont en accord avec l'élimination rapide observée pour les IgA dans les fèces et leur demi-vie sérique reconnue plus courte. Une importante captation est retrouvée dans le foie pour les trois Ac, sans différence significative entre eux.

La capacité de ciblage des pIgA a ensuite été évaluée en utilisant un modèle murin de CCR humain. Des greffes orthotopiques de cellules WiDr ont été effectuées dans le caecum par micro-injection. Les analyses anatomo-pathologiques des caecums ont confirmé que le modèle reproduisait bien un adénocarcinome, puisque la présence de cellules glandulaires et de muco-sécrétions était retrouvée. Les différents stades du CCR, de la tumeur locale au carcinome avec métastases pulmonaires ont été observés. Les études de biodistribution réalisées après injection i.v. n'ont pas permis de mettre en évidence une différence significative de fixation caecale entre les pIgA anti-ACE, et les contrôles. Ces contrôles incluaient l'injection de pIgA d'antigénicité différente (anti-arachide) à des souris greffées et l'injection de pIgA anti-ACE à des souris nude saines. Le fait qu'il n'y ait pas de différence significative de fixation dans le caecum peut être expliqué par plusieurs points. Premièrement, les IgA polymériques, quelle que soit leur antigénicité, ayant un fort tropisme pour les muqueuses du caecum, la liaison non spécifique d'IgA dans cet organe est très importante. Deuxièmement, la tumeur implantée ayant diffusé dans les couches externes du caecum, elle était difficilement isolable des tissus normaux pour un comptage spécifique et exhaustif. En moyenne, les poids des caecums sont passés de 0,24 g à 0,4 g. En outre, les tumeurs étaient en partie nécrotiques et faiblement vascularisées. En revanche, une importante fixation dans les poumons a été retrouvée pour les pIgA anti-ACE. Celle-ci est significativement différente de la fixation après injection de pIgA contrôle et chez les souris nude contrôle. Ce résultat est cohérent avec la présence de métastases pulmonaires confirmée par l'analyse anatomo-pathologique. Il est à noter, que des tumeurs extra-caecales étaient présentes chez quelques animaux. Dans ces tumeurs, une différence de fixation de l'Ac anti-ACE versus l'Ac irrelevant a été observée. Le taux de fixation était toutefois beaucoup plus faible que celui observé dans le caecum et les poumons.

Pour compléter ces travaux sur les IgA, nous avons, par la suite, travaillé sur les IgA sécrétoires. Le radiomarquage des ces SIgA a été réalisé par la même technique impliquant le

cœur tricarbonyle et le 2-iminothiolane avec des rendements de radiomarquage intéressants. L'analyse par Western blot a permis de vérifier que l'SIgA reste intacte, même si la pièce sécrétoire se détache d'une fraction des SIgA. L'SIgA a ensuite été utilisée pour des études préliminaires de biodistribution après administration orale, l'objectif étant d'évaluer si l'SIgA avait un comportement différent des IgG. En effet, ces anticorps étant protégés de la dégradation enzymatique par la pièce sécrétoire, il pourrait être envisagé de les administrer par voie orale notamment dans le cas de cancer digestif.

E. Résultats complémentaires : radiomarquage des IgA sécrétoires anti-ACE et étude préliminaire de biodistribution après administration orale

1. Radiomarquage des IgA sécrétoires anti-ACE

Le radiomarquage des SIgA avec le ^{99m}Tc a été effectué avec la même technique que celle utilisée pour les IgA monomériques et polymériques. Des rendements de radiomarquage intéressants ont été obtenus ($88,5 \pm 1,5\%$).

2. Etude d'intégrité

L'étude d'intégrité structurale des SIgA après radiomarquage a été réalisée, comme pour les autres Ig radiomarquées, par un SDS-PAGE couplé à un Western blot (Figure 41). Les profils des SIgA natives et radiomarquées présentent des bandes à 150 kDa et 450 kDa correspondant aux poids moléculaires des IgA monomériques et sécrétoires respectivement. Comme attendu, la structure des SIgA a été conservée après radiomarquage, il n'y a pas de bande de bas poids moléculaire sur le profil des SIgA radiomarquées, correspondant à une éventuelle fragmentation en chaîne lourde, chaîne légère ou peptides. Cependant, il est à noter sur le profil des IgA sécrétoires après radiomarquage, la présence d'une bande de faible intensité au niveau du poids moléculaire 60 – 80 kDa. Cela pourrait correspondre au poids moléculaire de la pièce sécrétoire suggérant, pour une faible proportion des SIgA, que la pièce sécrétoire s'est décrochée. Une légère diminution d'intensité est observée entre les profils des anticorps natifs et radiomarqués en raison d'une perte en anticorps lors de la purification après incubation avec 2-IT.

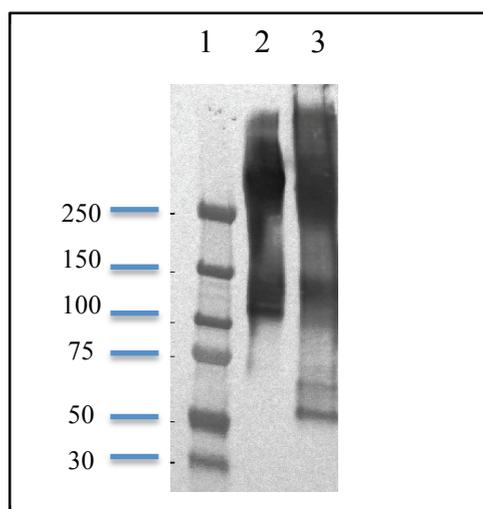


Figure 41 : Comparaison des structures moléculaires des IgA sécrétoires natives et des IgA sécrétoires radiomarquées

1. Marqueur de poids moléculaires
2. IgA anti-ACE sécrétoire non radiomarquée (2 μg déposés)
3. IgA anti-ACE sécrétoire radiomarquée (6 μg déposés)

3. Etude de biodistribution des SIgA après administration orale

a. Méthode

Les expériences de biodistribution ont été effectuées avec des souris BALB/c saines, mâles de 7 semaines (Charles River Laboratories, Chatillon-sur-Chalaronne, L'Arbresle Cedex). Ces souris mises à jeun 24h avant, ont été gavées avec des SIgA anti-ACE radiomarquées (40 MBq, 140 μg d'anticorps) à l'aide d'une sonde de gavage. Ces souris ont été sacrifiées par anesthésie et dislocation cervicale à différents temps après gavage : 1h, 2h, 4h et 8h. Après dissection, les organes sélectionnés ont été rincés en PBS, pesés et leur taux de radioactivité a été mesuré avec un compteur gamma. La captation radioactive dans ces organes a été ensuite exprimée en pourcentage de l'activité administrée par gramme de tissu (% ID / g) après correction de la décroissance radioactive. Les cellules sanguines, le plasma et les fécès ont également été recueillis et comptés. Les matières fécales correspondent aux matières fécales recueillies dans l'intestin grêle et dans le côlon au cours de la dissection. Il est à noter que le caecum n'a pas été vidé.

b. Résultats et discussion

Les résultats de biodistribution obtenus après administration orale de SIgA et de IgG radiomarquées sont présentés dans les [tables 16 et 17](#) respectivement.

	Organes	1h (n=3)	2h (n=4)	4h (n=4)	8h (n=4)
Organes du tube digestif et fécès	Estomac	100,3±29,3	109,0±67,0	17,5±18,6	5,1±3,2
	Grêle	49,9±27,8	36,9±5,3	10,8±4,2	3,7±1,6
	Caecum	0,06±0,01*	109,8±141,8	168,5±57,6	47,8±8,1
	Côlon	0,15±0,07*	3,6±3,9*	11,5±4,3*	4,0±2,3
	Ganglions mésentériques	0,25±0,1*	1,7±2,1	1,6±2,6	0,2±0,1
	Fécès	91,3±65,3	150,2±70,6	106,2±33,4*	11,5±5,8
Autres organes	Foie	1,2±0,06*	2,4±0,7	4,6±0,7*	3,4±1,0*
	Poumons	0,25±0,04*	0,6±0,2	0,3±0,1*	0,1±0,02
	Reins	0,9±0,1	2,0±0,7	2,2±0,8	2,0±1,0
	Rate	0,20±0,1	0,3±0,2	0,8±1,1	0,2±0,1
	Cœur	0,1±0,01*	0,2±0,04	1,2±1,3	0,1±0,08
	Cellules sanguines	0,1±0,02*	0,2±0,06*	0,4±0,4	0,1±0,07
	Plasma	0,3±0,1*	0,6±0,15	0,4±0,4	0,3±0,2
	Muscle	0,7±1,0	0,7±1,0	0,2±0,07	0,08±0,06

Table 16 : Biodistribution des IgA sécrétoires anti-ACE radiomarquées après administration orale chez des souris BALB/c saines à 1h, 2h, 4h et 8h

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité administrée par gramme de tissu (% ID/g). Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart-type du %ID/g. * : p < 0,05, différence significative de captation entre SIgA et IgG.

	Organes	1h (n=3)	2h (n=4)	4h (n=4)	8h (n=4)
Organes du tube digestif et fécès	Estomac	131,3±27,4	69,9±28,6	49,9±35,0	10,8±14,6
	Grêle	59,4±9,6	32,3±16,4	19,1±14,1	3,2±0,3
	Caecum	7,2±12,3	223,9±114,4	223,1±66,1	74,0±39,3
	Côlon	1,3±1,0	36,8±37,4	20,0±3,5	4,2±1,6
	Ganglions mésentériques	0,8±0,7	2,4±4,3	0,9±0,4	0,3±0,2
	Fécès	144,5±4,7	80,8±40,1	282,0±127,6	16,7±7,3
Autres organes	Foie	1,5±0,1	3,5±2,4	1,8±0,6	1,5±0,2
	Poumons	0,4±0,05	0,6±0,3	0,2±0,01	0,1±0,05
	Reins	1,1±0,1	2,05±0,8	2,1±0,7	1,4±0,2
	Rate	0,2±0,1	0,6±0,3	0,3±0,1	0,2±0,1
	Cœur	0,2±0,05	0,4±0,4	0,2±0,05	0,1±0,03
	Cellules sanguines	0,4±0,3	0,5±0,2	0,1±0,1	0,1±0,01
	Plasma	0,5±0,02	0,5±0,1	0,4±0,1	0,2±0,1
	Muscle	0,3±0,3	0,5±0,4	0,3±0,1	0,04±0,02

Table 17 : Biodistribution des IgG anti-CD20 radiomarquées après administration orale chez des souris BALB/c saines à 1h, 2h, 4h et 8h

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité administrée par gramme de tissu (%ID/g). Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart-type du %ID/g.

L'analyse globale de la totalité des organes explorés montre une différence significative ($p = 0,036$) à 1h entre SIgA et IgG. Aux autres temps étudiés (2h, 4h, 8h), l'analyse globale ne montre pas de différence significative. Les comptages des différents organes du tube digestif suggèrent une cinétique plus lente des SIgA à l'intérieur du tube digestif. Dès 1h, une augmentation significative de radioactivité est observée dans le caecum et le côlon pour les IgG, alors que les IgA sont encore dans la partie supérieure du tube digestif. De même à 2h et 4h, la radioactivité présente dans le côlon est significativement supérieure ($p = 0,021$ et $0,043$ respectivement) pour l'IgG par rapport à l'SIgA. Il est à noter que l'œsophage n'a pas été prélevé et son comptage aurait pu apporter des informations complémentaires. Une étude *in vivo* chez la souris a démontré que les chaînes de N-glycanes de la pièce sécrétoire lient la SIgA au gel du mucus de la surface luminale du tractus respiratoire (Phalipon, 2002). Le même type de résultats a été suggéré dans le tube digestif (Kaetzel, 2014). Ces propriétés pourraient expliquer le transit plus lent des SIgA par rapport aux IgG dans le tube digestif. D'autre part, il n'est pas possible à partir des résultats de comptage réalisés de savoir si la radioactivité se trouve sur l'organe au niveau du mucus ou si les SIgA ont pénétré à l'intérieur des épithéliums. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de réaliser des études par autoradiographie.

Les valeurs obtenues dans les fécès pourraient également nous permettre de mieux suivre la cinétique de transit des Ig. Dans notre expérience, les fécès correspondent aux matières récupérées dans l'ensemble de l'intestin grêle et du côlon. Il serait intéressant de séparer les matières récupérées dans chaque partie du tube digestif. De plus, des cages métaboliques pourraient être utilisées afin de collecter les matières émises.

Pour les IgG, comme pour les SIgA, peu de radioactivité est retrouvée dans les organes en dehors du tube digestif. Toutefois, une augmentation significative de radioactivité au niveau du foie a été observée pour les SIgA versus les IgG à 4h et à 8h ($p = 0,021$ dans les 2 cas). Cette différence pourrait être due à un faible passage des SIgA à travers les entérocytes. Ce type de phénomène a été décrit dans le cadre de pathologies inflammatoires. En effet, une surexpression du récepteur CD71 a été observée au niveau des entérocytes des

sujets malades (Monteiro, 2010). Ce récepteur permettrait le phénomène de retranscytose des SIgA. En situation physiologique, on peut penser que ce récepteur même s'il est moins exprimé, pourrait également permettre un passage des SIgA après administration orale, de la lumière intestinale dans les entérocytes via le récepteur CD71. Néanmoins, des analyses complémentaires seraient nécessaires, car l'augmentation observée au niveau du foie pourrait aussi être due, à un passage de ^{99m}Tc libéré suite au catabolisme des SIgA radiomarquées dans le tube digestif. Des prélèvements sanguins ont été réalisés et restent à analyser afin de rechercher la présence de SIgA dans la circulation.

Il est à noter une très importante variabilité inter-individuelle dans ces expériences. Pour poursuivre ces études, il serait nécessaire d'essayer de réduire ce phénomène. Même si les souris ont été mises à jeun depuis la veille, de grosses différences de transit existent entre les animaux, mêmes sains. Pour minimiser ce biais, nous avons pensé administrer des laxatifs aux souris. Cependant, ces traitements pourraient aussi modifier la sécrétion de mucus et la cinétique des Ig étudiées.

Chapitre 3: Discussion générale et perspectives

I. Optimisation d'une technique de radiomarquage des anticorps

Dans ce travail, nous avons tout d'abord mis au point et optimisé une technique de radiomarquage d'anticorps avec le technétium 99m. Cette technique avait été initialement développée par Biechlin *et al.* sur des immunoglobulines polyclonales (Biechlin, 2005). Il s'agit d'une méthode indirecte impliquant un BFCA, le cœur tricarbonyl et un synthon le 2-iminothiolane. Grâce à l'utilisation du 2-IT, des rendements de radiomarquage importants ont été obtenus en utilisant des quantités restreintes d'Ac. Ceci était particulièrement important pour les IgA puisqu'elles sont disponibles en quantité limitée. De plus, la technique permet de travailler à des concentrations relativement faibles ce qui est nécessaire pour les IgA qui ont tendance à précipiter à concentration $> 2\text{mg/ml}$.

Les études *in vitro* des immunoglobulines radiomarquées ont permis de vérifier que le radiomarquage est stable en PBS et en plasma, même si une lente diminution des PRC dans le plasma a été observée pour les deux classes d'Ac. Cette diminution est en partie due au phénomène de transchélation comme nous avons pu le mettre en évidence dans les expériences de déplacement par la cystéine. En fonction de sa concentration, cet acide aminé est capable de déplacer le complexe de manière plus ou moins importante. Ces études *in vitro* ont aussi montré que la technique de radiomarquage avec le cœur tricarbonyl permettait de conserver l'intégrité structurale des Ig. Finalement, cette technique permet de préserver la fonctionnalité des Ac. La détermination du Kd à l'aide de deux méthodes complémentaires, pour les deux classes d'Ac a permis de vérifier que les Ac conservent une bonne affinité pour leur antigène. L'intégrité et l'immunoaffinité n'avaient pas été évaluées dans les premières études publiées sur cette technique de radiomarquage.

La technique de radiomarquage semble donc intéressante pour le radiomarquage des IgA et des IgG mais pourrait également être appliquée à d'autres isotypes ou des fragments d'Ac, et de manière plus générale à d'autres protéines. Il est toutefois à noter que l'Isolink[®] tout comme le 2-iminothiolane n'ont jamais été injectés chez l'homme. Avant de réaliser des études cliniques avec ce type de radiomarquage, il serait donc nécessaire d'effectuer des

études de toxicité de ces composés chez l'animal, même si des quantités très faibles sont utilisées.

II. Etude de biodistribution des IgA versus IgG chez l'animal sain

L'objectif premier de ce travail était d'étudier la biodistribution des IgA en comparaison à celle des IgG, à partir de ces deux isotopes d'Ac radiomarqués.

La biodistribution a tout d'abord été étudiée après administration i.v. des Ig radiomarquées. Des différences significatives ont été observées entre pIgA, mIgA et IgG, avec un comportement intermédiaire des mIgA. Dans les études de biodistribution de l'IgG anti-ACE comme de l'IgG anti-CD20, un taux de comptage élevé dans le sang et les tissus richement vascularisés est retrouvé durant plusieurs heures, ce qui est concordant avec la demi-vie plasmatique du rituximab de 68h et la relativement longue demi-vie physiologique des IgG. Une captation importante, liée au métabolisme de l'Ig radiomarquée, est retrouvée également dans le foie, les reins et la rate. Les IgG ne présentent, par contre pas de captation dans les organes du tube digestif. En comparaison, les pIgA et dans une moindre mesure les mIgA, présentent un taux de comptage beaucoup plus faible dans le plasma et une captation élevée dans les organes du tube digestif. Ce résultat confirme le fort et rapide tropisme des IgA pour les muqueuses du tube digestif ainsi que leur demi-vie physiologique plus courte que celle des IgG.

La différence de comportement des mIgA par rapport aux IgG peut provenir de leur glycosylation plus importante. En effet, les IgA humaines portent plusieurs sites de N-glycosylation qui contribuent à un pourcentage non négligeable de leur masse moléculaire (6-7% pour l'IgA1) (Tomana, 1976). D'autre part, il est possible d'envisager qu'une partie des mIgA pourrait se réassembler dans le sang pour donner des IgA polymériques. En effet, au niveau de leur région C- terminale, les IgA contiennent une région additionnelle de 18 acides aminés dont un résidu cystéine. Cette région appelée *tailpiece* est impliquée dans la formation des dimères lors de la liaison avec la chaîne J, mais pourrait également déclencher, spontanément sans présence de la chaîne J la multimérisation des IgA.

La biodistribution des SIgA a ensuite été étudiée après administration orale, en comparaison de celle des IgG. En effet, les SIgA étant protégée de la dégradation dans le tube

digestif par la pièce sécrétoire, leur utilisation par administration orale pourrait être envisagée. Dans cette étude préliminaire, nous voulions tout d'abord évaluer leur différence de comportement par rapport aux IgG. Nos résultats suggèrent un transit plus lent des SIgA dans le tube digestif, qui pourrait être lié à leur affinité pour le mucus. Toutefois, pour compléter ces premiers résultats, des dosages des Ig dans le plasma et dans les fèces pourraient être réalisés afin de voir s'il y a une différence de dégradation entre IgG et SIgA et s'il y a un passage des SIgA de la lumière du tube digestif dans les entérocytes et éventuellement vers la circulation sanguine. Ces expériences d'administration orale pourraient également être réalisées dans un modèle tumoral de cancer digestif pour étudier leur intérêt dans le traitement de ce type de tumeur par voie orale.

Les SIgA étant formées d'une dIgA et de la pièce sécrétoire, il serait intéressant de radiomarquer la dIgA avec le ^{99m}Tc et la pièce sécrétoire à l'aide d'un autre radioélément comme l' ^{123}I , afin de pouvoir effectuer une détection en double isotope. Le suivi en double isotope pourrait permettre d'observer le réassemblage potentiel entre la dIgA et la pièce sécrétoire en temps réel.

III. Etude de biodistribution des IgA versus IgG chez l'animal porteur de tumeur

La dernière partie du travail avait pour objectif d'étudier la capacité des IgA à cibler des tumeurs à localisation muqueuse.

Dans ce but, un modèle tumoral a été développé chez la souris immunodéprimée, par greffe orthotopique de cellules WiDr dans les couches externes du caecum. Le modèle partage les mêmes caractéristiques histologiques que les tumeurs de cancer colorectal humaines. Ce modèle présente en plus de la tumeur colique primitive des métastases au niveau pulmonaire. Il nous a donc permis d'évaluer la fixation des pIgA dans les muqueuses digestives mais également pulmonaires.

Même si une différence significative de fixation dans le caecum n'a pas pu être mise en évidence entre les pIgA anti-ACE et les contrôles, un fort tropisme des IgA vers le caecum est retrouvé. Afin d'exploiter au mieux ce modèle tumoral après administration i.v. il serait

intéressant d'essayer d'optimiser le rapport signal/bruit. Pour cela, d'autres temps d'analyse plus tardifs après l'administration pourraient être explorés. De plus, des laxatifs pourraient être administrés afin de diminuer le bruit de fond dû aux matières présentes dans le tube digestif. En effet, la vidange des organes digestifs et le rinçage simple ne paraissent pas suffisants pour s'affranchir suffisamment du bruit de fond radioactif des fécès. D'autre part, il serait intéressant de réaliser ces expériences plus précocément dans le développement tumoral chez la souris, afin d'avoir une tumeur plus localisée, avec moins de nécrose et donc plus de cellules susceptibles d'exprimer l'ACE.

Les IgA que nous avons étudiées étaient de sous-classe IgA1, majoritaire dans le sérum. Des études dans ce modèle tumoral, avec des IgA2 pourraient s'avérer intéressantes car il s'agit de la sous-classe prédominante dans les muqueuses.

IV. Perspectives et limites des IgA

Ces travaux nous amènent à envisager un intérêt des IgA en imagerie. Des IgA radiomarquées, ciblant des Ag d'intérêt spécifique, pourraient être utilisées dans le diagnostic initial ou le bilan d'extension de tumeurs à localisation muqueuse. Afin d'évaluer plus largement l'intérêt de ce traceur, des études d'imagerie avec des caméras dédiées au petit animal seraient nécessaires. Dans ce cadre, pour améliorer la résolution des images, des radioéléments émetteurs de positons pourraient s'avérer intéressants. De plus, l'optimisation du rapport signal/bruit pourrait impliquer des temps d'imagerie tardive et donc des radioéléments de période plus longue, comme l'iode 124.

A plus long terme, il est également possible d'envisager l'utilisation des IgA comme un nouvel outil dans les stratégies thérapeutiques ciblant les compartiments muqueux. Les IgA pourraient être appliquées en immunothérapie mais aussi après couplage à un radioélément émetteur β ou α en RIT. L'yttrium 90 est actuellement le radioélément le plus utilisé en RIT et qui a déjà l'AMM couplé à une IgG anti-CD20. Toutefois, à côté des émetteurs β , les émetteurs α , comme le plomb 212 ou l'astate 211, ayant un rayon d'action plus ciblé et un transfert d'énergie dans la matière beaucoup plus important, suscitent un

intérêt grandissant. Ces thérapies pourraient être testées dans le modèle tumoral développé et l'efficacité du traitement suivie par RIS.

Dans ces différentes applications des IgA, la toxicité de cette classe d'anticorps devra nécessairement être évaluée. En effet, il est reconnu que les IgA sont impliquées chez l'homme dans des pathologies auto-immunes et inflammatoires telles que la maladie coeliaque et la maladie de Berger. Il serait donc important de s'assurer que l'administration de ce type d'Ac n'entraîne pas, notamment de réactions inflammatoires au niveau des muqueuses digestives et pulmonaires ou d'agglutinations sériques pouvant provoquer des inflammations glomérulaires et des néphropathies. Dans les applications radiopharmaceutiques, diagnostiques comme thérapeutiques, les quantités d'Ac mises en jeu restent toutefois très faibles, comparativement aux quantités administrées dans des applications d'immunothérapie. Les réactions de toxicité engendrées pourraient donc être beaucoup moins importantes, voire absentes, en RIS ou en RIT.

Conclusion

Les différentes sous-classes d'immunoglobuline A ont été radiomarquées avec le ^{99m}Tc par une méthode originale, simple et non altérante. Cette méthode faisant intervenir un synthon le 2-IT et un complexe technétié préformé, le ^{99m}Tc -tricarbonyl, utilise des quantités restreintes en Ac et permet d'obtenir des rendements de radiomarquage élevés. Les études de biodistribution des IgA après administration i.v., chez l'animal sain et l'animal porteur de tumeur digestive, ont dévoilé un tropisme rapide et important de ces Ac pour les muqueuses. Ces études prometteuses encouragent au développement d'IgA comme outil diagnostique en imagerie des tumeurs à localisation muqueuse mais aussi en thérapie ciblée. Des études plus approfondies sur le devenir des IgA sécrétoires après administration orale permettront d'orienter le potentiel diagnostique et thérapeutique de cette sous-classe d'IgA résistante aux enzymes digestives. En effet, le phénomène de retranscytose des SIgA par les entérocytes demeure peu étudié et l'administration orale de ces SIgA pourrait ainsi permettre de distribuer les Ac radiomarqués à travers les muqueuses via la *lamina propria*. L'innocuité des IgA reste toutefois à explorer avant d'envisager toutes applications cliniques de cette classe d'Ac.

Bibliographie

1. ABÈS R., DUTERTRE C.-A., TEILLAUD J.-L. « Antibodies: better knowledge for a better use ». *Médecine Sci. MS.* décembre 2009. Vol. 25, n°12, p. 1011-1019.
2. ABRAMS M. J., JUWEID M., TENKATE C. I., SCHWARTZ D. A., HAUSER M. M., GAUL F. E., FUCCELLO A. J., RUBIN R. H., STRAUSS H. W., FISCHMAN A. J. « Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats ». *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* décembre 1990. Vol. 31, n°12, p. 2022-2028.
3. ALBERTO R., SCHIBLI R., EGLI A., SCHUBIGER A. P., ABRAM U., KADEN T. A. « A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand ». *J Am Chem Soc.* 1998. Vol. 120, n°31, p. 7987-7988.
4. ALBERTO R., SCHIBLI R., WAIBEL R., ABRAM U., SCHUBIGER A. P. « Basic aqueous chemistry of $[\text{M}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (M=Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application ». *Coord. Chem. Rev.* . septembre 1999. Vol. 190–192, n°0, p. 901-919.
5. ALLARD B. *Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ciblant les récepteurs des endothélines en vue d'une immunothérapie des cancers.* Thèse de doctorat. France : Université de Paris-Sud, 2012.
6. ANTHONY R. M., WERMELING F., KARLSSON M. C. I., RAVETCH J. V. « Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 16 décembre 2008. Vol. 105, n°50, p. 19571-19578.
7. ARDISSON V., MATHIEU J. P., GHEZZI C., FAGRET D. « TEMP : les possibilités de marquage à l'iode 123 ou au technétium ». *Médecine Nucl.* 2005. Vol. 29, n°4, p. 168-178.
8. AUFORT M. *Chimiothèques de complexes du technétium et du rhénium ciblant l'intégrine $\alpha\text{V}\beta_3$: développement de traceurs pour la détection précoce de la néoangiogenèse tumorale.* Thèse de doctorat. [s.l.] : [s.n.], 2008. 311 p.
9. AURLIEN E., LARSEN R. H., KVALHEIM G., BRULAND O. S. « Demonstration of

- highly specific toxicity of the alpha-emitting radioimmunoconjugate(211)At-rituximab against non-Hodgkin's lymphoma cells ». *Br. J. Cancer*. novembre 2000. Vol. 83, n°10, p. 1375-1379.
10. BAKER A.-M., COX T. R., BIRD D., LANG G., MURRAY G. I., SUN X.-F., SOUTHALL S. M., WILSON J. R., ERLER J. T. « The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer ». *J. Natl. Cancer Inst.* 2 mars 2011. Vol. 103, n°5, p. 407-424.
 11. BALLOT E., JOHANET C. « Les immunoglobulines ». In : *Infect. Pharm. - Biol.* Rueil-Malmaison : Groupe Liaisons S.A., 2007. p. 1036. ISBN : 2-915585-40-7.
 12. BARBET J., KRABER-BODÉRE F., FAIVRE-CHAUVET A., GESTIN J.-F., BARDIÈS M., CAMPION L., CHATAL J.-F. « La radio-immunothérapie préciblée des tumeurs solides : une démarche pluridisciplinaire ». *Médecine Nucl.* septembre 2007. Vol. 31, n°9, p. 498-505.
 13. BATY D., CHAMES P. « Le point sur les anticorps autorisés en imagerie et en immunothérapie ». *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* octobre 2006. Vol. 21, n°5, p. 255-263.
 14. BECKMAN R. A., WEINER L. M., DAVIS H. M. « Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors ». *Cancer*. 15 janvier 2007. Vol. 109, n°2, p. 170-179.
 15. BENCHIMOL S., FUKS A., JOTHY S., BEAUCHEMIN N., SHIROTA K., STANNERS C. P. « Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule ». *Cell*. 21 avril 1989. Vol. 57, n°2, p. 327-334.
 16. BENEDICT C. L., GILFILLAN S., THAI T. H., KEARNEY J. F. « Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development ». *Immunol. Rev.* juin 2000. Vol. 175, p. 150-157.
 17. BEUM P. V., KENNEDY A. D., WILLIAMS M. E., LINDORFER M. A., TAYLOR R. P. « The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes ». *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 15 février 2006. Vol. 176, n°4, p. 2600-2609.
 18. BIECHLIN M.-L., BONMARTIN A., GILLY F.-N., FRAYSSE M., DU MOULINET D'HARDEMARE A. « Radiolabeling of annexin A5 with (99m)Tc: comparison of HYNIC-Tc vs. iminothiolane-Tc-tricarbonyl conjugates ». *Nucl. Med. Biol.* août 2008.

Vol. 35, n°6, p. 679-687.

19. BIECHLIN M.-L., D'HARDEMARE A. DU M., FRAYSSE M., GILLY F.-N., BONMARTIN A. « Improvement in radiolabelling proteins with the ^{99m}Tc -tricarbonyl-core $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$, by thiol-derivatization with iminothiolane: application to γ -globulins and annexin V ». *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2005. Vol. 48, n°12, p. 873–885.
20. BIESBROCK A. R., REDDY M. S., LEVINE M. J. « Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens ». *Infect. Immun.* octobre 1991. Vol. 59, n°10, p. 3492-3497.
21. BODET-MILIN C., OUDOUX A., KRAEBER-BODÉRE F. « La radio-immunothérapie ». *Médecine Nucl.* mars 2009. Vol. 33, n°3, p. 148-151.
22. BOSLY A. « Anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) dans les maladies hématologiques et les affections auto-immunes ». *Réanimation.* août 2006. Vol. 15, n°4, p. 270-277.
23. BOUREL D., TEILLAUD J.-L. « Anticorps monoclonaux : tours et détours technologiques pour de nouveaux espoirs thérapeutiques ». *C. R. Biol.* avril 2006. Vol. 329, n°4, p. 217-227.
24. CALOP J., LIMAT S., FERNANDEZ C. *Pharmacie clinique et thérapeutique*. 3e édition.[s.l.] : Masson, 2008. 1308 p.ISBN : 2-294-06234-5.
25. CAQUET R. « Antigène carcino-embryonnaire (ACE) ». In : CAQUET R, ÉD. 250 *Exam. Lab. 11e Édition*. Paris : Elsevier Masson, 2010. p. 52. ISBN : 978-2-294-71033-9.
26. CAROSELLA E. D., AUJAME L., CARCAGNE J. « Modification des anticorps monoclonaux, immuno-ligands : applications et perspectives ». *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* octobre 1990. Vol. 5, n°5, p. 9-19.
27. CARTRON G., WATIER H., GOLAY J., SOLAL-CELIGNY P. « From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy ». *Blood.* 1 novembre 2004. Vol. 104, n°9, p. 2635-2642.
28. CÉSPEDES M. V., ESPINA C., GARCÍA-CABEZAS M. A., TRIAS M., BOLUDA A., GÓMEZ DEL PULGAR M. T., SANCHO F. J., NISTAL M., LACAL J. C., MANGUES R. « Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites ». *Am. J. Pathol.* mars 2007. Vol. 170, n°3,

p. 1077-1085.

29. CHAMES P., VAN REGENMORTEL M., WEISS E., BATY D. « Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future ». *Br. J. Pharmacol.* mai 2009. Vol. 157, n°2, p. 220-233.
30. CHOPRA A. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. Bethesda (MD) : National Center for Biotechnology Information (US), 2004.
31. CNHIM. *Anticancéreux : utilisation pratique (6ème édition)*. [s.l.] : [s.n.], 2008. 520 p.
32. COGNÉ M., SIRAC C., BARDEL M., DECOURT C., LAROCHE C. Brevet d'invention. : « Mammifère non-humain transgénique pour la région des chaînes lourdes des immunoglobulines humaines de classe A et ses applications », WO/2005/047333, demande PCT/FR2004/002701
33. COGNÉ M. « [Transgenesis and humanization of murine antibodies]. » *Médecine Sci. MS* 2009. Vol. 25, n°12, p. 1149-54.
34. COMET M., VIDAL M. *Radiopharmaceutiques: Chimie des radiotraceurs et applications biologiques*. [s.l.] : Presses Universitaires de Grenoble (PUG), 1999. 744 p. ISBN : 2-7061-0774-X.
35. CUESTA A. M., SAINZ-PASTOR N., BONET J., OLIVA B., ALVAREZ-VALLINA L. « Multivalent antibodies: when design surpasses evolution ». *Trends Biotechnol.* juillet 2010. Vol. 28, n°7, p. 355-362.
36. DAYDE D. « Université Francois Rabelais - Thèse de DAVID DAYDE - Doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé ». [s.l.] : [s.n.], 2008.
37. DECRISTOFORO C., MATHER S. J. « Preparation, ^{99m}Tc-labeling, and in vitro characterization of HYNIC and N3S modified RC-160 and [Tyr3]octreotide ». *Bioconjug. Chem.* juin 1999. Vol. 10, n°3, p. 431-438.
38. DESBRÉE A. *Nouvelle approche multimodale et quantitative pour les études in vivo chez le petit animal : couplage de la beta-MicroProbe aux techniques magnétiques et développement de fantômes de rat et de souris voxelisés*. phdthesis. [s.l.] : Université Paris-Diderot - Paris VII, 2005.
39. DIAS C. R., JEGER S., OSSO J. A. Jr, MÜLLER C., DE PASQUALE C., HOHN A., WAIBEL R., SCHIBLI R. « Radiolabeling of rituximab with (188)Re and (99m)Tc using the tricarbonyl technology ». *Nucl. Med. Biol.* janvier 2011. Vol. 38, n°1, p. 19-28.

40. VAN DIJK M. A., VAN DE WINKEL J. G. « Human antibodies as next generation therapeutics ». *Curr. Opin. Chem. Biol.* août 2001. Vol. 5, n°4, p. 368-374.
41. DUCHEZ S., AMIN R., COGNÉ N., DELPY L., SIRAC C., PASCAL V., CORTHÉSY B., COGNÉ M. « Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 16 février 2010. Vol. 107, n°7, p. 3064-3069.
42. DUDLEY D. D., CHAUDHURI J., BASSING C. H., ALT F. W. « Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences ». *Adv. Immunol.* 2005. Vol. 86, p. 43-112.
43. DUFFY M. J. « Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? ». *Clin. Chem.* avril 2001. Vol. 47, n°4, p. 624-630.
44. EGLI A., ALBERTO R., TANNAHILL L., SCHIBLI R., ABRAM U., SCHAFFLAND A., WAIBEL R., TOURWÉ D., JEANNIN L., ITERBEKE K., SCHUBIGER P. A. « Organometallic ^{99m}Tc-aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity ». *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* novembre 1999. Vol. 40, n°11, p. 1913-1917.
45. VAN EGMOND M., DAMEN C. A., VAN SPRIEL A. B., VIDARSSON G., VAN GARDEREN E., VAN DE WINKEL J. G. « IgA and the IgA Fc receptor ». *Trends Immunol.* avril 2001. Vol. 22, n°4, p. 205-211.
46. ELGQVIST J. « Targeted alpha therapy: part I ». *Curr. Radiopharm.* juillet 2011. Vol. 4, n°3, p. 176.
47. ERNST J. A., LI H., KIM H. S., NAKAMURA G. R., YANSURA D. G., VANDLEN R. L. « Isolation and characterization of the B-cell marker CD20 ». *Biochemistry (Mosc.)*. 22 novembre 2005. Vol. 44, n°46, p. 15150-15158.
48. FAINTUCH B. L., NÚÑEZ G. E. F., TEODORO R., MORO A. M., MENGATTI J. « Radiolabeled nano-peptides show specificity for an animal model of human PC3 prostate cancer cells ». *Clin. São Paulo Braz.* 2011. Vol. 66, n°2, p. 327-336.
49. FDA. Clinical review of BLA reference NO. BLA 97-0260 AND BLA 97-0244. 1997.
50. FLATMARK K., MÆLANDSMO G. M., MARTINSEN M., RASMUSSEN H., FODSTAD Ø. « Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice ». *Eur. J. Cancer.* juillet 2004.

Vol. 40, n°10, p. 1593-1598.

51. FRITZBERG A. R., ABRAMS P. G., BEAUMIER P. L., KASINA S., MORGAN A. C., RAO T. N., RENO J. M., SANDERSON J. A., SRINIVASAN A., WILBUR D. S. « Specific and stable labeling of antibodies with technetium-99m with a diamide dithiolate chelating agent. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* juin 1988. Vol. 85, n°11, p. 4025-4029.
52. GANO L., PATRÍCIO L., MARQUES E., CANTINHO G., PENA H., MARTINS T., HNATOWICH D. J. « Human polyclonal immunoglobulin labelled with technetium-99m via NHS-MAG3: a comparison of radiochemical behavior and biological efficacy with other labelling methods ». *Nucl. Med. Biol.* mai 1998. Vol. 25, n°4, p. 395-403.
53. GOEDEMANS W. T., PANEK K. J. *Bifunctional chelating agents*. 5395946. 7 mars 1995.
54. GOLDENBERG D. M., WEGENER W. « Studies of breast cancer imaging with radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen. Immunomedics Breast Cancer Study Group ». *Acta Med. Austriaca*. 1997. Vol. 24, n°2, p. 55-59.
55. GOLD P., FREEDMAN S. O. « Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system ». *J. Exp. Med.* 1 septembre 1965. Vol. 122, n°3, p. 467-481.
56. GOLDSTEIN M. J., MITCHELL E. P. « Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer ». *Cancer Invest.* 2005. Vol. 23, n°4, p. 338-351.
57. GUADAGNI F., WITT P. L., ROBBINS P. F., SCHLOM J., GREINER J. W. « Regulation of carcinoembryonic antigen expression in different human colorectal tumor cells by interferon-gamma ». *Cancer Res.* 1 octobre 1990. Vol. 50, n°19, p. 6248-6255.
58. GUGLER E., BOKELMANN G., DATWYLER A., VON MURALT G. « Immunoelectrophoretic studies on human milk proteins ». *Schweiz. Med. Wochenschr.* 13 décembre 1958. Vol. 88, n°50, p. 1264-1267.
59. HAMMARSTRÖM S. « The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues ». *Semin. Cancer Biol.* avril 1999. Vol. 9, n°2, p. 67-81.
60. HARDY R. R., KINCADE P. W., DORSHKIND K. « The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage ». *Immunity*. juin 2007. Vol. 26, n°6, p. 703-714.
61. HAS. *Guide HAS 2012 Cancer Colorectal*. 2012.

62. HAS. *Guide-ALD n°30 : Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique. Cancer colorectal, Adénocarcinome.* janvier 2012. 57 p.
63. HASSAN R., WU C., BRECHBIEL M. W., MARGULIES I., KREITMAN R. J., PASTAN I. « ¹¹¹Indium-labeled monoclonal antibody K1: biodistribution study in nude mice bearing a human carcinoma xenograft expressing mesothelin ». *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.* 9 février 1999. Vol. 80, n°4, p. 559-563.
64. HEREMANS J. F., HEREMANS M. T., SCHULTZE H. E. « Isolation and description of a few properties of the beta 2A-globulin of human serum ». *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* janvier 1959. Vol. 4, n°1, p. 96-102.
65. HOLLIGER P., HUDSON P. J. « Engineered antibody fragments and the rise of single domains ». *Nat. Biotechnol.* septembre 2005. Vol. 23, n°9, p. 1126-1136.
66. HORNICK C. L., KARUCH F. « Antibody affinity. 3. The role of multivalence ». *Immunochemistry.* mars 1972. Vol. 9, n°3, p. 325-340.
67. HU S.-Z., SHIVELY L., RAUBITSCHKE A., SHERMAN M., WILLIAMS L. E., WONG J. Y. C., SHIVELY J. E., WU A. M. « Minibody: A Novel Engineered Anti-Carcinoembryonic Antigen Antibody Fragment (Single-Chain Fv-CH3) Which Exhibits Rapid, High-Level Targeting of Xenografts ». *Cancer Res.* 1 juillet 1996. Vol. 56, n°13, p. 3055-3061.
68. INCA. *Comprendre les lymphomes non hodgkiniens. Un guide d'information pour les patients et leurs proches.* septembre 2011. 76 p. Disponible sur : < <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Lymphome-non-hodgkinien/Points-cles> >
69. JANSEN F. P., VANDERHEYDEN J.-L. « The future of SPECT in a time of PET ». *Nucl. Med. Biol.* octobre 2007. Vol. 34, n°7, p. 733-735.
70. KAETZEL C. S. « Cooperativity among secretory IgA, the polymeric immunoglobulin receptor, and the gut microbiota promotes host-microbial mutualism ». *Immunol. Lett.* décembre 2014. Vol. 162, n°2 Pt A, p. 10-21.
71. KERR M. A. « The structure and function of human IgA ». *Biochem. J.* 15 octobre 1990. Vol. 271, n°2, p. 285-296.
72. KITAMURA D., ROES J., KÜHN R., RAJEWSKY K. « A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene ». *Nature.* 4 avril 1991. Vol. 350, n°6317, p. 423-426.

73. KÖHLER G., MILSTEIN C. « Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity ». *Nature*. 7 août 1975. Vol. 256, n°5517, p. 495-497.
74. KRAEBER-BODÉRÉ F., PALLARDY A., LACOMBE M., EUGÈNE T., ANSQUER C., BODET-MILIN C., ROUSSEAU C., SALAUN P.-Y., DAVODEAU F., FAIVRE-CHAUVET A., BARBET J., CHÉREL M. « Radiothérapie vectorisée : les nouvelles molécules ». *Médecine Nucl.* novembre 2011. Vol. 35, n°11, p. 613-616.
75. KRAEBER-BODÉRÉ F., ROUSSEAU C., BODET-MILIN C., FERRER L., FAIVRE-CHAUVET A., CAMPION L., VUILLEZ J.-P., DEVILLERS A., CHANG C.-H., GOLDENBERG D. M., CHATAL J.-F., BARBET J. « Targeting, toxicity, and efficacy of 2-step, pretargeted radioimmunotherapy using a chimeric bispecific antibody and ¹³¹I-labeled bivalent hapten in a phase I optimization clinical trial ». *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* février 2006. Vol. 47, n°2, p. 247-255.
76. LAVERMAN P., DAMS E. T., OYEN W. J., STORM G., KOENDERS E. B., PREVOST R., VAN DER MEER J. W., CORSTENS F. H., BOERMAN O. C. « A novel method to label liposomes with ^{99m}Tc by the hydrazino nicotinyl derivative ». *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* janvier 1999. Vol. 40, n°1, p. 192-197.
77. LIU S. « Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides ». *Adv. Drug Deliv. Rev.* septembre 2008. Vol. 60, n°12, p. 1347-1370.
78. LIU S., EDWARDS D. S. « ^{99m}Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals ». *Chem. Rev.* 8 septembre 1999. Vol. 99, n°9, p. 2235-2268.
79. LIU S., HSIEH W.-Y., KIM Y.-S., MOHAMMED S. I. « Effect of coligands on biodistribution characteristics of ternary ligand ^{99m}Tc complexes of a HYNIC-conjugated cyclic RGDfK dimer ». *Bioconjug. Chem.* décembre 2005. Vol. 16, n°6, p. 1580-1588.
80. MACPHERSON A. J., GEUKING M. B., SLACK E., HAPFELMEIER S., MCCOY K. D. « The habitat, double life, citizenship, and forgetfulness of IgA ». *Immunol. Rev.* janvier 2012. Vol. 245, n°1, p. 132-146.
81. MALVIYA G., ANZOLA K. L., PODESTÀ E., LAGANÀ B., DEL MASTRO C., DIERCKX R. A., SCOPINARO F., SIGNORE A. « (^{99m}Tc)-labeled rituximab for imaging B lymphocyte infiltration in inflammatory autoimmune disease patients ». *Mol.*

- Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* octobre 2012. Vol. 14, n°5, p. 637-646.
82. MANSOURI T., DO K., WANG X., GILES F. J., O'BRIEN S. M., SAFFER H., THOMAS D., JILANI I., KANTARJIAN H. M., KEATING M. J., ALBITAR M. « Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance ». *Blood*. 1 avril 2003. Vol. 101, n°7, p. 2507-2513.
83. MEARES C. F., MOI M. K., DIRIL H., KUKIS D. L., MCCALL M. J., DESHPANDE S. V., DENARDO S. J., SNOOK D., EPENETOS A. A. « Macrocyclic chelates of radiometals for diagnosis and therapy ». *Br. J. Cancer. Suppl.* juillet 1990. Vol. 10, p. 21-26.
84. MEEK K. « Analysis of junctional diversity during B lymphocyte development ». *Science*. 9 novembre 1990. Vol. 250, n°4982, p. 820-823.
85. MELCHERS F., ROLINK A., GRAWUNDER U., WINKLER T. H., KARASUYAMA H., GHIA P., ANDERSSON J. « Positive and negative selection events during B lymphopoiesis ». *Curr. Opin. Immunol.* avril 1995. Vol. 7, n°2, p. 214-227.
86. MEREDITH R. F., BUCHSBAUM D. J. « Pretargeted radioimmunotherapy ». *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006. Vol. 66, n°2 Suppl, p. S57-59.
87. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. Bethesda (MD) : National Center for Biotechnology Information (US), 2004. Disponible sur : < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20641565> >
88. MISRI R., SAATCHI K., NG S. S. W., KUMAR U., HÄFELI U. O. « Evaluation of ¹¹¹In labeled antibodies for SPECT imaging of mesothelin expressing tumors ». *Nucl. Med. Biol.* août 2011. Vol. 38, n°6, p. 885-896.
89. MOHAMED F. *Etude multicentrique de nouveaux marqueurs tumoraux moléculaires dans les épanchements péritonéaux et le sang : analyse par PCR quantitative en temps réel*. Thèse de doctorat. [S.l.] : [s.n.], 2010.
90. MONTEIRO R. C. « Role of IgA and IgA fc receptors in inflammation ». *J. Clin. Immunol.* janvier 2010. Vol. 30, n°1, p. 1-9.
91. MONTEIRO R. C., LEROY V., LAUNAY P., MOURA I. C., ARCOS-FAJARDO M., BENHAMOU M., HADDAD É. « Pathogénie de la maladie de Berger : Implication des immunoglobulines A et de leurs récepteurs ». *MS Médecine Sci.* 2003. Vol. 19, n°12,

p. 1233-1241.

92. MONTRAVERS F., NATAF V., BALOGOVA S., KERROU K., HUCHET V., PASCAL O., TALBOT J.-N. « Tomographie d'émission de positons et radiopharmaceutiques spécifiques en oncologie : exemples d'application ». *Médecine Nucl.* mars 2009. Vol. 33, n°3, p. 152-160.
93. MOSTOV K. E. « Transepithelial transport of immunoglobulins ». *Annu. Rev. Immunol.* 1994. Vol. 12, p. 63-84.
94. MOURA I. C., CENTELLES M. N., ARCOS-FAJARDO M., MALHEIROS D. M., COLLAWN J. F., COOPER M. D., MONTEIRO R. C. « Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy ». *J. Exp. Med.* 20 août 2001. Vol. 194, n°4, p. 417-425.
95. MURAMATSU M., KINOSHITA K., FAGARASAN S., YAMADA S., SHINKAI Y., HONJO T. « Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme ». *Cell.* 1 septembre 2000. Vol. 102, n°5, p. 553-563.
96. OLAFSEN T., WU A. M. « Antibody vectors for imaging ». *Semin. Nucl. Med.* mai 2010. Vol. 40, n°3, p. 167-181.
97. OZKER S. K., HELLMAN R. S., KRASNOW A. Z. « Preparation of ^{99m}Tc labeled substance P (SP) ». *Appl. Radiat. Isot.* novembre 2002. Vol. 57, n°5, p. 729-732.
98. PAK J. K., BENNY P., SPINGLER B., ORTNER K., ALBERTO R. « N(epsilon) functionalization of metal and organic protected L-histidine for a highly efficient, direct labeling of biomolecules with [Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺ ». *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 9 mai 2003. Vol. 9, n°9, p. 2053-2061.
99. PANDEY U., KAMESWARAN M., DEV SARMA H., SAMUEL G. « (^{99m})Tc carbonyl DTPA-Rituximab: Preparation and preliminary bioevaluation ». *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.* 8 janvier 2014. Vol. 86C, p. 52-56.
100. PARDOLL D. « Does the immune system see tumors as foreign or self? ». *Annu. Rev. Immunol.* 2003. Vol. 21, p. 807-839.
101. PASCAL V. *Vers l'utilisation des Immunoglobulines A humaines ou de leurs variants à des fins thérapeutiques*. Thèse de doctorat. [S.l.] : [s.n.], 2009.

102. PHALIPON A., CARDONA A., KRAEHENBUHL J. P., EDELMAN L., SANSONETTI P. J., CORTHÉSY B. « Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo ». *Immunity*. juillet 2002. Vol. 17, n°1, p. 107-115.
103. PONTECORVO G. « Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment ». *Somatic Cell Genet.* octobre 1975. Vol. 1, n°4, p. 397-400.
104. PRIN-MATHIEU C., AGUILAR P., BÉNÉ M.-C., FAURE G., KOLOPP-SARDA M.-N. « Anticorps monoclonaux, anticorps thérapeutiques ». *Rev. Fr. Lab.* novembre 2003. Vol. 2003, n°357, p. 31-39.
105. RENAUDINEAU Y., DEVAUCHELLE-PENSEC V., HANROTEL C., PERS J.-O., SARAUX A., YOUINO P. « Mécanismes de l'action des anticorps monoclonaux anti-CD20 et surveillance biologique de leurs effets ». *Rev. Rhum.* octobre 2009. Vol. 76, n°9, p. 826-832.
106. ROBINSON M. K., DOSS M., SHALLER C., NARAYANAN D., MARKS J. D., ADLER L. P., GONZÁLEZ TROTTER D. E., ADAMS G. P. « Quantitative immunopositron emission tomography imaging of HER2-positive tumor xenografts with an iodine-124 labeled anti-HER2 diabody ». *Cancer Res.* 15 février 2005. Vol. 65, n°4, p. 1471-1478.
107. ROOPENIAN D. C., AKILESH S. « FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age ». *Nat. Rev. Immunol.* septembre 2007. Vol. 7, n°9, p. 715-725.
108. ROSCHER M., HORMANN I., LEIB O., MARX S., MORENO J., MILTNER E., FRIESEN C. « Targeted alpha-therapy using [Bi-213]anti-CD20 as novel treatment option for radio- and chemoresistant non-Hodgkin lymphoma cells ». *Oncotarget.* février 2013. Vol. 4, n°2, p. 218-230.
109. SCHIBLI R., LA BELLA R., ALBERTO R., GARCIA-GARAYOA E., ORTNER K., ABRAM U., SCHUBIGER P. A. « Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of (99m)Tc(I)-tricarbonyl complexes: a hint for the future functionalization of biomolecules ». *Bioconjug. Chem.* juin 2000. Vol. 11, n°3, p. 345-351.
110. SCHROEDER H. W. Jr, CAVACINI L. « Structure and function of

- immunoglobulins ». *J. Allergy Clin. Immunol.* février 2010. Vol. 125, n°2 Suppl 2, p. S41-52.
111. SIBERIL S., DUTERTRE C.-A., BOIX C., TEILLAUD J.-L. « Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique : un peu d'histoire, beaucoup d'ingénierie, et ... quelques succès cliniques ». *Transfus. Clin. Biol.* juin 2005. Vol. 12, n°2, p. 114-122.
112. SINGH T., KUMAR N., SONI S., RAWAT H., MITTAL G., SINGH A. K., BHATNAGAR A. « A new method for radiolabeling of human immunoglobulin-G and its biological evaluation ». *J. Pharm. Bioallied Sci.* octobre 2012. Vol. 4, n°4, p. 286-290.
113. Société de Néphrologie. *La néphropathie à IgA ou Maladie de Berger. Un livret pour les patients et leur famille.* avril 2009. 125 p. Disponible sur : < <http://www.soc-nephrologie.org/PDF/epublic/asso/AIRG/livrets/berger.pdf> >
114. STASHENKO P., NADLER L. M., HARDY R., SCHLOSSMAN S. F. « Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen ». *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* octobre 1980. Vol. 125, n°4, p. 1678-1685.
115. STOPAR T. G., MLINARIC-RASCAN I., FETTICH J., HOJKER S., MATHER S. J. « (99m)Tc-rituximab radiolabelled by photo-activation: a new non-Hodgkin's lymphoma imaging agent ». *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* janvier 2006. Vol. 33, n°1, p. 53-59.
116. SURGA E. *Le rituximab : revue de son utilisation au sein des cinq centres hospitaliers universitaires du quebec, protocole du programme de gestion thérapeutique des médicaments (pgtm).* Thèse d'exercice. France : Université Henri Poincaré, 2011.
117. TEILLAUD J.-L. « Qu'est-ce qu'une biothérapie ? L'exemple des anticorps monoclonaux ». *Presse Médicale.* mai 2009. Vol. 38, n°5, p. 825-831.
118. THOMPSON J. A., GRUNERT F., ZIMMERMANN W. « Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives ». *J. Clin. Lab. Anal.* 1991. Vol. 5, n°5, p. 344-366.
119. TOMANA M., NIEDERMEIER W., MESTECKY J., SKVARIL F. « The differences in carbohydrate composition between the subclasses of IgA immunoglobulins ». *Immunochemistry.* avril 1976. Vol. 13, n°4, p. 325-328.
120. TONEGAWA S. « Somatic generation of antibody diversity ». *Publ. Online 14 April 1983 Doi101038302575a0* 14 avril 1983. Vol. 302, n°5909, p. 575-581.
121. VERBEKE K., KIEFFER D., VANDERHEYDEN J.-L., REUTELINGSPERGER C.,

- STEINMETZ N., GREEN A., VERBRUGGEN A. « Optimization of the preparation of ^{99m}Tc-labeled Hynic-derivatized Annexin V for human use ». *Nucl. Med. Biol.* octobre 2003. Vol. 30, n°7, p. 771-778.
122. VILAIN D., PAPATHANASSIOU D. « Imagerie fonctionnelle : spécificité des nouveaux traceurs en médecine nucléaire ». *Rev. Médecine Interne.* mai 2012. Vol. 33, n°5, p. 241-243.
123. VOLET J., DE MESTIER L., EHRHARD F., BOUCHÉ O. « Actualités dans la prise en charge du cancer colorectal au JFHOD 2012 ». *Bull. Cancer (Paris).* juin 2012. Vol. 99, n°6, p. 703-713.
124. WAIBEL R., ALBERTO R., WILLUDA J., FINNERN R., SCHIBLI R., STICHELBERGER A., EGLI A., ABRAM U., MACH J. P., PLÜCKTHUN A., SCHUBIGER P. A. « Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex ». *Nat. Biotechnol.* septembre 1999. Vol. 17, n°9, p. 897-901.
125. WEISSER N. E., HALL J. C. « Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics ». *Biotechnol. Adv.* juillet 2009. Vol. 27, n°4, p. 502-520.
126. WOOF J. M., KERR M. A. « The function of immunoglobulin A in immunity ». *J. Pathol.* janvier 2006. Vol. 208, n°2, p. 270-282.
127. WOOF J. M., MESTECKY J. « Mucosal immunoglobulins ». *Immunol. Rev.* août 2005. Vol. 206, p. 64-82.
128. WOOF J. M., RUSSELL M. W. « Structure and function relationships in IgA ». *Mucosal Immunol.* novembre 2011. Vol. 4, n°6, p. 590-597.
129. YANG K., BASU A., WANG M., CHINTALA R., HSIEH M.-C., LIU S., HUA J., ZHANG Z., ZHOU J., LI M., PHYU H., PETTI G., MENDEZ M., JANJUA H., PENG P., LONGLEY C., BOROWSKI V., MEHLIG M., FILPULA D. « Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation ». *Protein Eng.* octobre 2003. Vol. 16, n°10, p. 761-770.
130. YAZAKI P. J., KASSA T., CHEUNG C., CROW D. M., SHERMAN M. A., BADING J. R., ANDERSON A.-L. J., COLCHER D., RAUBITSCHKEK A. « Biodistribution and tumor imaging of an anti-CEA single-chain antibody–albumin

fusion protein ». *Nucl. Med. Biol.* février 2008. Vol. 35, n°2, p. 151-158.

131. YAZAKI P. J., WU A. M., TSAI S. W., WILLIAMS L. E., IKLER D. N., WONG J. Y., SHIVELY J. E., RAUBITSCHEK A. A. « Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and t84.66 minibody: comparison to radioiodinated fragments ». *Bioconjug. Chem.* avril 2001. Vol. 12, n°2, p. 220-228.
132. YOO E. M., MORRISON S. L. « IgA: An immune glycoprotein ». *Clin. Immunol.* juillet 2005. Vol. 116, n°1, p. 3-10.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	5
Abréviations	6
Sommaire	8
Introduction générale	10
Chapitre 1: Revue bibliographique	13
I. Les immunoglobulines et leurs applications	13
A. Les immunoglobulines	13
1. Structure des immunoglobulines.....	13
2. Les différentes classes d'anticorps.....	16
3. Ontogénèse B et production physiologique des anticorps (Figure 3)	17
4. Fonctions effectrices et propriétés biologiques des anticorps	19
a. Le fragment Fab est responsable de la liaison à l'antigène :	20
b. Le fragment Fc définissant l'isotype et la sous-classe d'Ig est porteur des fonctions effectrices des Ig :	20
5. Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques des anticorps.....	22
a. Affinité et avidité.....	22
b. Métabolisme et physiologie des immunoglobulines.....	22
B. Les anticorps monoclonaux	23
1. Définition / découverte	23
2. Des anticorps monoclonaux chimériques aux anticorps monoclonaux humains	24
C. L'immunoglobuline G.....	27
1. Structure	27
2. Propriétés.....	27
a. Pharmacocinétique :	27
b. Fonctions physiologiques :	28
3. Utilisation des anticorps monoclonaux d'isotype G.....	29
4. Intérêts et limites des anticorps monoclonaux d'isotype G	35
D. Les anticorps optimisés.....	36
1. Les fragments d'anticorps (Figures 9 et 10):.....	37
a. Les fragments scFv	37

b.	Les Minibodies	38
c.	Les fragments multivalents scFvs (diabodies et triabodies).....	39
d.	Les anticorps fusionnés scFv- fusion proteins (105 kDa).....	39
2.	Les nanobodies et intrabodies	40
3.	Les anticorps bispécifiques	41
E.	L'immunoglobuline A.....	41
1.	Caractéristiques structurales des IgA.....	42
a.	Généralités	42
b.	Structure des IgA.....	44
IgA monomérique (mIgA).....	44	
IgA dimérique (dIgA)	44	
IgA sécrétoire (SIgA)	45	
3.	Production des IgA.....	46
a.	Switch α et site de synthèse de l'IgA.....	46
b.	Technologie HAMIGA	46
4.	Propriétés des IgA	47
a.	Récepteurs aux IgA (Table 3).....	47
i.	Récepteurs des immunoglobulines polymériques (pIgR).....	48
ii.	Récepteur Fc α RI (CD89).....	49
iii.	Les autres récepteurs d'IgA.....	50
iv.	Implication des IgA et de leurs récepteurs dans la néphropathie à IgA.....	51
b.	Fonctions effectrices de l'IgA (Figure 15)	52
i.	Mécanismes effecteurs directs médiés par l'IgA.....	52
ii.	Mécanismes effecteurs indirects de l'IgA	52
5.	Apports potentiels des IgA (Table 4)	54
II.	Les pathologies et les antigènes ciblés.....	56
A.	Les Lymphomes non Hodgkiniens.....	56
1.	Epidémiologie.....	56
2.	Histoire naturelle de la maladie	57
3.	Diagnostic.....	59
a.	Circonstances de découverte	59
b.	Démarche diagnostique	60
4.	Prise en charge thérapeutique	60
5.	Antigène CD20.....	61
B.	Le Cancer colorectal.....	63
1.	Epidémiologie.....	63
2.	Description	63
3.	Diagnostic.....	65

a.	Circonstances de découverte	65
b.	Démarche diagnostique	65
4.	Prise en charge thérapeutique	66
5.	Antigène ACE	68
III.	Radiomarquage des anticorps et applications	70
A.	Rappels de radioactivité.....	71
1.	Définition et unités de mesure.....	71
a.	Constante radioactive λ et décroissance radioactive	71
b.	Période physique.....	72
c.	L'activité	72
d.	Le transfert linéique d'énergie.....	72
2.	Rayonnements	73
a.	Emetteurs α	73
b.	Emetteurs β	74
c.	Emetteurs γ	75
B.	Applications des radioisotopes en thérapie et principaux REA utilisés pour le radiomarquage des Ac.....	76
1.	Définitions.....	76
2.	Principaux REA utilisés pour radiomarquer des Ac en thérapie	78
C.	Applications des radioisotopes en imagerie et principaux REA utilisés pour le radiomarquage des Ac.....	80
1.	Applications des radioisotopes en imagerie	80
a.	Applications en imagerie TEMP et TEP	80
b.	Cas particulier de l'application des radioisotopes chez le petit animal	83
i.	<i>In vivo</i> : Beta-MicroProbe.....	85
ii.	Les études de biodistribution <i>ex vivo</i>	85
iii.	<i>In vitro</i> : autoradiographie.....	86
2.	Principaux REA utilisés pour radiomarquer des Ac en diagnostic (Table 14) :	87
D.	Radiomarquage au technétium ^{99m}Tc	88
1.	Le technétium.....	88
2.	Propriétés physiques et production du technétium ^{99m}Tc	89
3.	Chimie du technétium.....	90
a.	Réduction du pertechnétate	91
b.	Structure générale des complexes technétiés	92
4.	Possibilités de radiomarquage par le ^{99m}Tc	95
a.	Approche par voie directe : complexation rapide (Figure 28)	95
b.	Approche intégrée	95

c. Marquage indirect : Approche bifonctionnelle.....	96
5. Méthode choisie pour le radiomarquage des IgA.....	101
Chapitre 2: Travail personnel	103
I. Premier partie : Radiomarquage des immunoglobulines G anti-CD20 avec le ^{99m}Tc-Tricarboxyl : évaluations <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>.....	104
A. Introduction.....	104
B. Etudes préliminaires.....	105
1. Optimisation du radiomarquage et choix des conditions de contrôle par radiochromatographie	105
a. Préparation et contrôle de la Pureté Radiochimique du [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺	106
b. Préparation et contrôle de la Pureté Radiochimique des Ig radiomarquées.....	108
2. Choix des conditions pour les expériences de binding sur cellules.....	110
C. Article : « Anti-CD20 immunoglobulin G radiolabeling with a ^{99m} Tc-tricarboxyl core: <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> evaluations »	113
D. Principaux résultats et discussion de l'article	131
II. Deuxième partie : Radiomarquage des Immunoglobulines A anti-ACE par le ^{99m}Tc et études de biodistribution.....	134
A. Introduction.....	134
B. Etudes préliminaires.....	135
1. Choix des lignées cellulaires pour les expériences de binding	135
2. Choix du modèle murin tumoral	137
C. Article : “ ^{99m} Tc radiolabeling of anti-CEA IgA: biodistribution and tumor uptake studies”	138
D. Résultats et discussion du deuxième article	167
E. Résultats complémentaires : radiomarquage des IgA sécrétoires anti-ACE et étude préliminaire de biodistribution après administration orale	169
1. Radiomarquage des IgA sécrétoires anti-ACE.....	169
2. Etude d'intégrité.....	169
3. Etude de biodistribution des SIgA après administration orale	170
a. Méthode.....	170
b. Résultats et discussion.....	170
Chapitre 3: Discussion générale et perspectives	174
I. Optimisation d'une technique de radiomarquage des anticorps	174
II. Etude de biodistribution des IgA versus IgG chez l'animal sain	175
III. Etude de biodistribution des IgA versus IgG chez l'animal porteur de tumeur ...	176

IV. Perspectives et limites des IgA	177
Conclusion	179
Bibliographie	180

Table des illustrations

Figure 1 : Structure des Immunoglobulines (Ig)	15
Figure 2 : Les cinq classes d'Ig (d'après Schroeder et Cavacini, 2010)	17
Figure 3 : Etape de l'ontogénèse B (d'après Hardy, 2007)	19
Figure 4 : Hydrolyse enzymatique des immunoglobulines par la papaïne et la pepsine	20
Figure 5 : Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps (ADCC) et Cytotoxicité Dépendante du Complément (CDC)	21
Figure 6 : Génération d'anticorps monoclonaux humains	26
Figure 7 : Evolution de l'humanisation des anticorps monoclonaux (d'après Cogné, 2009) ...	26
Figure 8 : Mécanismes d'action des principaux anticorps	30
Figure 9 : Représentation schématique d'un anticorps conventionnel (Intact antibody), et de fragments d'anticorps	38
Figure 10 : Optimisation de la biodistribution intratumorale des anticorps	40
Figure 11 : Modèle moléculaire des IgA1 et des IgA2m(1) humaines	42
Figure 12: Représentation schématique des différentes formes monomériques, dimériques (dIgA1) et sécrétoires (sIgA1) d'IgA humaine	43
Figure 13 : Synthèse des IgA sécrétoires	45
Figure 14 : Les différents récepteurs des IgA	47
Figure 15 : Rôle des IgA dans la protection des muqueuses (d'après Woof, 2005)	53
Figure 16 : Les divers stades du cancer colorectal (d'après L'association canadienne du Cancer Colorectal)	64
Figure 17 : Pouvoir de pénétration des différents rayonnements ionisants	73
Figure 18 : Principe de fonctionnement d'une caméra TEP (site laradioactivite.com)	75
Figure 19 : Principe de fonctionnement d'une gamma-caméra (site laradioactivite.com)	76
Figure 20 : Image d'un rat équipé de sondes dans des régions spécifiques du cerveau.	85
Figure 21 : Schéma de désintégration du ^{99}Mo	89
Figure 22 : Générateur de molybdène $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	90
Figure 23 : Diagramme potentiel-pH du technétium dans l'eau à 25°C	91
Figure 24 : Principaux coeurs de technétium et état d'oxydation du coeur métallique	92
Figure 25 : Coeur monoxotechnétium	93

Figure 26 : Structure du ^{99m}Tc -HMPAO	93
Figure 27 : Structure du ^{99m}Tc -MIBI.....	94
Figure 28 : Réaction de marquage par voie directe (X = oxygène)	95
Figure 29 : Stratégie de marquage de peptide par approche intégrée (en rouge : le métal et en bleu : le motif de chélation).....	96
Figure 30 : Réaction de marquage par l'intermédiaire d'un chélate bifonctionnel.....	96
Figure 31 : Structure du complexe ^{99m}Tc -HYNIC-peptide	98
Figure 32 : ^{99m}Tc -Mertiatide	99
Figure 33 : Coeur tricarbonyl. M correspond à l'atome de ^{99m}Tc	99
Figure 34 : Réaction des acides aminés avec le 2-IT. Formation du groupe MBG.	102
Figure 35 : Etapes du radiomarquage des Ig avec le ^{99m}Tc	106
Figure 36 : Radiochromatogrammes du ^{99m}Tc -Isolink [®]	108
Figure 37 : Radiochromatogrammes sur support ITLC-SG en phase mobile NaCl 0,9%.....	110
Figure 38 : Détermination de la concentration en Ac froid à utiliser pour les études d'affinité sur cellules.....	112
Figure 39 : Immunoaffinité des IgA anti-ACE après radiomarquage sur cellules HT29	136
Figure 40 : Photographies de caecums tumoraux après greffe orthotopique de cellules WiDr	137

Table des tables

Table 1 : Liste des anticorps monoclonaux utilisés en thérapie (Liste non exhaustive)	34
Table 2 : Liste des anticorps monoclonaux utilisés en diagnostic (Liste non exhaustive).....	35
Table 3 : Les différents récepteurs des IgA.....	48
Table 4 : Récapitulatif des propriétés physiques, chimiques et biologiques des IgG et des IgA humaines.....	55
Table 5 : Lymphomes Non Hodgkiniens de l'adulte	58
Table 6 : Classification cytologique des Lymphomes Non Hodgkiniens	59
Table 7 : Prise en charge thérapeutique des Cancers Colorectaux.....	68
Table 8 : Parcours et TEL des différents rayonnements ionisants	74
Table 9 : Principaux radionucléides β^- utilisés en RIT.....	79
Table 10 : Principaux radionucléides α utilisés en RIT	79
Table 11 : Principaux radionucléides utilisés en diagnostic en Médecine Nucléaire	82
Table 12: Comparaison clinique et préclinique des propriétés de l'imagerie TEP et TEMP...	82
Table 13 : Comparaison des différentes techniques d'imagerie disponibles.....	84
Table 14 : Principaux radionucléides utilisés en RIS.....	88
Table 15 : Rapports Frontaux (RF) en CCM de chaque espèce chimique pouvant être présente dans le " ^{99m} Tc-Isolink [®] " et dans le " ^{99m} Tc-Ig"	108
Table 16 : Biodistribution des IgA sécrétoires anti-ACE radiomarquées après administration orale chez des souris BALB/c saines à 1h, 2h, 4h et 8h.....	171
Table 17 : Biodistribution des IgG anti-CD20 radiomarquées après administration orale chez des souris BALB/c saines à 1h, 2h, 4h et 8h	171

