



HAL
open science

Développement de nouveaux radioligands pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1

Alizée Bouleau

► **To cite this version:**

Alizée Bouleau. Développement de nouveaux radioligands pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1. Médecine nucléaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPAST130 . tel-03521691

HAL Id: tel-03521691

<https://theses.hal.science/tel-03521691v1>

Submitted on 11 Jan 2022

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

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

Développement de nouveaux radioligands pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1

Development of new radioligands for immunoPET imaging of PD-L1

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°575 – Physique et ingénierie : Electrons, Photons, Sciences
du Vivant (EOBE)
Spécialité de doctorat : Imagerie et physique médicale
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Inserm, Laboratoire d'Imagerie
Biomédicale Multimodale Paris-Saclay, 91401, Orsay, France.
Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 26/11/2021, par

Alizée BOULEAU

Composition du Jury

Bernard MAILLÈRE Directeur de recherche, CEA Paris-Saclay	Président
Françoise KRAEBER-BODERE Professeure des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Nantes	Rapporteuse & Examinatrice
Elisabeth NOIRAULT Maître de conférences (HDR), INSERM, Université Clermont Auvergne	Rapporteuse & Examinatrice
Lucie SANCEY Directrice de recherche, CNRS, Université Grenoble Alpes	Examinatrice

Direction de la thèse

Vincent LEBON Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
Charles TRUILLET Chargé de recherche, CEA Paris-Saclay	Co-encadrant de thèse

Invités

Vincent LOMBARDI Chef d'équipe immunologie <i>in vitro</i> en sciences cellulaires, Servier
Lambros TSELIKAS Praticien Hospitalier, Institut de Cancérologie Gustave Roussy

Remerciements

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté et pris le temps de lire et d'évaluer ce travail.

Je remercie mon directeur de thèse M. Vincent Lebon, directeur de l'unité d'imagerie biomédicale multimodale BioMaps, pour avoir rendu possible la réalisation de cette thèse.

Je remercie mon encadrant de thèse M. Charles Truillet, chercheur au sein de l'équipe Imagerie en Oncologie de BioMaps, pour la confiance qu'il m'a accordée en me donnant l'opportunité de travailler sur ce projet de thèse. Un grand merci pour son intérêt scientifique, pour son aide précieuse sur les expériences, ainsi que pour ses efforts constants pour maintenir un environnement de recherche optimal. Je tiens également à le remercier pour sa disponibilité et sa réactivité quant à la relecture méthodique de mon manuscrit de thèse.

Je remercie M. Bernard Maillère, directeur du Laboratoire d'Immunogénicité Cellulaire et Biotechnologies (LICB), pour son implication dans ce projet. Je remercie également vivement M. Hervé Nozach, chercheur au LICB, et M. Steven Dubois, technicien de recherche au LICB, pour avoir développé et produit les anticorps utilisés durant ma thèse. Ces travaux de recherche n'auraient pas pu être menés à bien sans leur expertise et leurs idées innovantes.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe Imagerie en Oncologie de BioMaps avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler. Un remerciement tout particulier à Mme. Gwendoline Torquet et M. Dimitri Kereselidze, techniciens de recherche, pour leur soutien sur les expériences *in vivo*. Les longues journées d'imagerie sont passées plus vite en leur compagnie. Je remercie aussi M. Vu Long Tran, post-doctorant, pour sa générosité et sa gentillesse, ainsi que pour le partage de ses connaissances scientifiques. Merci à Céline Chevalere, doctorante, pour son aide sur l'analyse pharmacocinétique. Enfin, un grand merci à Mme. Gaelle Hugon, ma fidèle co-thésarde, pour son soutien moral à toute épreuve. Ces trois années de thèse auraient eu une toute autre saveur sans sa bonne humeur et son réapprovisionnement constant du bureau en chocolat.

Je remercie M. Jean-Marc Bertho, chercheur en radioprotection, pour m'avoir permis d'utiliser le logiciel de dosimétrie RODES. Je remercie également M. Sébastien Jan, chercheur dans l'équipe Développements Méthodologiques et Instrumentation de BioMaps, pour son aide et sa relecture attentive du chapitre de ma thèse consacré à l'analyse dosimétrique.

Je remercie également M. Guillaume Mottet, chercheur chez Sanofi, pour avoir accepté d'être mon mentor dans le cadre du programme mis en place par l'Université Paris-Saclay et l'association Femmes et Sciences. Merci pour ces riches échanges sur le monde de la recherche et pour les précieux conseils quant à la suite de mon projet professionnel.

Je remercie tous les chercheurs et le personnel de BioMaps que j'ai eu le plaisir de croiser durant ces 3 années et qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail. Un remerciement particulier à M. Fabien Rastello, Mme. Mylène Richard, M. Simon Specklin, M. Florent Besson, M. Vincent Brulon et M. Claude Comtat.

Enfin, je remercie mes proches pour leurs attentions et leurs encouragements tout au long de ce projet de thèse. Une pensée particulière pour mes grands-parents, et surtout pour mes parents pour leur confiance et leur soutien indéfectibles.

Table des matières

Liste des tableaux	7
Liste des figures.....	9
Liste des abréviations.....	13
Introduction générale	17
I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP dans des modèles précliniques de CPNPC humains	33
Introduction.....	33
1. Imagerie TEP de PD-L1 avec différents formats de radioligands	34
1.1. Imagerie TEP de PD-L1 avec des anticorps IgGs radiomarqués	34
1.2. Optimisation de l'imagerie TEP de PD-L1 avec des fragments d'anticorps et des petites protéines radiomarqués.....	39
1.3. Optimisation de l'imagerie TEP de PD-L1 par suppression de l'interaction entre les IgGs radiomarqués et le récepteur Fc néonatal.....	44
2. Mise en place des modèles précliniques de cancer du poumon non à petites cellules humain	48
2.1. Sélection des lignées cellulaires humaines de CPNPC par Western Blot.....	48
2.1. Caractérisation de l'expression de PD-L1 par les lignées cellulaires de CPNPC par cytométrie de flux.....	50
2.2. Production des modèles de xénogreffes humaines de CPNPC	53
2.3. Caractérisation de l'expression de PD-L1 dans les tumeurs de CPNPC par cytométrie de flux.....	54
2.4. Caractérisation de l'expression de PD-L1 dans les tumeurs de CPNPC par immunohistochimie.....	57
3. Production et caractérisation des radioligands C4	58
3.1. Production des ligands C4	58
3.2. Mesure de l'affinité des ligands C4 pour la protéine PD-L1 humaine par interférométrie bio-couche.....	59
3.3. Radiomarquage des ligands C4 au zirconium-89.....	62
3.4. Test de liaison des radioligands C4 aux cellules de CPNPC PD-L1 ⁺	66
4. Imagerie TEP/TDM de PD-L1 avec les radioligands C4 dans les modèles précliniques de CPNPC humain	67
4.1. Présentation des expériences d'imagerie TEP/TDM longitudinale réalisées.....	67
4.2. Pharmacocinétique sanguine des radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC PD-L1 ⁺	69

4.2.1.	Biodistribution sanguine des radioligands C4.....	70
4.2.2.	Modélisation de la PK plasmatique des radioligands C4.....	70
4.3.	Accumulation des radioligands C4 dans les xéogreffes humaines de CPNPC PD-L1 ⁺	72
4.3.1.	Accumulation du ⁸⁹ Zr-IgG C4 dans les xéogreffes H1975	73
4.3.2.	Accumulation du ⁸⁹ Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) dans les xéogreffes H1975	75
4.3.3.	Accumulation du ⁸⁹ Zr-Fab C4 dans les xéogreffes H1975	75
4.3.4.	Intérêt translationnel de l'utilisation du ⁸⁹ Zr-IgG C4 mutant et du ⁸⁹ Zr-Fab C4	75
4.4.	Comparaison de l'accumulation des radioligands C4 dans les xéogreffes humaines de CPNPC PD-L1 ⁺ et PD-L1 ⁻	76
4.5.	Expériences de blocking avec les radioligands C4 dans les modèles précliniques de CPNPC PD-L1 ⁺ et PD-L1 ⁻	78
4.6.	Accumulation des radioligands C4 dans les tissus sains dans le modèle préclinique de CPNPC PD-L1 ⁺	81
4.6.1.	Accumulation des radioligands C4 dans le foie.....	82
4.6.2.	Accumulation des radioligands C4 dans les reins	84
4.6.3.	Accumulation des radioligands C4 dans la rate.....	85
4.6.4.	Accumulation des radioligands C4 dans les os	86
4.6.5.	Impact de l'expression endogène de PD-L1 dans les tissus sains sur la biodistribution des radioligands anti-PD-L1	86
	Conclusion	87
	Références.....	89
II. Etude dosimétrique des radioligands C4 utilisés pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1		
	Introduction.....	95
1.	Concepts et définitions de base	96
1.1.	Définitions de la dose absorbée, de la dose équivalente et de la dose efficace.....	96
1.2.	Effets biologiques des rayonnements ionisants.....	98
1.3.	Intérêt de la dosimétrie interne en médecine nucléaire	100
2.	Calcul de dose interne	100
2.1.	Equations pour le calcul de dose absorbée.....	100
2.2.	Détermination de l'activité cumulée dans les organes sources	103
2.3.	Calcul des facteurs S.....	104
3.	Dosimétrie murine des radioligands C4	106
3.1.	Présentation du calcul de dose avec le logiciel RODES	106

3.2.	Calcul des activités cumulées dans les organes sources.....	107
3.3.	Calcul des doses absorbées par les organes cibles	111
4.	Dosimétrie humaine des radioligands C4	114
4.1.	Présentation du calcul de dose avec le logiciel IDAC-Dose.....	114
4.2.	Calcul des temps de résidence dans les organes sources.....	114
4.3.	Calcul des doses absorbées par les organes cibles	115
	Conclusion	118
	Références.....	119
III.	Suivi de la dynamique d'expression tumorale de PD-L1 dans des modèles de CPNPC humain	123
	Introduction.....	123
1.	Régulation dynamique de l'expression tumorale de PD-L1 et suivi des variations d'expression par imagerie TEP	124
1.1.	Régulation de l'expression tumorale de PD-L1 par de nombreux mécanismes	124
1.2.	Régulation de l'expression tumorale de PD-L1 par la voie mTOR.....	127
1.3.	Régulation de l'expression tumorale de PD-L1 par les protéines BET	130
1.4.	Suivi des variations d'expression tumorale de PD-L1 induites par divers traitements par imagerie TEP	133
2.	Etude de l'effet de différents traitements sur l'expression de PD-L1 dans des lignées cellulaires humaines de CPNPC	135
2.1.	Effet du traitement everolimus sur l'expression de PD-L1 par les cellules humaines de CPNPC	135
2.2.	Effet du traitement JQ1 sur l'expression de PD-L1 par les cellules humaines de CPNPC.....	136
	Conclusion	138
	Références.....	141
	Conclusion générale.....	145
	Annexe 1. Matériels et Méthodes	149
	Annexe 2. Biodistribution <i>in vivo</i> des radioligands C4 anti-PD-L1 dans les modèles de CPNPC humain PD-L1 ⁺ et PD-L1 ⁻ – Tableaux de valeurs	171
	Annexe 3. Publications scientifiques et communications.....	175

Liste des tableaux

Tableau 1. Les anticorps monoclonaux anti-PD-1 et anti-PD-L1 approuvés par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) pour le traitement du CPNPC avancé.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 2. Tests IHC anti-PD-L1 compagnons ou complémentaires associés aux immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1 indiquées dans le traitement du CPNPC.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 3. Radionucléides fréquemment utilisés dans les études TEP précliniques/cliniques.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 4. Imagerie immunoTEP de PD-L1 avec des IgGs anti-PD-L1 radiomarqués.	37
Tableau 5. Imagerie TEP de PD-L1 avec des fragments d'anticorps et des petites protéines anti-PD-L1 radiomarqués.	42
Tableau 6. Etudes avec des anticorps/fragments d'anticorps radiomarqués porteurs de mutations supprimant leur interaction avec le FcRn.	47
Tableau 7. Lignées cellulaires humaines de CPNPC cultivées et analysées par Western Blot pour l'expression de PD-L1.	49
Tableau 8. Constantes cinétiques de liaison des ligands C4 à la protéine PD-L1 humaine.	60
Tableau 9. Constante d'affinité K_D de divers ligands anti-PD-L1 pour la protéine PD-L1 humaine.	61
Tableau 10. Caractérisation des expériences de radiomarquage des ligands C4 au ^{89}Zr	65
Tableau 11. Résumé des expériences d'imagerie TEP/TDM longitudinale réalisées avec les radioligands C4 anti-PD-L1 dans les modèles de xénogreffes humaines de CPNPC PD-L1 ⁺ et PD-L1 ⁻	68
Tableau 12. Pharmacocinétique plasmatique des radioligands C4.	71
Tableau 13. Accumulation tumorale de divers radioligands anti-PD-L1 dans des modèles précliniques de cancer du poumon humain PD-L1 ⁺	74
Tableau 14. Comparaison de l'accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 dans les tissus sains quantifiée par analyse des images TEP/TDM ou par biodistribution <i>ex vivo</i>	85
Tableau 15. Valeurs du facteur de pondération tissulaire w_T recommandées par la CIPR pour le calcul de dose efficace.	97
Tableau 16. Limites de dose annuelles pour le public et les travailleurs.	99
Tableau 17. Paramètres et quantités utilisés pour le calcul de dose interne selon le formalisme défini dans le Pamphlet 21 du MIRD.	101
Tableau 18. Expériences d'imagerie TEP/TDM longitudinale réalisées avec les radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC humain H1975.	107
Tableau 19. Masse et volume des organes sources et du corps entier définis pour le fantôme RODES souris femelle adulte.	108
Tableau 20. Doses absorbées par les organes cibles murins pour les radioligands C4.	112
Tableau 21. Comparaison entre les masses des organes des souris utilisées expérimentalement et les masses des organes du fantôme RODES de souris femelle adulte.	113
Tableau 22. Doses absorbées par les organes cibles humains estimées à partir des données biocinétiques murines des radioligands C4. Les données sont présentées comme la valeur moyenne \pm l'écart-type. ...	116

Tableau 23. Dosimétrie effectuée dans diverses études immunoTEP cliniques avec des anticorps ou fragments d'anticorps radiomarqués au ^{89}Zr	117
Tableau 24. Effet de l'inhibition des protéines BET avec JQ1 sur l'expression tumorale de PD-L1.	132
Tableau 25. Essais cliniques incluant l'imagerie TEP de PD-L1.	146
Tableau 26. Liste des produits chimiques et des composés communément utilisés pour les expériences.	149
Tableau 27. Lignées cellulaires humaines de CPNPC utilisées.	152
Tableau 28. Liste des anticorps primaires utilisés pour les expériences de Western Blot.....	156
Tableau 29. Liste des anticorps secondaires conjugués à l'enzyme peroxydase de raifort (HRP) utilisés pour les expériences de Western Blot.	157
Tableau 30. Validation du modèle bi-compartimental pour modéliser la PK plasmatique des radioligands C4 par « Visual Predictive Check » (VPC).....	163
Tableau 31. Evaluation de l'exactitude et de la stabilité des paramètres PK estimés avec le modèle bi-compartimental par « bootstrap ».	163
Tableau 32. Liste des composés fluorescents utilisés pour les expériences de cytométrie de flux.	165
Tableau 33. Réglages des canaux de détection du cytomètre utilisés pour les expériences de cytométrie de flux.	166
Tableau 34. Biodistribution des radioligands C4 dans le modèle de CPNPC humain PD-L1 ⁺	171
Tableau 35. Biodistribution des radioligands C4 dans les modèles de CPNPC PD-L1 ⁺ et PD-L1 ⁻	172
Tableau 36. Expériences de blocage avec les radioligands C4 dans les modèles de CPNPC humain PD-L1 ⁺ et PD-L1 ⁻	173

Liste des figures

Figure 1. Le cycle de l'immunité anti-cancéreuse.....	18
Figure 2. Détournement de la voie des points de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1 par la cellule tumorale.....	19
Figure 3. Les différentes étapes d'un examen TEP.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 4. Structure d'une immunoglobuline ou anticorps G (IgG).....	34
Figure 5. Imagerie TEP de PD-L1 avec l'IgG C4, le minibody C4 et le scFv C4 radiomarqués au ⁸⁹ Zr dans un modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1+.....	35
Figure 6. Imagerie TEP de PD-L1 avec l'anticorps atezolizumab ou l'adnectine BMS-986192 radiomarqués chez des patients souffrant de cancers avancés.....	36
Figure 7. Le mécanisme de recyclage cellulaire des IgGs orchestré par le récepteur Fc néonatal (FcRn).	39
Figure 8. Imagerie TEP préclinique de PD-L1 avec divers petits radioligands anti-PD-L1.....	41
Figure 9. Différents formats de radioligands disponibles pour l'imagerie TEP de PD-L1.....	44
Figure 10. Modulation de l'interaction IgG-FcRn par modification génétique du fragment Fc de l'IgG.	45
Figure 11. Imagerie TEP de la protéine CEA avec différents fragments d'anticorps 124I-scFv-Fc mutants présentant une affinité réduite pour le FcRn murin.....	46
Figure 12. Caractérisation de l'expression de PD-L1 dans diverses lignées humaines de CPNPC par Western Blot.....	50
Figure 13. Stratégie de « gating » appliquée aux expériences de cytométrie de flux sur les cellules humaines de CPNPC cultivées in vitro.....	51
Figure 14. Titration de l'anticorps anti-PD-L1 fluorescent avec les cellules humaines de CPNPC PD-L1+.....	52
Figure 15. Caractérisation de l'expression de PD-L1 par les cellules humaines de CPNPC par cytométrie de flux.....	52
Figure 16. Chevauchement des spectres d'émission des fluorophores PE et FITC.....	54
Figure 17. Stratégie de « gating » appliquée aux expériences de cytométrie de flux sur les cellules issues des tumeurs de CPNPC.....	55
Figure 18. Caractérisation de l'expression in vivo de PD-L1 dans les tumeurs H1975 et A549 par cytométrie de flux.....	56
Figure 19. IHC anti-PD-L1 et coloration H&E des coupes de tumeurs H1975 et A549.....	57
Figure 20. Représentation schématique des différentes étapes de production et de purification des ligands C4 anti-PD-L1.....	59
Figure 21. Cinétique de liaison de l'IgG C4 à la protéine PD-L1 humaine mesurée par interférométrie bio-couche.....	60
Figure 22. Schéma de désintégration du zirconium-89.....	62

Figure 23. Représentation schématique des différentes étapes de radiomarquage et de caractérisation des radioligands C4 anti-PD-L1.	63
Figure 24. Evaluation de la pureté radiochimique des solutions de radioligands C4 par chromatographie sur couche mince.	64
Figure 25. Evaluation de la pureté radiochimique des radioligands C4 par chromatographie liquide haute pression.	65
Figure 26. Test de liaison des radioligands C4 aux cellules de CPNPC PD-L1+.	66
Figure 27. Représentation schématique des différentes étapes d'une expérience d'imagerie TEP/TDM longitudinale.	68
Figure 28. Corrélation entre la quantification de l'accumulation des radioligands C4 dans les tissus par biodistribution ex vivo et par analyse des images TEP/TDM.	69
Figure 29. Biodistribution sanguine des radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1+.	70
Figure 30. Représentation schématique du modèle bi-compartmental avec injection intraveineuse et élimination d'ordre 1.	71
Figure 31. Imagerie TEP/TDM de PD-L1 avec les radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1+.	72
Figure 32. Biodistribution des radioligands C4 dans les xénogreffes humaines de CPNPC PD-L1+.	73
Figure 33. Imagerie TEP/TDM de PD-L1 avec les radioligands C4 dans les modèles précliniques de CPNPC humain PD-L1+ et PD-L1-.	77
Figure 34. Biodistribution des radioligands C4 dans les xénogreffes humaines de CPNPC PD-L1+ et PD-L1-.	78
Figure 35. Imagerie TEP/TDM de PD-L1 avec les radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1+ avec ou sans blocking.	79
Figure 36. Expériences de blocking avec les radioligands C4 dans les modèles précliniques de CPNPC humain PD-L1+ et PD-L1-.	80
Figure 37. Biodistribution des radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC PD-L1+.	81
Figure 38. Accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 et du ^{89}Zr -IgG C4 mutant dans le foie.	82
Figure 39. Catabolisme des IgGs radiomarqués dans le foie en l'absence de recyclage par le FcRn.	83
Figure 40. Accumulation du fragment ^{89}Zr -Fab C4 dans les reins.	84
Figure 41. Exposition moyenne d'un individu en France métropolitaine aux diverses sources de radioactivité naturelles et artificielles.	95
Figure 42. Relation entre la dose absorbée, la dose équivalente et la dose efficace.	98
Figure 43. Exemples de fantômes numériques anthropomorphiques.	105
Figure 44. Exemples de fantômes numériques de rongeurs.	105
Figure 45. Segmentation des organes sources et du corps entier sur les images TEP obtenues avec les radioligands C4.	108
Figure 46. Intégration de la courbe TAC de chaque organe source.	110
Figure 47. Régulation de l'expression tumorale de PD-L1.	126

Figure 48. Activation de la synthèse protéique par le complexe mTORC1.....	128
Figure 49. Effet de l'inhibition de la voie mTOR sur l'expression de PD-L1 dans la lignée cellulaire humaine de CPNPC H1975.	129
Figure 50. Régulation de la transcription par la protéine BRD4.	131
Figure 51. Détection par imagerie TEP des variations d'expression tumorale de PD-L1 après chimiothérapie dans un modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1+.....	134
Figure 52. Caractérisation par WB de l'effet du traitement everolimus sur l'expression de PD-L1 dans des lignées cellulaires humaines de CPNPC.....	135
Figure 53. Caractérisation par WB de l'effet du traitement JQ1 sur l'expression de PD-L1 dans des lignées cellulaires humaines de CPNPC.	137
Figure 54. Caractérisation par cytométrie de flux de l'effet du traitement JQ1 sur l'expression de PD-L1 dans une lignée cellulaire humaine de CPNPC.	138
Figure 55. Protocole mis en place pour évaluer par imagerie TEP la variation d'expression tumorale de PD-L1 induite par JQ1 dans un modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1+.....	139
Figure 56. Validation du modèle bi-compartmental pour modéliser la PK plasmatique des radioligands C4 par « Visual Predictive Check » (VPC).....	162

Liste des abréviations

Ac : acétylation.
ADN : acide désoxyribonucléique.
ADNc : ADN complémentaire.
ADP : adénosine diphosphate.
Ala (A) : alanine.
ALK : « anaplastic lymphoma kinase ».
AMM : autorisation de mise sur le marché.
Arg (R) : arginine.
ARRIVE : « Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments ».
ARN : acide ribonucléique.
ARNm : ARN messenger.
ARN Pol II : ARN polymérase II.
Asn (N) : asparagine.
ASN : Autorité de Sûreté Nucléaire.
Asp (D) : aspartate.
ATCC : « American Type Culture Collection ».
ATP : adénosine triphosphate.
BCA : acide bicinchoninique.
BET : bromodomaine et domaine extraterminal.
BLI : interférométrie bio-couche.
BMS : Bristol-Myers Squibb.
BP : filtre passe-bande.
BPF : bonnes pratiques de fabrication.
Bq : becquerel.
BRD : bromodomaine.
BSA : albumine de sérum bovin.
CCM : chromatographie sur couche mince.
CDKN2A : « cyclin dependent kinase inhibitor 2A ».
CEA : antigène carcinoembryonnaire.
CEEA : comité d'éthique pour l'expérimentation animale.
CETEC : carcinome épidermoïde de la tête et du cou.
CHO : « Chinese hamster ovary ».
CIPR : Commission Internationale de Protection Radiologique.
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.
CPNPC : cancer du poumon non à petites cellules.
CPPC : cancer du poumon à petites cellules.
CSTN : cancer du sein triple négatif.
CTLA-4 : « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 ».
DAB : 3-3'-diaminobenzidine.
Deptor : « DEP-domain-containing mTOR-interacting protein ».
DFO : desferrioxamine.
DMEM : milieu Eagle modifié de Dulbecco.
DMSO : diméthylsulfoxyde.
DPBS : « Dulbecco's phosphate-buffered saline ».
EANM : « European Association of Nuclear Medicine ».
EGF : « epidermal growth factor ».
EGFR : « epidermal growth factor receptor ».

eIF4E : « eukaryotic translation initiation factor 4E ».
EMA : Agence Européenne du Médicament.
EPR : « enhanced permeability and retention effect ».
ERK : « extracellular signal-regulated kinase ».
Fab : « fragment antigen binding ».
Fc : fragment cristallisable.
Fc γ RI : récepteur Fc-gamma I.
FcRn : récepteur Fc néonatal.
FITC : isothiocyanate de fluorescéine.
Fn3 : domaine de type III de la fibronectine humaine.
Foxn1 : « forkhead box N1 ».
FRA1 : « Fos-related antigen 1 ».
FSC : « forward scatter ».
Fv : fragment variable.
Gln (Q) : glutamine.
Glu (E) : glutamate.
Gy : gray.
HAC : « high-affinity consensus ».
HIF : « hypoxia inducible factor ».
His (H) : histidine.
HPLC : chromatographie liquide haute pression.
HRP : peroxydase de raifort.
H&E : hématoxyline/éosine.
IC : cellules immunitaires.
ICI : inhibiteurs de points de contrôle immunitaire.
IDAC : « Internal Dose Assessed by Computer ».
IFN : interféron.
IFN- γ R : récepteur de l'interféron IFN-gamma.
IgG : immunoglobuline G.
IHC : immunohistochimie.
IL : interleukine.
Ile (I) : isoleucine.
ip. : intrapéritonéal.
IRF1 : « interferon regulatory factor 1 ».
IRM : imagerie par résonance magnétique.
IRSN : Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire.
ITIM : « immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif ».
ITSM : « immunoreceptor tyrosine-based switch motif ».
JAK : « Janus kinase ».
KO : « knockout ».
Leu (L) : leucine.
MEK : « mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase ».
Met (M) : méthionine.
MFI : intensité de fluorescence médiane.
miARN : micro-ARN.
MIRD : « Medical Internal Radiation Dose ».
mLST8 : « mammalian lethal with Sec13 protein 8 ».
mTOR : « mechanistic target of rapamycin ».
NF- κ B : « nuclear factor-kappa B ».
NK : « Natural Killer ».

NRD : niveaux de référence diagnostiques.
NURBS : « non-uniform rational B-splines ».
OP-OSEM : « ordinary poisson ordered-subset expectation maximization ».
OS-MAP : « ordered-subset maximum *a posteriori* ».
PBS : « phosphate-buffered saline ».
PD-1 : « programmed cell death protein 1 ».
PD-L1 : « programmed cell death-ligand 1 ».
PDX : « patient-derived xenograft ».
PE : phycoérythrine.
PEI : polyéthylèneimine.
PERCIST : « PET Response Criteria in Solid Tumors ».
p.i. : post-injection.
PI3K : « phosphoinositide 3-kinase ».
PK : pharmacocinétique.
PM : « polygon mesh ».
PMT : tube photomultiplicateur.
p-NCS-Bz-DFO : p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine.
PRAS40 : « proline rich AKT substrate 40 kDa ».
Pro (P) : proline.
PRRT : thérapie radionucléide par récepteur de peptide.
PSM : poste de sécurité microbiologique.
P-TEFb : « positive transcription elongation factor ».
PTEN : « phosphatase and tensin homolog ».
PVDF : fluorure de polyvinylidène.
RADAR : « Radiation Dose Assessment Ressource ».
Raptor : « regulatory-associated protein of mTOR ».
RODES : « Rodent Dose Evaluation Software ».
sc. : sous-cutané.
scFv : « single-chain variable fragment ».
SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.
Ser (S) : sérine.
SI : système international d'unités.
SNMMI : Société de Médecine Nucléaire et d'Imagerie Moléculaire.
SPR : résonance de plasmons de surface.
SSC : « side scatter ».
STAT : « signal transducer and activator of transcription ».
STK11 : « serine/threonine kinase 11 ».
SUV : « standardized uptake value ».
Sv : sievert.
SVF : sérum de veau foetal.
S6 : « p70 ribosomal protein S6 ».
S6K1 : « p70 ribosomal protein S6 kinase 1 ».
TAC : « time-activity curve ».
TBR : ratio de signal tumeur/sang.
TBS : « tris-buffered saline ».
TCR : « T-cell receptor ».
TDM : tomodensitométrie.
TEP : tomographie par émission de positons.
TGF- β : « transforming growth factor beta ».
Thr (T) : thréonine.

TME : microenvironnement tumoral.
TMR : ratio de signal tumeur/muscle.
TNF : « tumor necrosis factor ».
TNM : « tumor node metastasis ».
TPS : score de proportion tumorale.
TSM : temps de survie médian.
Tyr (Y) : tyrosine.
UV : ultra-violet.
Val (V) : valine.
VEGF : « vascular endothelial growth factor ».
Veh : véhicule.
VIH : virus de l'immunodéficience humaine.
VOI : « Volume of interest ».
VPC : « Visual Predictive Check ».
WB : Western Blot.
WT : « wild-type ».
% ID/cm³ : pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu.
% ID/g : pourcentage de dose injectée par gramme de tissu.
3'-UTR : région 3' non traduite.
4E-BP1 : « eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 ».
¹¹C : carbone-11.
¹⁸F : fluor-18.
¹⁸F-FDG : ¹⁸F-fluorodésoxyglucose.
⁵⁷Co : cobalt-57.
⁶⁴Cu : cuivre-64.
⁶⁸Ga : gallium-68.
⁸⁸Y : yttrium-88.
⁸⁸Zr : zirconium-88.
⁸⁹Y : yttrium-89.
^{89m}Y : yttrium-89 métastable.
⁸⁹Zr : zirconium-89.
^{99m}Tc : technétium-99m.
¹¹¹In : indium-111.
¹²⁴I : iode-124.
¹²⁵I : iode-125.
¹³¹I : iode-131.
¹⁷⁷Lu : lutécium-177.
²²⁵Ac : actinium-225.

Introduction générale

Notre système immunitaire nous défend en permanence contre le cancer, en détectant et en éliminant les cellules tumorales naissantes. Néanmoins, à côté de cette fonction protectrice, le système immunitaire participe également à la progression du cancer, en favorisant la sélection naturelle des tumeurs les moins immunogènes (Vesely *et al.*, 2011). Ce double rôle joué par l'immunité anti-tumorale a donné naissance au concept d'immunoédition (« immunoediting »), définissant l'interaction dynamique entre le système immunitaire et la tumeur selon 3 phases séquentielles (les « 3 Es ») : élimination, équilibre et échappement (Schreiber, Old and Smyth, 2011).

Au cours de la phase d'élimination, l'immunité innée et l'immunité adaptative collaborent pour identifier et détruire les cellules tumorales. Bien que longtemps débattu, ce processus d'immunosurveillance anti-tumorale a été validé par de nombreux travaux précliniques. Ces études ont montré que des souris déficientes en cellules ou en molécules clés de l'immunité innée (par ex. cellules Natural Killer [NK]) ou de l'immunité adaptative (par ex. lymphocytes T et B, interféron [IFN]- γ) étaient plus susceptibles de développer des tumeurs spontanées ou chimio-induites (Vesely *et al.*, 2011). Certains éléments soutiennent également l'existence d'une telle immunosurveillance anti-tumorale chez l'homme. Des études épidémiologiques ont notamment révélé que l'incidence de divers cancers (y compris d'origine non virale) était plus élevée chez les individus présentant un déficit immunitaire, induit par exemple par la prise d'un traitement immunosuppresseur après une greffe d'organe (Vesely *et al.*, 2011).

L'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire se déroule en 7 grandes étapes, constituant le cycle de l'immunité anti-cancéreuse (Chen and Mellman, 2013) (Figure 1). Les antigènes tumoraux libérés par les cellules cancéreuses mourantes sont tout d'abord captés par les cellules présentatrices de l'antigène (par ex. cellules dendritiques) (étape 1), entraînant la maturation et la migration de celles-ci vers les ganglions lymphatiques drainants (étape 2). Dans les ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques présentent les peptides tumoraux, associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II, aux lymphocytes T naïfs. Les lymphocytes T possédant un récepteur TCR (« T-cell receptor ») spécifique aux peptides tumoraux présentés sont alors activés et débutent leur expansion clonale (étape 3). Les lymphocytes T activés migrent ensuite vers la tumeur (étape 4) et s'infiltrent dans celle-ci (étape 5). Au sein de la tumeur, les lymphocytes T cytotoxiques reconnaissent spécifiquement via leur récepteur TCR les complexes peptide tumoral-CMH I à la surface des cellules cancéreuses (étape 6) qu'ils détruisent alors (étape 7). La mort des cellules tumorales entraîne le relargage d'antigènes tumoraux supplémentaires et marque ainsi le début d'un nouveau cycle, amplifiant la réponse immunitaire anti-tumorale.

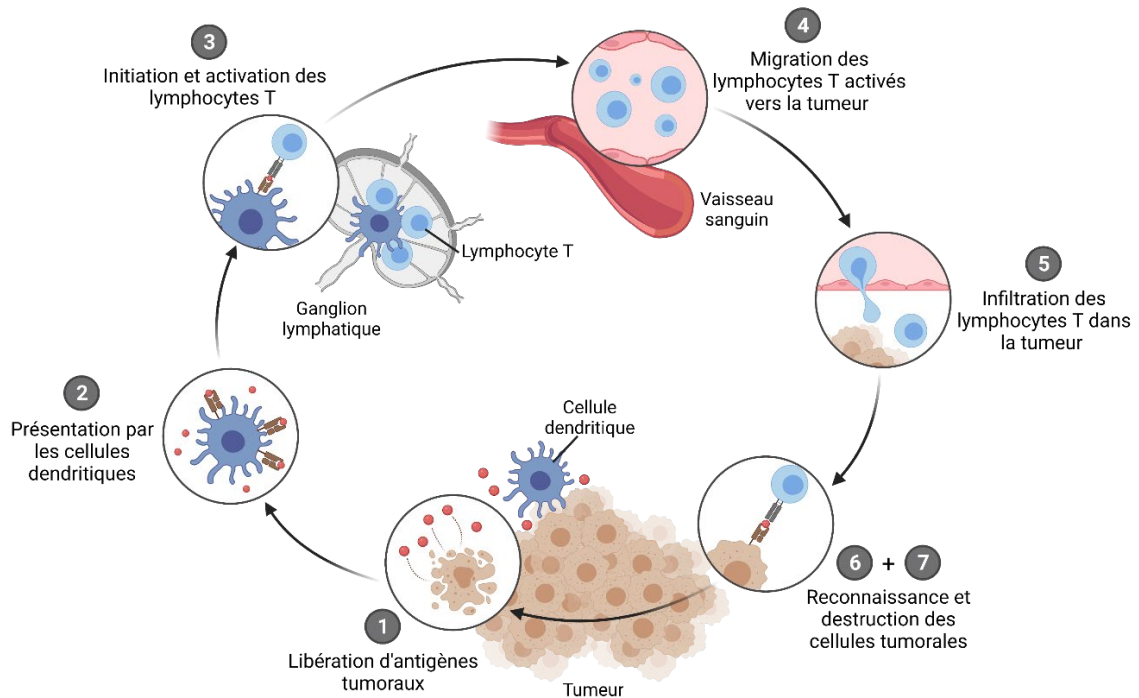


Figure 1. Le cycle de l'immunité anti-cancéreuse. Figure inspirée de Chen and Mellman, 2013.

Les cellules tumorales qui survivent à cette phase d'élimination entrent dans une phase d'équilibre dynamique avec le système immunitaire, qui contient leur prolifération sans pour autant les éradiquer totalement. Durant cette période de latence, qui peut durer parfois plusieurs années, le système immunitaire exerce une pression sélective constante sur les cellules cancéreuses et favorise ainsi l'émergence de variants tumoraux capables d'échapper à sa reconnaissance et à sa destruction. Cette dernière phase d'échappement immunitaire aboutit finalement au développement de tumeurs cliniquement détectables (Schreiber, Old and Smyth, 2011).

Plusieurs mécanismes sont responsables de l'échappement immunitaire des cellules cancéreuses (Vesely *et al.*, 2011). Des altérations intrinsèques à la cellule tumorale peuvent l'empêcher d'être reconnue par les lymphocytes T cytotoxiques (par ex. perte d'expression de l'antigène tumoral ou des molécules du CMH), ou bien d'être détruite par ceux-ci (par ex. surexpression de signaux anti-apoptotiques). Les cellules tumorales peuvent également générer un microenvironnement immunosuppresseur favorable à leur prolifération, en sécrétant des cytokines (par ex. TGF- β , IL-4, IL-10) et en recrutant diverses cellules (par ex. lymphocytes T régulateurs, cellules myéloïdes suppressives, macrophages de type II) inhibant l'activité des cellules immunitaires anti-tumorales.

Une autre stratégie clé employée par les cellules cancéreuses pour échapper à l'immunité anti-tumorale consiste à détourner le système des points de contrôle immunitaire à leur avantage (Vesely *et al.*, 2011). Ces points de contrôle immunitaire désignent l'ensemble des récepteurs (et leurs ligands associés) de co-stimulation ou de co-inhibition à la surface du lymphocyte T, modulant son activation après reconnaissance spécifique de l'antigène (Sun, Mezzadra and Schumacher, 2018).

La protéine transmembranaire PD-1 (« programmed cell death protein 1 », CD279) est un des récepteurs co-inhibiteurs exprimés à la surface des lymphocytes T activés. Ce récepteur interagit avec la protéine « programmed cell death-ligand 1 » (PD-L1, B7-H1, CD274), naturellement exprimée à la surface de diverses cellules dans les tissus sains de l'organisme, comme les cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, macrophages), les lymphocytes T régulateurs, les cellules épithéliales ou endothéliales. Le récepteur PD-1 se lie également à la protéine PD-L2 (CD273), exprimée principalement par les cellules dendritiques et les macrophages (Sun, Mezzadra and Schumacher, 2018).

La liaison de PD-L1 au récepteur PD-1 à la surface du lymphocyte T induit la phosphorylation par des kinases de la famille Src des résidus tyrosine contenus dans les motifs ITIM (« immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs ») et ITSM (« immunoreceptor tyrosine-based switch motifs ») du domaine cytoplasmique de PD-1. Une fois phosphorylés, les résidus tyrosine permettent le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2, qui inhibent alors les signaux activateurs du lymphocyte T en aval (Ribas and Wolchok, 2018). L'interaction prolongée entre PD-1 et PD-L1 se traduit ainsi par une diminution progressive de la prolifération et des fonctions effectrices du lymphocyte T dit « épuisé » (Wherry and Kurachi, 2015) (Figure 2).

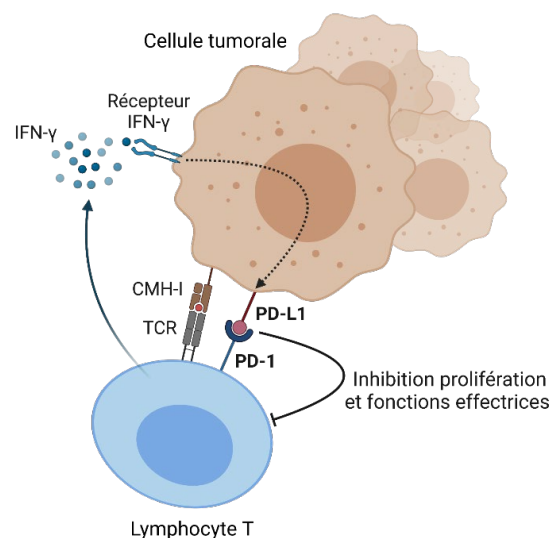


Figure 2. Détournement de la voie des points de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1 par la cellule tumorale. L'interaction du récepteur PD-1 à la surface du lymphocyte T activé avec son ligand PD-L1 surexprimé à la surface de la cellule tumorale inhibe l'activité anti-tumorale du lymphocyte T, participant ainsi à l'échappement immunitaire de la tumeur. Abréviations : CMH-I, complexe majeur d'histocompatibilité de type I ; IFN- γ , interféron- γ ; PD-1, « programmed cell death protein 1 » ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; TCR, « T-cell receptor ».

Les points de contrôle immunitaire inhibiteurs comme la voie PD-1/PD-L1 jouent un rôle physiologique essentiel : en limitant la durée et l'intensité de la réponse immunitaire, ils préviennent le risque d'auto-immunité et évitent une inflammation et un endommagement excessifs des tissus. Cependant, les cellules cancéreuses exploitent ce mécanisme d'immunosuppression en surexprimant la protéine PD-L1 à leur surface. En inhibant l'activité des lymphocytes T cytotoxiques PD-1⁺ infiltrés dans la tumeur, elles échappent ainsi à leur destruction (Sun, Mezzadra and Schumacher, 2018). PD-L1 peut être exprimé de manière constitutive à la surface des cellules tumorales (résistance immunitaire innée), ou en réponse à

des signaux pro-inflammatoires sécrétés dans le microenvironnement tumoral (TME) comme la cytokine IFN- γ (résistance immunitaire adaptative) (Sun, Mezzadra and Schumacher, 2018) (Figure 2).

Les immunothérapies avec des anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôle immunitaire (PD-1, PD-L1 mais aussi « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 » [CTLA-4]) visent à lever l'anergie des lymphocytes T et à (ré)activer ainsi une réponse immunitaire durable contre la tumeur. Ces immunothérapies ont constitué une véritable révolution dans la lutte contre le cancer, montrant une efficacité sur un large spectre de tumeurs comme le mélanome, le lymphome, le CPNPC ou encore les cancers du rein, de la vessie, et de la tête et du cou (Ribas and Wolchok, 2018). Des réponses prolongées ont été obtenues chez certains patients, grâce à la génération d'une immunité mémoire capable de maintenir une activité anti-tumorale même après l'arrêt du traitement. Fort de ce succès, le prix Nobel de physiologie ou de médecine a été décerné en 2018 à l'américain James Allison et au japonais Tasuku Honjo pour leurs travaux sur CTLA-4 et PD-1, ayant permis l'avènement des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI). En France, le nombre de patients traités avec ces immunothérapies spécifiques a augmenté de 27 % entre 2018 et 2019 (28 673 à 36 315 patients) (INCa, 2021). Concernant le cancer du poumon plus particulièrement, les immunothérapies anti-PD-1 et anti-PD-L1 ont grandement amélioré la prise en charge et le pronostic des patients souffrant d'un cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) localement avancé ou métastatique (Reck and Rabe, 2017).

Le cancer du poumon est le cancer le plus meurtrier au monde, ayant causé 1,6 millions de décès en 2017 (Sung *et al.*, 2020). En France, c'est le 3^{ème} cancer le plus fréquent tout sexe confondu (derrière les cancers du sein et de la prostate) mais toujours le plus meurtrier, avec 33 100 décès en 2018 (1 mort sur 5 du cancer) (INCa, 2021). Le tabagisme actif est le premier facteur de risque, responsable de 80 % des cancers du poumon en France. D'autres facteurs de risque incluent une exposition professionnelle ou environnementale à des substances cancérigènes (par ex. amiante, radon, tabagisme passif, particules fines), des antécédents médicaux (par ex. radiothérapie passée, infection au VIH) ou familiaux (prédispositions génétiques), ou encore la consommation d'alcool (Duma, Santana-Davila and Molina, 2019). Le pronostic du cancer du poumon est relativement mauvais, avec un taux de survie nette standardisée à 5 ans de 20 % (INCa, 2021). Cela s'explique par le fait que la majorité des patients sont diagnostiqués à un stade déjà localement avancé ou métastatique de la maladie (Duma, Santana-Davila and Molina, 2019). En France, l'âge médian au diagnostic est de 65 ans chez les femmes et 67 ans chez les hommes (INCa, 2021).

Le cancer du poumon se divise en 2 types principaux : le cancer du poumon à petites cellules (CPPC) et le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC), ce dernier étant le plus fréquent (~ 85 % des cas). Parmi les CPNPC, on distingue encore 3 sous-types histologiques principaux : les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes du poumon à grandes cellules (Duma, Santana-Davila and Molina, 2019). Les adénocarcinomes proviennent des cellules épithéliales qui tapissent l'intérieur des alvéoles pulmonaires. Il s'agit du sous-type le plus fréquent de CPNPC (~ 40 % des cas totaux de cancer du poumon), particulièrement chez les femmes et les non-fumeurs. Les carcinomes épidermoïdes se développent à partir des cellules épithéliales tapissant les voies respiratoires (bronches et bronchioles). Les carcinomes du poumon à grandes cellules sont peu différenciés et constitués de grandes cellules cancéreuses visibles au microscope (Duma, Santana-Davila and Molina, 2019).

Le bilan diagnostique du cancer du poumon repose sur un examen clinique, une radiographie du thorax, une tomodensitométrie (TDM) du thorax et une biopsie (Reck and Rabe, 2017). Les symptômes cliniques les plus fréquents du cancer du poumon comprennent une toux persistante, la présence de sang dans les crachats (hémoptysie), des douleurs au niveau de la poitrine, des difficultés à respirer (dyspnée), un enrouement de la voix ou encore une infection chronique des voies respiratoires. D'autres symptômes non spécifiques peuvent inclure de la fièvre, une perte d'appétit, une perte de poids inexplicée ainsi qu'une sensation d'extrême fatigue (Duma, Santana-Davila and Molina, 2019). Une radiographie et une TDM du thorax permettent de confirmer le diagnostic présumé de cancer du poumon et d'évaluer l'extension du cancer. Une TDM ou une imagerie par résonance magnétique (IRM) du cerveau peuvent être utilisées pour détecter les éventuelles métastases cérébrales. Une tomographie par émission de positons (TEP) au ^{18}F -fluorodésoxyglucose (^{18}F -FDG) couplée à la TDM (TEP/TDM) peut également s'ajouter pour préciser l'extension du cancer et détecter notamment les métastases osseuses (Reck and Rabe, 2017; Planchard *et al.*, 2020). Le ^{18}F -FDG est un analogue du glucose radiomarké au fluor-18 (^{18}F) qui permet de visualiser les tumeurs et les foyers d'inflammation présentant une consommation de glucose plus importante que les tissus sains (Valk, 2003). Le stade du cancer est déterminé selon la 8^{ème} édition de la classification TNM du cancer du poumon, en fonction de la taille de la tumeur, de l'implication des ganglions lymphatiques régionaux et de la présence de métastases distantes (Lababede and Meziane, 2018). L'examen d'une biopsie permet d'identifier le sous-type histologique de cancer du poumon, le grade de différenciation, la présence d'altérations génétiques ou encore une surexpression de PD-L1, afin de choisir ensuite le traitement le plus adapté. Les altérations génétiques les plus fréquentes dans le CPNPC non épidermoïde sont les mutations activatrices des gènes KRAS, BRAF (mutation ponctuelle V600E) et EGFR (délétions exon 19 et mutation ponctuelle L858R exon 21), les mutations des gènes suppresseurs de tumeur TP53 et STK11, et les réarrangements des gènes ALK (EML4-ALK) et ROS1. Pour le CPNPC épidermoïde, les altérations génétiques concernent le plus souvent le gène suppresseur de tumeur TP53, ainsi que des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (par ex. CDKN2A, RB1) et de l'apoptose (par ex. PI3K, AKT) (Yang, Yang and Yang, 2020). La protéine PD-L1 est quant à elle surexprimée dans $\sim 30\%$ des CPNPC (Skov *et al.*, 2020).

Le choix de la thérapie pour traiter le CPNPC dépend du stade du cancer, du sous-type histologique, des caractéristiques moléculaires de la tumeur (présence de mutations activatrices, surexpression de PD-L1) et de l'état de santé général du patient (statut fonctionnel, comorbidités, antécédents médicaux) (Planchard *et al.*, 2020). Les patients présentant des CPNPC de stades I, II ou III reçoivent un traitement à visée curative, incluant de la chirurgie, de la chimiothérapie, de la radiothérapie ou une combinaison de plusieurs de ces traitements. Le CPNPC métastatique (stade IV) est considéré comme inopérable et incurable. Des traitements anti-cancéreux systémiques peuvent être utilisés pour prolonger la survie du patient et améliorer sa qualité de vie : chimiothérapie, agents anti-angiogéniques, thérapies moléculaires ciblées et inhibiteurs des points de contrôle immunitaire. Des traitements palliatifs (soins de support) sont également associés. Des interventions chirurgicales et la radiothérapie peuvent notamment aider à soulager les symptômes causés par la propagation du cancer dans d'autres organes (par ex. cerveau, os). De très forts progrès ont néanmoins été réalisés dans la prise en charge du CPNPC localement avancé ou métastatique (stades III-IV). Le traitement non sélectif de la majorité des patients par un doublet de chimiothérapie a été remplacé par une stratégie thérapeutique plus personnalisée, prenant en compte les altérations génétiques et le statut PD-L1 de leurs tumeurs. Le développement des thérapies moléculaires ciblées (inhibiteurs de tyrosine kinase) et des inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1) a ainsi grandement amélioré la survie des patients sélectionnés (Yang, Yang and Yang, 2020). Une

thérapie moléculaire ciblée est indiquée en première ligne lorsque les altérations génétiques suivantes sont détectées : mutations activatrices des gènes EGFR ou ALK et réarrangement des gènes ALK et ROS1. Par ailleurs, 2 anticorps anti-PD-1 (pembrolizumab et nivolumab) et 2 anticorps anti-PD-L1 (atezolizumab et durvalumab) ont été approuvés pour le traitement du CPNPC avancé, en seconde ligne mais également en première ligne, en monothérapie ou en combinaison avec d'autres traitements (Qu *et al.*, 2021) (Tableau 1).

Tableau 1. Les anticorps monoclonaux anti-PD-1 et anti-PD-L1 approuvés par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) pour le traitement du CPNPC avancé. Autorisations de mise sur le marché (AMM) consultées en septembre 2021 (*European Medicines Agency*).

Cible	Anticorps	Indications		
PD-1	Nivolumab, IgG4 (Opdivo, BMS)	1 ^{ère} ligne	Association avec anti-CTLA-4 ipilimumab + chimiothérapie	CPNPC métastatique sans mutations activatrices EGFR/ALK
		2 ^{nde} ligne	Monothérapie	CPNPC localement avancé ou métastatique après chimiothérapie
	Pembrolizumab, IgG4 (Keytruda, Merck)	1 ^{ère} ligne	Monothérapie	CPNPC métastatique sans mutations activatrices EGFR/ALK et exprimant PD-L1 (TPS \geq 50 %)
		2 ^{nde} ligne	Association avec chimiothérapie	CPNPC métastatique sans mutations activatrices EGFR/ALK
PD-L1	Atezolizumab, IgG1 (Tecentriq, Roche)	1 ^{ère} ligne	Monothérapie	CPNPC métastatique sans mutations activatrices EGFR/ALK et exprimant PD-L1 (TPS \geq 50 % ou IC \geq 10 %)
		1 ^{ère} ligne	Association avec chimiothérapie + anti-VEGF bevacizumab	CPNPC non épidermoïde métastatique sans mutations activatrices EGFR/ALK
	2 ^{nde} ligne	Monothérapie	CPNPC localement avancé ou métastatique après chimiothérapie et/ou thérapie ciblée	
	2 ^{nde} ligne	Association avec chimiothérapie + anti-VEGF bevacizumab	CPNPC localement avancé ou métastatique avec mutations activatrices EGFR/ALK après thérapie ciblée	
	Durvalumab, IgG1 (Imfinzi, AstraZeneca)	2 ^{nde} ligne	Monothérapie	CPNPC localement avancé exprimant PD-L1 (TPS \geq 1 %) après chimiothérapie

Abréviations : ALK, « anaplastic lymphoma kinase » ; BMS, Bristol-Myers Squibb ; CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; CTLA-4, « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 » ; EGFR, « epidermal growth factor receptor » ; IC, cellules immunitaires marquées ; PD-1, « programmed cell death protein 1 » ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; TPS, score de proportion tumorale ; VEGF, « vascular endothelial growth factor ».

Cependant, malgré des réponses cliniques remarquables chez certains, le taux de réponse aux immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1 reste limité à ~ 20 % des patients traités souffrant de CPNPC (Passiglia *et al.*, 2016). Par ailleurs, bien que globalement mieux tolérées que la chimiothérapie, ces immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1 peuvent exposer à des effets indésirables d'origine immunologique potentiellement graves (par ex. pneumopathies, colites, hépatites ou pancréatites) (Martins *et al.*, 2019).

La forte hétérogénéité inter-individuelle de réponse aux immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1 souligne le besoin majeur d'identifier et de développer des biomarqueurs prédictifs de leur efficacité clinique. Une meilleure stratification des patients grâce à l'utilisation de ces biomarqueurs prédictifs permettrait d'améliorer le bénéfice thérapeutique en épargnant au patient un traitement inefficace, tout en rationalisant les dépenses importantes associées à ces immunothérapies. L'objectif serait ainsi de tendre vers une médecine plus personnalisée, en délivrant la bonne stratégie thérapeutique au bon patient, au bon moment (Denis *et al.*, 2019; de Vries *et al.*, 2019).

Les études précliniques et cliniques menées jusqu'ici suggèrent que les ICI agissent principalement en réactivant une réponse immunitaire anti-tumorale pré-existante (Chen and Mellman, 2017). Ces immunothérapies sont donc particulièrement efficaces dans les tumeurs de phénotype immunitaire « inflammé », caractérisé par une charge mutationnelle tumorale élevée, la présence de lymphocytes T infiltrés dans le TME, et l'expression de points de contrôle immunitaire par les cellules tumorales et immunitaires. Au contraire, les tumeurs de phénotype immunitaire « exclu » ou « désert », peu infiltrées par les lymphocytes T, répondent moins favorablement aux ICI (Chen and Mellman, 2017).

Dans le CPNPC, plusieurs essais cliniques ont montré qu'une expression tumorale positive de PD-L1 était associée à une meilleure efficacité des immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1 (Qu *et al.*, 2021). Par exemple, les essais randomisés de phase III KEYNOTE-024 et KEYNOTE-042 ont montré que, chez des patients naïfs de traitement avec un CPNPC avancé exprimant fortement PD-L1 (score de proportion tumorale [TPS] ≥ 50 %), le pembrolizumab améliorait significativement le taux de réponse objective, la survie sans progression et la survie globale en comparaison d'une chimiothérapie à base de platine (Mok *et al.*, 2019; Reck *et al.*, 2019). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'atezolizumab dans l'essai randomisé de phase III IMpower 110 (Herbst *et al.*, 2020).

Dans ces études, le niveau d'expression de PD-L1 a été évalué *ex vivo* par immunohistochimie (IHC) sur des échantillons tumoraux prélevés par biopsie. Chaque anticorps thérapeutique anti-PD-1/anti-PD-L1 est associé à un test IHC anti-PD-L1 unique, co-développé lors des essais cliniques (Tableau 2). Le pourcentage de cellules tumorales viables présentant une coloration membranaire (score de proportion tumorale [TPS]) est utilisé pour quantifier l'expression de PD-L1. Le pourcentage de cellules immunitaires infiltrantes marquées peut également être considéré.

Tableau 2. Tests IHC anti-PD-L1 compagnons ou complémentaires associés aux immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1 indiquées dans le traitement du CPNPC.

Clone anticorps primaire anti-PD-L1	Fournisseur	Seuils de positivité utilisés dans le CPNPC ^a	Anticorps thérapeutique associé
22C3	Dako	TPS ≥ 1 %, ≥ 50 %	Pembrolizumab
28-8	Dako	TPS ≥ 1 %, ≥ 5 %, ≥ 10 %	Nivolumab
SP142	Ventana	TPS ≥ 50 % et/ou IC ≥ 10 %	Atezolizumab
SP263	Ventana	TPS ≥ 1 %, ≥ 25 %	Durvalumab

^aSeuils de positivité utilisés dans les essais cliniques des anticorps thérapeutiques anti-PD-1/anti-PD-L1 pour stratifier les patients souffrant de CPNPC. Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; IC, cellules immunitaires marquées ; IHC, immunohistochimie ; PD-1, « programmed cell death protein 1 » ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; TPS, score de proportion tumorale.

La mesure de l'expression de PD-L1 dans la tumeur par IHC est donc aujourd'hui le seul biomarqueur prédictif de la réponse aux immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1 approuvé dans le CPNPC (dans l'Union européenne), conditionnant certaines indications (Tableau 1).

Cependant, ce biomarqueur prédictif est loin d'être parfait : tous les patients avec des tumeurs PD-L1⁺ ne répondent pas aux immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1, tandis que certains patients avec des tumeurs PD-L1⁻ peuvent à l'inverse y répondre. Par exemple, une analyse rétrospective de 7 essais cliniques sur des patients souffrant de CPNPC avancé (914 patients au total) a montré que seuls ~ 23 % des patients avec des tumeurs PD-L1⁺ (TPS ≥ 1 %) ont répondu à une immunothérapie anti-PD-1/anti-PD-L1, tandis que ~ 12 % des patients avec des tumeurs PD-L1⁻ ont malgré tout présenté une réponse objective (Passiglia *et al.*, 2016). L'expression tumorale de PD-L1 ne semble donc pas toujours suffisante pour prédire l'efficacité de ces immunothérapies. Cela pourrait notamment s'expliquer par une absence initiale de lymphocytes T infiltrés dans le TME (phénotype immunitaire désert ou exclu) ou par l'activation d'autres mécanismes d'échappement immunitaire par les cellules tumorales (Walsh and Soo, 2020).

La méthode d'évaluation de l'expression de PD-L1 par IHC présente également plusieurs inconvénients qui pourraient contribuer à sa valeur prédictive limitée (Nishino *et al.*, 2017). Tout d'abord, un petit échantillon tumoral prélevé par biopsie ne permet pas de capturer l'hétérogénéité spatiale de l'expression de PD-L1 au sein de la tumeur. Par exemple, chez 160 patients souffrant d'un CPNPC opérable, la détermination de l'expression de PD-L1 par IHC sur une biopsie tumorale ou sur la tumeur entière réséquée a montré de fortes disparités. Plus précisément, le statut PD-L1 de la tumeur entière était sous-estimé par l'analyse de la biopsie correspondante, privant ainsi potentiellement le patient d'une immunothérapie anti-PD-1/anti-PD-L1 (Ilie *et al.*, 2016). L'expression de PD-L1 diffère également entre les différentes tumeurs d'un même patient. Cette hétérogénéité inter-tumorale a notamment été constatée entre la tumeur primitive de CPNPC et les métastases associées dans le cerveau ou les ganglions lymphatiques (Mansfield *et al.*, 2016; Saito *et al.*, 2019). La réalisation de plusieurs biopsies invasives pour évaluer le statut PD-L1 de différentes tumeurs du patient n'est généralement pas envisageable en raison du manque d'accessibilité des lésions et du risque élevé pour le patient (Nishino *et al.*, 2017).

En plus de son hétérogénéité spatiale, l’expression de PD-L1 au sein du TME est fortement dynamique, évoluant avec la progression de la maladie et les traitements anti-tumoraux reçus (Nishino *et al.*, 2017). Par conséquent, le niveau d’expression de PD-L1 déterminé par IHC sur une biopsie ancienne n’est plus forcément représentatif du statut PD-L1 tumoral du patient lors de l’initiation de l’immunothérapie anti-PD-1/anti-PD-L1. A titre d’exemple, l’essai clinique KEYNOTE-010 a montré que le pembrolizumab améliorait significativement la survie globale de patients préalablement traités souffrant d’un CPNPC PD-L1⁺ (TPS \geq 50 %) en comparaison d’une chimiothérapie (Herbst *et al.*, 2016). Une nouvelle analyse de cet essai a mis en évidence que le bénéfice clinique était encore plus prononcé lorsque le niveau d’expression de PD-L1 était évalué sur des biopsies prélevées juste avant le début du traitement, comparé à l’utilisation de biopsies plus anciennes (Herbst *et al.*, 2019). Cependant, là encore, l’obtention de biopsies invasives répétées n’est pas toujours réalisable compte tenu des risques cumulés associés. Face à ces limitations, la tomographie par émission de positons (TEP) apparaît comme un outil prometteur pour évaluer l’expression tumorale de PD-L1, en complément des tests IHC anti-PD-L1.

La TEP est une technique d’imagerie moléculaire qui repose sur l’utilisation d’un traceur ciblant une protéine (par ex. PD-L1) ou un phénomène biologique (par ex. métabolisme du glucose), marqué avec un radionucléide émetteur de positons (e^+) (Valk, 2003). On parle plus spécifiquement d’immunoTEP lorsque le traceur/ligand utilisé est un anticorps ou un fragment d’anticorps. L’immunoTEP permet ainsi de combiner la spécificité et l’affinité élevées des anticorps pour leur cible à la sensibilité de l’imagerie TEP (Wu and Pandit-Taskar, 2021). Plusieurs radionucléides sont disponibles pour la TEP, l’idéal étant d’en choisir un dont la période radioactive est proche de la demi-vie biologique du traceur utilisé (Tableau 3). Les traceurs rapidement éliminés du sang (par ex. petites molécules ou fragments d’anticorps) seront ainsi radiomarqués avec des radionucléides de courtes périodes comme le carbone-11 (^{11}C , $t_{1/2} = 20$ min), le gallium-68 (^{68}Ga , $t_{1/2} = 68$ min) ou le fluor-18 (^{18}F , $t_{1/2} = 110$ min). Les traceurs présentant une demi-vie plasmatique plus longue (par ex. anticorps entiers) seront quant à eux radiomarqués au cuivre-64 (^{64}Cu , $t_{1/2} = 12,7$ h) ou au zirconium-89 (^{89}Zr , $t_{1/2} = 3,3$ jours) (Kraeber-Bodéré *et al.*, 2015). La disponibilité et le coût de production du radionucléide, ainsi que la complexité et la stabilité du radiomarquage sont également des facteurs à prendre en compte dans le choix du radionucléide. Un des principaux domaines d’application de la TEP en clinique est l’oncologie, que ce soit pour le bilan d’extension des tumeurs, pour l’évaluation de la réponse thérapeutique, ou encore pour le bilan des récidives (Valk, 2003). L’examen TEP au ^{18}F -FDG est couramment utilisé pour ces indications. D’autres applications de la TEP incluent l’étude et le suivi des pathologies neurologiques et neurodégénératives, cardiovasculaires et psychiatriques.

Tableau 3. Radionucléides fréquemment utilisés dans les études TEP précliniques/cliniques.

Radionucléide	Période radioactive ($t_{1/2}$)
Carbone-11 (^{11}C)	20 min
Gallium-68 (^{68}Ga)	68 min
Fluor-18 (^{18}F)	110 min
Cuivre-64 (^{64}Cu)	12,7 h
Zirconium-89 (^{89}Zr)	3,3 jours
Iode-124 (^{124}I)	4,2 jours

Un examen TEP débute par l'administration intraveineuse du radiotracer au patient ou à l'animal (Figure 3). Au sein de l'organisme, chaque positon issu de la désintégration β^+ du radionucléide s'annihile avec un électron de la matière environnante en émettant 2 photons γ d'énergie 511 keV à 180° l'un de l'autre. Ces photons sont détectés simultanément (événements coïncidents) par la couronne de blocs détecteurs de la caméra TEP, constitués d'une multitude de cristaux scintillants. Des algorithmes mathématiques estiment alors les lieux d'émission des paires de photons détectées, pour finalement reconstruire une image en 3D de la distribution spatiale du radiotracer dans la zone du corps explorée. L'examen TEP est généralement couplé à un examen tomodensitométrique (TDM ou scanner) qui permet de visualiser les structures anatomiques et morphologiques grâce à l'utilisation de rayons X. La superposition de l'image TEP sur l'image TDM facilite ainsi la localisation anatomique du radiotracer. L'acquisition TDM est également utilisée pour la correction d'atténuation des photons lors de la reconstruction des images TEP (Valk, 2003). L'analyse de l'image TEP obtenue permet de quantifier la concentration volumique en activité associée au radiotracer (kBq/cm^3) dans les différents tissus d'intérêt. Cette concentration en activité peut être normalisée par la dose administrée et par la masse du patient/de l'animal pour obtenir la valeur de fixation standardisée (SUV pour « standardized uptake value »). Elle peut également être exprimée en pourcentage de dose injectée ($\% \text{ID}/\text{cm}^3$), en normalisant uniquement par la dose administrée.

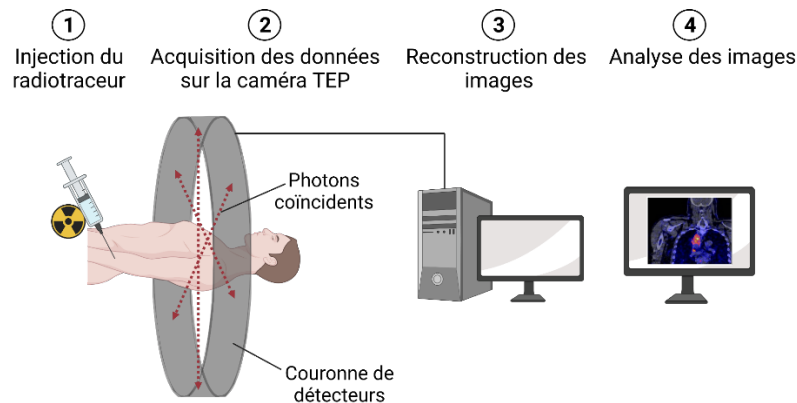


Figure 3. Les différentes étapes d'un examen TEP. Image TEP extraite de Bensch *et al.*, 2018.

L'imagerie TEP avec des ligands radiomarqués ciblant la protéine PD-L1 apparaît comme une approche prometteuse pour évaluer le statut PD-L1 tumoral du patient, en complément des méthodes d'IHC conventionnelles (de Vries *et al.*, 2019). Notamment, l'imagerie TEP de PD-L1 offre la possibilité de visualiser et de quantifier en temps réel et de manière non invasive l'expression de PD-L1 dans l'ensemble des tumeurs détectables du patient (tumeur primitive et métastases associées), y compris dans celles difficilement/non atteignables par biopsie. L'hétérogénéité intra-tumorale (dans la limite de résolution de la caméra TEP) et inter-tumorale de l'expression de PD-L1 peuvent alors être capturées. Contrairement à l'IHC anti-PD-L1, l'imagerie TEP de PD-L1 ne permet pas en revanche de discriminer les différents types cellulaires PD-L1⁺ au sein du TME.

La quantification de l'accumulation du radioligand anti-PD-L1 dans les tumeurs visibles sur l'image TEP pourrait être utilisée comme biomarqueur prédictif de l'efficacité des immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1. Des essais cliniques précoces ont en effet montré des résultats encourageants quant à la valeur prédictive d'un examen TEP PD-L1 pré-traitement. Bensch *et al.* ont utilisé l'anticorps anti-PD-L1 atezolizumab, radiomarqué au zirconium-89 (^{89}Zr), pour visualiser par TEP l'expression de PD-L1 chez 22 patients souffrant de CPNPC, de cancer de la prostate et de cancer du sein avancés, avant qu'ils ne soient traités avec l'atezolizumab (Bensch *et al.*, 2018). Niemeijer *et al.* ont quant à eux réalisé un examen TEP corps entier de 13 patients souffrant de CPNPC avancé avec l'adnectine anti-PD-L1 BMS-986192 (petite protéine de 12 kDa) radiomarquée au fluor-18 (^{18}F), avant traitement avec le nivolumab (Niemeijer *et al.*, 2018). Dans ces 2 études, la réponse à l'immunothérapie anti-PD-1/anti-PD-L1 était positivement corrélée à l'accumulation tumorale des radioligands anti-PD-L1. En revanche, cette réponse n'était pas corrélée au niveau d'expression de PD-L1 déterminé par IHC sur des biopsies tumorales prélevées pré-traitement. Des études cliniques sur un plus grand nombre de patients s'avèrent désormais nécessaires pour confirmer ces résultats.

En plus de son potentiel prédictif pré-traitement, l'imagerie TEP de PD-L1 pourrait également servir à évaluer la dynamique d'expression tumorale de PD-L1 au cours de la thérapie, sans avoir besoin d'effectuer des biopsies répétées (van de Donk *et al.*, 2020). Ce suivi longitudinal permettrait ainsi d'adapter la stratégie thérapeutique de manière personnalisée à chaque patient, en décidant par exemple d'ajouter une immunothérapie anti-PD-1/anti-PD-L1 au traitement existant en cas d'évolution positive de l'expression tumorale de PD-L1.

La capacité de l'imagerie TEP à soutenir la stratification et le suivi thérapeutique des patients candidats à une immunothérapie anti-PD-1/anti-PD-L1 repose sur l'utilisation de radioligands anti-PD-L1 permettant de visualiser efficacement l'expression tumorale de la protéine *in vivo*. Idéalement, ces radioligands doivent pénétrer et diffuser rapidement dans les tumeurs tout en étant vite éliminés de la circulation sanguine, afin d'obtenir des images TEP avec un fort contraste tumeur PD-L1⁺/bruit à des temps courts post-injection. L'examen TEP peut alors être réalisé quelques heures seulement après l'administration du radioligand anti-PD-L1, facilitant sa mise en œuvre en routine clinique. À côté des anticorps radiomarqués, divers formats de radioligand anti-PD-L1 à la pharmacocinétique (PK) plus rapide ont été développés dans le but d'optimiser l'imagerie TEP de PD-L1, allant des fragments d'anticorps aux petites protéines synthétiques (Bouleau, Lebon and Truillet, 2021).

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été d'explorer différentes stratégies permettant d'améliorer les propriétés PK des radioligands utilisés pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1. Pour cela, deux nouveaux formats de ligand ont été produits à partir de l'anticorps IgG anti-PD-L1 C4, ciblant à la fois la protéine PD-L1 humaine et murine (Truillet *et al.*, 2018). Un fragment Fab C4 (pour « fragment antigen binding ») de plus petite taille (~ 50 kDa) a été dérivé de l'anticorps entier. Un anticorps C4 doublement muté (H310A/H435Q) sur son domaine Fc a également été créé. Ces mutations ont été introduites dans le but de supprimer l'interaction de l'IgG C4 mutant avec le récepteur Fc néonatal (FcRn), responsable de la demi-vie plasmatique prolongée des IgGs.

La PK et la biodistribution *in vivo* de l'IgG C4, de l'IgG C4 mutant, et du fragment Fab C4, radiomarqués au ^{89}Zr , ont été comparées par imagerie TEP/TDM longitudinale dans des modèles précliniques de CPNPC humain PD-L1⁺ et PD-L1⁻. La capacité des radioligands C4 à cibler spécifiquement les tumeurs PD-L1⁺ a été évaluée. Les résultats de cette étude sont exposés dans le Chapitre 1.

Comme discuté dans le Chapitre 1, les 3 radioligands C4 ont présenté une PK et un profil de biodistribution *in vivo* bien distincts, particulièrement dans les organes sains comme le foie et les reins. Une analyse dosimétrique a donc été réalisée, afin d'évaluer plus en détails les doses absorbées par les tissus et les potentiels risques de radiotoxicité associés. Le Chapitre 2 présente les résultats des analyses dosimétriques murine et humaine ainsi effectuées.

Enfin, l'effet de divers traitements pharmacologiques sur l'expression de PD-L1 *in vitro* dans des lignées cellulaires humaines de CPNPC PD-L1⁺ a été étudié. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Chapitre 3. L'objectif de cette étude exploratoire serait à terme de montrer que les nouveaux radioligands C4 anti-PD-L1 développés au cours de cette thèse pourraient permettre de détecter par TEP les changements d'expression tumorale de PD-L1 induits par un traitement.

Références

- Bensch, F. *et al.* (2018) '89Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer', *Nature Medicine*, 24(12), pp. 1852–1858. doi:10.1038/s41591-018-0255-8.
- Bouleau, A., Lebon, V. and Truillet, C. (2021) 'PET imaging of immune checkpoint proteins in oncology', *Pharmacology & Therapeutics*, 222, p. 107786. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107786.
- Chen, D.S. and Mellman, I. (2013) 'Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle', *Immunity*, 39(1), pp. 1–10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012.
- Chen, D.S. and Mellman, I. (2017) 'Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point', *Nature*, 541(7637), pp. 321–330. doi:10.1038/nature21349.
- Denis, H. *et al.* (2019) 'Les immunothérapies spécifiques dans le traitement des cancers', *Bulletin du Cancer*, 106(1), pp. 37–47. doi:10.1016/j.bulcan.2018.12.007.
- van de Donk, P.P. *et al.* (2020) 'Molecular imaging biomarkers for immune checkpoint inhibitor therapy', *Theranostics*, 10(4), pp. 1708–1718. doi:10.7150/thno.38339.
- Duma, N., Santana-Davila, R. and Molina, J.R. (2019) 'Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment', *Mayo Clinic Proceedings*, 94(8), pp. 1623–1640. doi:10.1016/j.mayocp.2019.01.013.
- European Medicines Agency (2021) *European Medicines Agency*. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en> (Accessed: 11 September 2021).
- Herbst, R.S. *et al.* (2016) 'Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial', *The Lancet*, 387(10027), pp. 1540–1550. doi:10.1016/S0140-6736(15)01281-7.
- Herbst, R.S. *et al.* (2019) 'Use of archival versus newly collected tumor samples for assessing PD-L1 expression and overall survival: an updated analysis of KEYNOTE-010 trial', *Annals of Oncology*, 30(2), pp. 281–289. doi:10.1093/annonc/mdy545.
- Herbst, R.S. *et al.* (2020) 'Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC', *New England Journal of Medicine*, 383(14), pp. 1328–1339. doi:10.1056/NEJMoa1917346.
- Ilie, M. *et al.* (2016) 'Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies', *Annals of Oncology*, 27(1), pp. 147–153. doi:10.1093/annonc/mdv489.
- INCa (2021) 'Panorama des cancers en France - édition 2021.', *Institut National du Cancer*. [Preprint].
- Kraeber-Bodéré, F. *et al.* (2015) 'Tumor Immunotargeting Using Innovative Radionuclides', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), pp. 3932–3954. doi:10.3390/ijms16023932.
- Lababede, O. and Meziane, M.A. (2018) 'The Eighth Edition of TNM Staging of Lung Cancer: Reference Chart and Diagrams', *The Oncologist*, 23(7), pp. 844–848. doi:10.1634/theoncologist.2017-0659.
- Mansfield, A.S. *et al.* (2016) 'Temporal and spatial discordance of programmed cell death-ligand 1 expression and lymphocyte tumor infiltration between paired primary lesions and brain metastases in lung cancer', *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(10), pp. 1953–1958. doi:10.1093/annonc/mdw289.

- Martins, F. *et al.* (2019) ‘Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance’, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(9), pp. 563–580. doi:10.1038/s41571-019-0218-0.
- Mok, T.S.K. *et al.* (2019) ‘Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial’, *The Lancet*, 393(10183), pp. 1819–1830. doi:10.1016/S0140-6736(18)32409-7.
- Niemeijer, A.N. *et al.* (2018) ‘Whole body PD-1 and PD-L1 positron emission tomography in patients with non-small-cell lung cancer’, *Nature Communications*, 9(1), p. 4664. doi:10.1038/s41467-018-07131-y.
- Nishino, M. *et al.* (2017) ‘Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development’, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(11), pp. 655–668. doi:10.1038/nrclinonc.2017.88.
- Passiglia, F. *et al.* (2016) ‘PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis’, *Oncotarget*, 7(15), pp. 19738–19747. doi:10.18632/oncotarget.7582.
- Planchard, D. *et al.* (2020) ‘Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up’, *European Society for Medical Oncology* [Preprint].
- Qu, J. *et al.* (2021) ‘The progress and challenge of anti-PD-1/ PD-L1 immunotherapy in treating non-small cell lung cancer.’, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 13, pp. 1–28.
- Reck, M. *et al.* (2019) ‘Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater’, *Journal of Clinical Oncology*, 37(7), pp. 537–546. doi:10.1200/JCO.18.00149.
- Reck, M. and Rabe, K.F. (2017) ‘Precision Diagnosis and Treatment for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer’, *New England Journal of Medicine*. Edited by D.L. Longo, 377(9), pp. 849–861. doi:10.1056/NEJMra1703413.
- Ribas, A. and Wolchok, J.D. (2018) ‘Cancer immunotherapy using checkpoint blockade’, *Science*, 359(6382), pp. 1350–1355. doi:10.1126/science.aar4060.
- Saito, Y. *et al.* (2019) ‘Inter-tumor heterogeneity of PD-L1 expression in non-small cell lung cancer’, *Journal of Thoracic Disease*, 11(12), pp. 4982–4991. doi:10.21037/jtd.2019.12.24.
- Schreiber, R.D., Old, L.J. and Smyth, M.J. (2011) ‘Cancer Immunoediting: Integrating Immunity’s Roles in Cancer Suppression and Promotion’, *Science*, 331(6024), pp. 1565–1570. doi:10.1126/science.1203486.
- Skov, B.G. *et al.* (2020) ‘The prevalence of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer in an unselected, consecutive population’, *Modern Pathology*, 33(1), pp. 109–117. doi:10.1038/s41379-019-0339-0.
- Sun, C., Mezzadra, R. and Schumacher, T.N. (2018) ‘Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint’, *Immunity*, 48(3), pp. 434–452. doi:10.1016/j.immuni.2018.03.014.
- Truillet, C. *et al.* (2018) ‘Imaging PD-L1 Expression with ImmunoPET’, *Bioconjugate Chemistry*, 29(1), pp. 96–103. doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00631.
- Valk, P.E. (ed.) (2003) *Positron emission tomography: basic science and clinical practice*. Springer.
- Vesely, M.D. *et al.* (2011) ‘Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer’, *Annual Review of Immunology*, 29(1), pp. 235–271. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324.

de Vries, E.G.E. *et al.* (2019) ‘Integrating molecular nuclear imaging in clinical research to improve anticancer therapy’, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(4), pp. 241–255. doi:10.1038/s41571-018-0123-y.

Walsh, R.J. and Soo, R.A. (2020) ‘Resistance to immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: biomarkers and therapeutic strategies’, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 12, p. 175883592093790. doi:10.1177/1758835920937902.

Wherry, E.J. and Kurachi, M. (2015) ‘Molecular and cellular insights into T cell exhaustion’, *Nature Reviews Immunology*, 15(8), pp. 486–499. doi:10.1038/nri3862.

Wu, A.M. and Pandit-Taskar, N. (2021) ‘ImmunoPET: harnessing antibodies for imaging immune cells’, *Mol Imaging Biol* [Preprint].

Yang, C.-Y., Yang, J.C.-H. and Yang, P.-C. (2020) ‘Precision Management of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer’, *Annual Review of Medicine*, 71(1), pp. 117–136. doi:10.1146/annurev-med-051718-013524.

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP dans des modèles précliniques de CPNPC humains

Introduction

Compte tenu du potentiel de l'imagerie TEP pour améliorer le bénéfice des immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1, une grande diversité de radioligands anti-PD-L1 ont été développés. Des immunoglobulines G (IgGs) anti-PD-L1 radiomarquées au ^{89}Zr , comme les anticorps thérapeutiques atezolizumab ou avelumab, ont été utilisées en préclinique et en clinique pour évaluer l'expression de PD-L1 par TEP dans divers types de tumeurs. Cependant, les anticorps radiomarqués sont loin d'être des radioligands idéaux pour la TEP. En effet, leur longue demi-vie plasmatique couplée à leur lente diffusion dans les tumeurs solides nécessitent d'attendre quelques jours après leur injection pour obtenir des images TEP avec un contraste tumeur PD-L1⁺/bruit optimal. Ces limitations ont motivé le développement de radioligands anti-PD-L1 de plus petites tailles, comme des fragments d'anticorps ou des petites protéines, aux propriétés PK plus désirables pour l'imagerie TEP. Contrairement aux anticorps radiomarqués, ces petits radioligands pénètrent rapidement dans les tumeurs et sont vite éliminés de la circulation sanguine. L'expression tumorale de PD-L1 peut alors être visualisée efficacement à des temps courts post-injection, limitant ainsi la lourdeur du protocole clinique et la dosimétrie du patient. Un autre moyen de moduler la PK *in vivo* des anticorps radiomarqués, sans avoir à passer par une réduction de taille, a consisté à altérer leur interaction avec le FcRn. La liaison des IgGs avec ce récepteur via leur domaine Fc est en effet responsable de leur demi-vie plasmatique prolongée.

Dans le cadre de cette thèse, diverses stratégies ont été explorées dans le but de produire des radioligands anti-PD-L1 présentant des caractéristiques PK optimales pour l'imagerie TEP. Pour cela, nous sommes partis de l'anticorps IgG1 C4, ciblant à la fois la protéine PD-L1 humaine et murine. Cet anticorps radiomarqué au ^{89}Zr a déjà été utilisé avec succès pour détecter l'expression de PD-L1 dans des modèles précliniques de CPNPC (Moroz *et al.*, 2018; Truillet *et al.*, 2018). Un fragment Fab C4 de plus petite taille (~ 50 kDa) a été dérivé de l'IgG C4. Une double mutation (H310A/H435Q) a également été introduite dans le domaine Fc de l'IgG C4 pour former un anticorps mutant, ne pouvant plus se lier au FcRn. La PK et la biodistribution *in vivo* de l'IgG C4, de l'IgG C4 mutant, et du fragment Fab C4, radiomarqués au ^{89}Zr , ont ensuite été comparées par imagerie TEP/TDM longitudinale dans des souris portant des xénogreffes humaines de CPNPC PD-L1⁺ et PD-L1⁻.

La partie 1 de ce chapitre introduit les différents formats de radioligands anti-PD-L1 employés dans la littérature pour l'imagerie TEP préclinique et clinique de PD-L1. Les résultats relatifs à la mise en place et à la caractérisation des modèles précliniques de CPNPC PD-L1⁺ et PD-L1⁻ utilisés dans cette étude sont présentés dans la partie 2. La partie 3 décrit la production et le radiomarquage des différents radioligands C4. Enfin, la partie 4 regroupe les résultats des

expériences d'imagerie TEP/TDM longitudinale réalisées avec les radioligands C4 dans les modèles précliniques de CPNPC PD-L1⁺ et PD-L1⁻.

1. Imagerie TEP de PD-L1 avec différents formats de radioligands

1.1. Imagerie TEP de PD-L1 avec des anticorps IgGs radiomarqués

Les immunoglobulines ou anticorps G (IgGs, ~ 150 kDa) sont des protéines constituées de 2 chaînes lourdes (H pour « heavy », ~ 50 kDa chacune) et de 2 chaînes légères (L pour « light », ~ 25 kDa chacune) identiques, liées entre elles par des ponts disulfures (Schroeder and Cavacini, 2010) (Figure 4). Les chaînes lourdes et légères sont divisées en 2 domaines fonctionnellement distincts : le domaine variable (V) qui confère à l'IgG sa spécificité pour l'antigène, et le domaine constant (C) qui permet notamment l'interaction de l'IgG avec divers composants du système immunitaire. Les domaines variables V_H et V_L constituent les 2 fragments variables (Fv, ~ 25 kDa) de l'IgG, formant ainsi 2 sites de fixation de l'antigène (bivalence). Les 2 fragments Fab (~ 50 kDa) de l'IgG comprennent le fragment variable Fv, et les domaines constants C_L et C_{H1} des chaînes légère et lourde. Enfin, le fragment cristallisable (Fc, ~ 50 kDa) est composé des domaines constants C_{H2}-C_{H3} des 2 chaînes lourdes de l'IgG. Les anticorps IgGs sont divisés en 4 classes (IgG1, IgG2, IgG3, et IgG4), différant dans leur structure (par ex. nombre de ponts disulfures) et dans leur interaction avec les autres composants du système immunitaire.

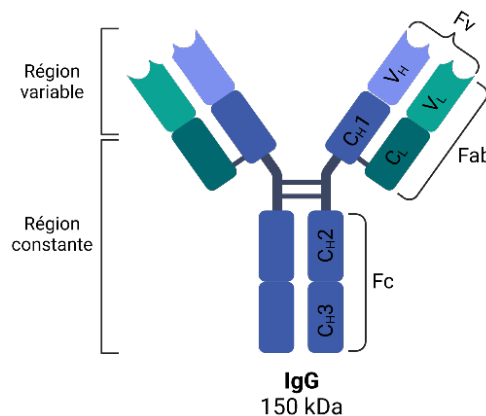


Figure 4. Structure d'une immunoglobuline ou anticorps G (IgG). Abréviations : C_H, domaine constant de la chaîne lourde ; C_L, domaine constant de la chaîne légère ; Fab, « fragment antigen binding » ; Fc, fragment cristallisable ; Fv, fragment variable ; V_H, domaine variable de la chaîne lourde ; V_L, domaine variable de la chaîne légère.

Les anticorps IgGs monoclonaux radiomarqués ont été largement utilisés pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1. L'intérêt de ces anticorps est leur spécificité, étant capables de reconnaître leur cible (ici PD-L1) avec une grande précision. La majorité des études TEP précliniques et cliniques ont utilisé les anticorps thérapeutiques anti-PD-L1 atezolizumab ou avelumab. Le choix de ces anticorps est encouragé par le fait qu'ils sont déjà produits selon les « bonnes pratiques de fabrication » (BPF), qui s'appliquent à la fabrication des médicaments à

usage humain. Cette assurance de qualité facilite la translation clinique des études d'imagerie réalisées avec les anticorps thérapeutiques radiomarqués.

L'atezolizumab, l'avelumab, l'IgG C4 et d'autres anticorps ciblant la protéine PD-L1 humaine (hPD-L1), généralement radiomarqués au ^{89}Zr ($t_{1/2} = 3,3$ jours) ou au cuivre-64 (^{64}Cu , $t_{1/2} = 12,7$ h), ont permis de détecter l'expression de PD-L1 par TEP dans divers modèles de xéno greffes humaines. Ces modèles ont impliqué l'implantation hétérotopique (le plus souvent sous-cutanée), ou parfois orthotopique, de lignées cancéreuses humaines immortalisées dans des souris immunodéficientes (Tableau 4). Par exemple, l'IgG C4 radiomarqué au ^{89}Zr a été utilisé pour visualiser l'expression de PD-L1 dans des souris immunodéficientes portant des xéno greffes humaines sous-cutanées de CPNPC PD-L1⁺ (Moroz *et al.*, 2018; Truillet *et al.*, 2018) (Figure 5). Des anticorps anti-hPD-L1 radiomarqués ont également été utilisés pour l'imagerie TEP de PD-L1 dans des modèles de xéno greffes dérivées de la tumeur du patient (modèles PDX pour « patient-derived xenograft ») (Truillet *et al.*, 2018; Vento *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2020). Contrairement aux modèles de xéno greffes humaines conventionnels, ces modèles PDX reflètent plus fidèlement les caractéristiques génotypiques et phénotypiques uniques de la tumeur originelle du patient. L'anticorps ^{89}Zr -IgG C4 a par exemple permis de détecter l'expression de PD-L1 dans un modèle PDX de CPNPC. Ce modèle a été établi par implantation sous-cutanée dans des souris immunodéficientes de cellules d'une tumeur de CPNPC, juste après sa résection du patient (Truillet *et al.*, 2018).

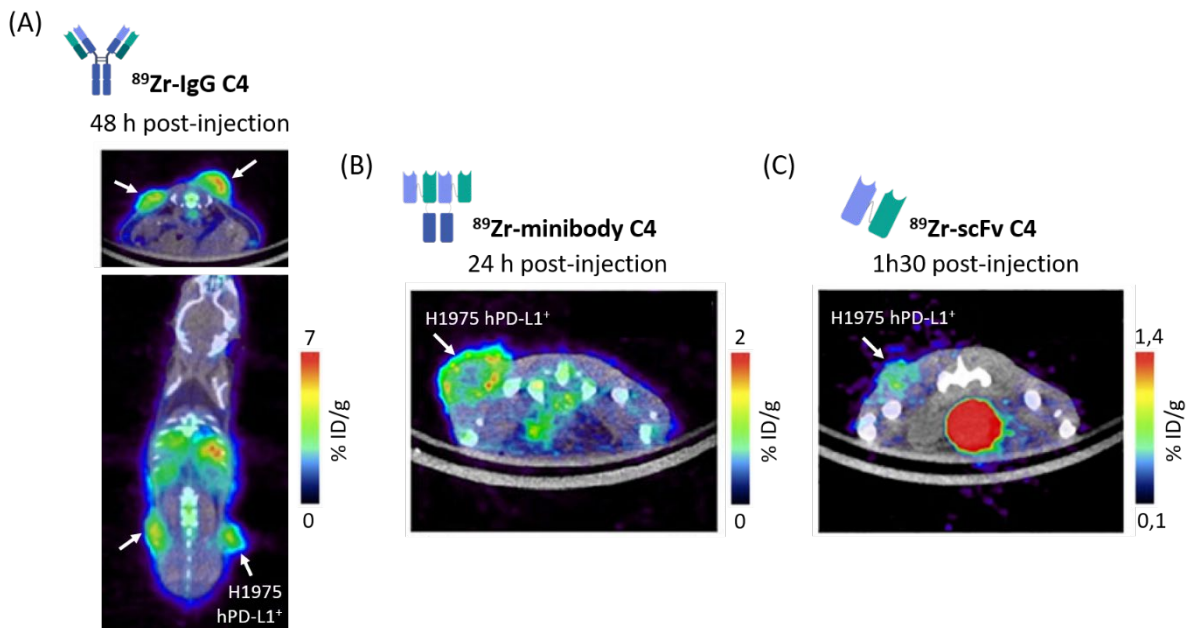


Figure 5. Imagerie TEP de PD-L1 avec l'IgG C4, le minibody C4 et le scFv C4 radiomarqués au ^{89}Zr dans un modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1⁺. (A) (B) (C) Images TEP/TDM de souris immunodéficientes portant des xéno greffes humaines sous-cutanées de CPNPC PD-L1⁺ (H1975, flèches blanches) après administration des radioligands anti-PD-L1 ^{89}Zr -IgG C4 (A), ^{89}Zr -minibody C4 (B) et ^{89}Zr -scFv C4 (C). Ces images ont été obtenues au temps d'acquisition optimal post-injection pour chacun des radioligands. Figure (A) adaptée de Truillet *et al.*, 2018, et figures (B) et (C) adaptées de Wei *et al.*, 2020. Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; scFv, « single-chain variable fragment » ; % ID/g, pourcentage de dose injectée par gramme de tissu ; ^{89}Zr , zirconium-89.

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP dans des modèles de CPNPC humains

Les anticorps « cross-species », ciblant à la fois les protéines PD-L1 humaine et murine (par ex. atezolizumab, avelumab, C4), sont particulièrement intéressants car ils ont également pu être employés pour des études immunoTEP dans des souris immunocompétentes portant des tumeurs murines syngéniques (Tableau 4). L'anticorps ^{89}Zr -IgG C4 a ainsi permis de détecter l'expression de PD-L1 dans des souris portant des tumeurs murines sous-cutanées de mélanome (Moroz *et al.*, 2018; Truillet *et al.*, 2018). Des anticorps radiomarqués reconnaissant uniquement la protéine PD-L1 murine (mPD-L1) ont également été utilisés dans divers modèles syngéniques (Tableau 4). Les études d'imagerie TEP dans des souris immunocompétentes ont permis d'évaluer l'impact de l'expression endogène de PD-L1 dans les tissus sains sur la biodistribution de l'anticorps anti-PD-L1 radiomarqué.

La toute première étude immunoTEP de PD-L1 clinique a été réalisée avec l'atezolizumab radiomarqué au ^{89}Zr , chez 22 patients souffrant de CPNPC, de cancer de la prostate, et de cancer du sein triple négatif (CSTN) avancés, avant qu'ils ne soient traités avec cet anticorps thérapeutique (Bensch, van der Veen, *et al.*, 2018) (Figure 6). Cette étude a mis en évidence l'hétérogénéité d'expression de PD-L1 au sein d'une même tumeur, et entre les différentes tumeurs d'un même patient.

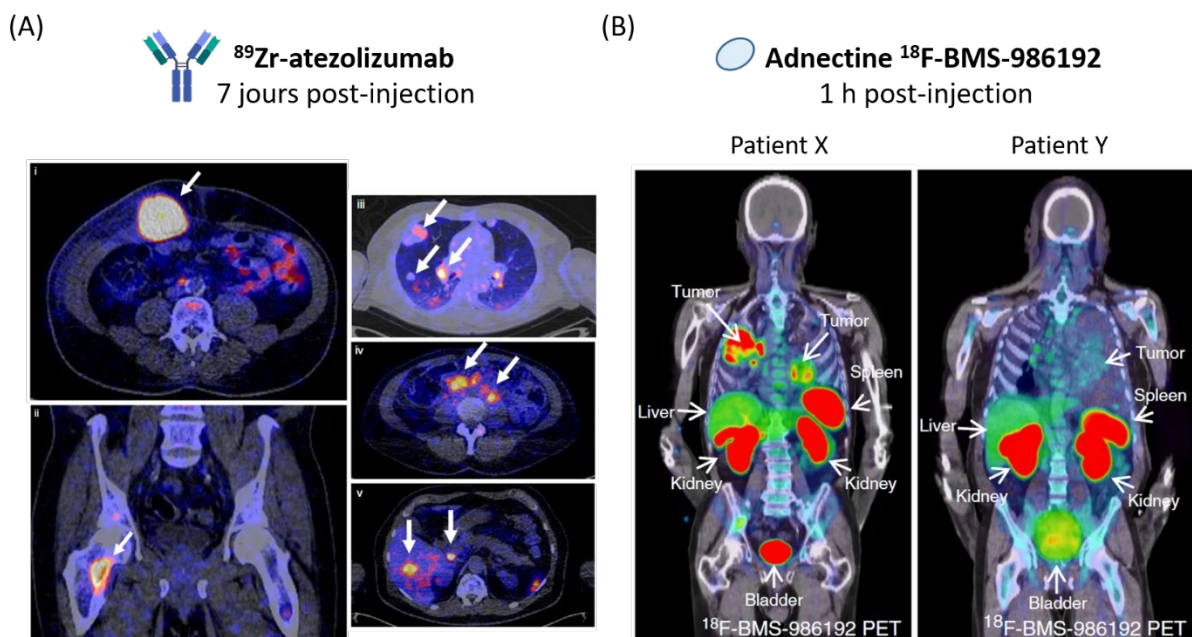


Figure 6. Imagerie TEP de PD-L1 avec l'anticorps atezolizumab ou l'adnectine BMS-986192 radiomarqués chez des patients souffrant de cancers avancés. (A) Images TEP/TDM obtenues chez divers patients souffrant de CPNPC, de CSTN et de cancer de la prostate avancés, 7 jours après administration de l'IgG anti-PD-L1 ^{89}Zr -atezolizumab. Les lésions tumorales PD-L1⁺ détectées sont indiquées par des flèches blanches. Figures adaptées de Bensch *et al.*, 2018. (B) Images TEP/TDM de 2 patients souffrant de CPNPC, 1 h après injection de l'adnectine anti-PD-L1 ^{18}F -BMS-986192. Les tumeurs du patient X montrent une forte expression globale de PD-L1, au contraire de celles du patient Y. Figures adaptées de Niemeijer *et al.*, 2018. Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; CSTN, cancer du sein triple négatif ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; ^{18}F , fluor-18 ; ^{89}Zr , zirconium-89.

Tableau 4. Imagerie immunoTEP de PD-L1 avec des IgGs anti-PD-L1 radiomarqués. Les études précliniques et clinique présentées dans ce tableau ont utilisé des IgGs radiomarqués, ciblant la protéine PD-L1 humaine et/ou murine, pour détecter l'expression de PD-L1 par TEP dans divers modèles tumoraux.

IgG anti-PD-L1	Classe	Réactivité	Radio-nucléide	Modèle tumoral	Temps imagerie TEP ^a	Référence
Etudes précliniques						
Atezolizumab	IgG1	Anti-humain et souris	⁶⁴ Cu	CSTN humain orthotopique Cancer sein murin orthotopique	48 h	Lesniak <i>et al.</i> , 2016
Atezolizumab C4	IgG1	Anti-humain et souris	⁸⁹ Zr	CPNPC humain sc. Mélanome murin sc.	48 h	Moroz <i>et al.</i> , 2018
Atezolizumab	IgG1	Anti-humain et souris	⁸⁹ Zr	Cancer poumon humain sc.	96 h (4 jours)	Ehlerding <i>et al.</i> , 2019
Atezolizumab	IgG1	Anti-humain et souris	⁸⁹ Zr	Modèle PDX tumeur rénale orthotopique	144 h (6 jours)	Vento <i>et al.</i> , 2019
Avelumab	IgG1	Anti-humain et souris	⁸⁹ Zr	CSTN humain sc.	72 h	Jagoda <i>et al.</i> , 2019
Avelumab	IgG1	Anti-humain et souris	⁸⁹ Zr	CSTN humain sc.	48 h	Li <i>et al.</i> , 2020
C4	IgG1	Anti-humain et souris	⁸⁹ Zr	CPNPC et cancer prostate humains sc. Modèle PDX CPNPC sc. Mélanome murin sc.	48 h	Truillet <i>et al.</i> , 2018
MX001	IgG1	Anti-humain et souris	⁶⁴ Cu	Glioblastome et cancer gastrique humains sc. Cancers sein et colon murins sc.	62 h	Xu <i>et al.</i> , 2018
6E11	IgG1	Anti-humain et souris	⁸⁹ Zr	CPNPC humain sc. Mélanome et cancer colon murins sc.	72 h	Christensen <i>et al.</i> , 2020
CX-075 Probody CX-072	IgG4	Anti-humain et souris	⁸⁹ Zr	CSTN humain sc. Cancer colon murin sc.	144 h (6 jours)	Giesen <i>et al.</i> , 2020
SHR-1316	IgG4	Anti-humain	¹²⁴ I	Modèle PDX CPNPC sc.	24 h	Wen <i>et al.</i> , 2020
REGN3504	IgG4	Anti-humain	⁸⁹ Zr	Cancer poumon et CSTN humains sc. Souris humanisées hPD-1 ⁺ et hPD-L1 ⁺	144 h (6 jours)	Kelly <i>et al.</i> , 2021
10F.9G2	IgG2	Anti-souris	⁶⁴ Cu	Mélanome murin sc.	24 h	Hettich <i>et al.</i> , 2016
10F.9G2	IgG2	Anti-souris	⁸⁹ Zr	CETEC et mélanome murins sc.	48-96 h (2-4 jours)	Kikuchi <i>et al.</i> , 2017

Tableau 4 (suite). Imagerie immunoTEP de PD-L1 avec des IgGs anti-PD-L1 radiomarqués.

IgG anti-PD-L1	Classe	Réactivité	Radio-nucléide	Modèle tumoral	Temps imagerie TEP ^a	Référence
Etudes précliniques						
10F.9G2	IgG2	Anti-souris	⁶⁴ Cu	Cancer pancréas murin sc. et orthotopique	24 h	Zhao <i>et al.</i> , 2020
Y003	IgG1	Anti-souris	⁸⁹ Zr	Cancer colon murin sc.	120 h (5 jours)	Ren <i>et al.</i> , 2021
Etude clinique						
Atezolizumab	IgG1	Anti-humain et souris	⁸⁹ Zr	22 patients avec CPNPC, CSTN et cancer prostate avancés, avant traitement avec atezolizumab	168 h (7 jours)	Bensch <i>et al.</i> , 2018

^aTemps d'acquisition optimal après administration du radioligand, permettant d'obtenir les images TEP de meilleure qualité en termes d'accumulation tumorale et de contraste tumeur/bruit. Abréviations : CETEC, carcinome épidermoïde de la tête et du cou ; CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; CSTN, cancer du sein triple négatif ; PD-1, « programmed cell death protein 1 » ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; PDX, « patient-derived xenograft » ; sc., sous-cutané ; ⁶⁴Cu, cuivre-64 ; ⁸⁹Zr, zirconium-89 ; ¹²⁴I, iode-124.

Les IgGs possèdent une longue demi-vie plasmatique (~ 21 jours), en raison de leur grande taille (> 60 kDa) empêchant leur filtration rénale, et de leur protection du catabolisme cellulaire via la voie de recyclage du FcRn (Figure 7). Cette circulation prolongée laisse le temps aux IgGs anti-PD-L1 radiomarqués de s'accumuler fortement dans les tumeurs PD-L1⁺ cibles, atteignant des valeurs comprises entre 5-30 % de la dose injectée par gramme de tissu (% ID/g). Cependant, leur longue persistance dans le sang associée à leur diffusion relativement lente dans les tissus impliquent qu'il faut généralement plusieurs jours pour atteindre une accumulation maximale dans la tumeur, et une élimination suffisante dans les autres tissus non cibles. Ainsi, le temps d'acquisition optimal pour obtenir des images TEP avec le meilleur contraste tumeur/bruit se situe généralement 2-7 jours après administration de l'IgG radiomarqué (Tableau 4). En pratique, cela signifie que les patients doivent retourner à l'hôpital plusieurs jours après l'injection du radiopharmaceutique pour pouvoir être imagés, ce qui reste complexe à organiser en routine clinique.

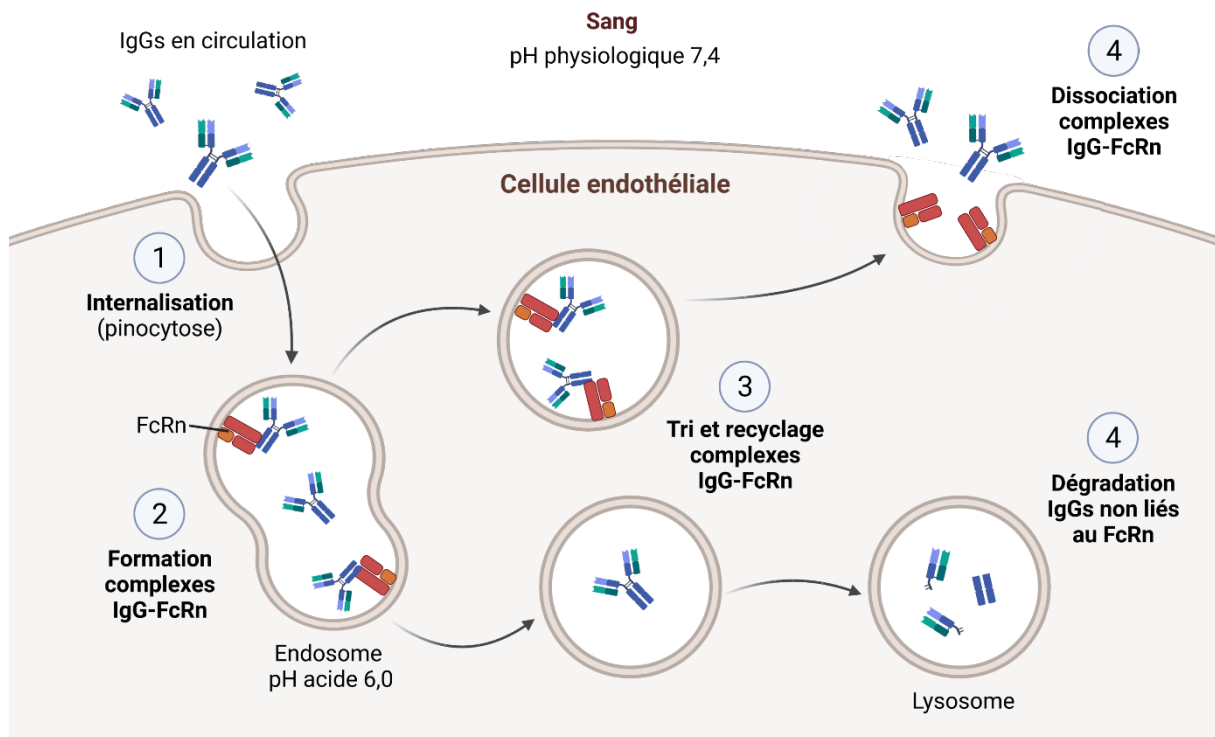


Figure 7. Le mécanisme de recyclage cellulaire des IgGs orchestré par le récepteur Fc néonatal (FcRn). Les IgGs circulant dans le sang sont internalisés par la cellule (par ex. cellule endothéliale) via pinocytose (endocytose de liquide extracellulaire) dans des endosomes. L'environnement acide des endosomes permet l'interaction des IgGs avec les récepteurs FcRn exprimés dans ces vésicules. Les complexes FcRn-IgG ainsi formés sont ensuite recyclés jusqu'à la surface de la cellule. Exposés au pH physiologique du sang, les complexes se dissocient alors et les IgGs sont finalement relargués dans la circulation sanguine par exocytose. Lorsque les récepteurs FcRn intracellulaires sont saturés, les IgGs non liés au FcRn sont dirigés vers les lysosomes pour être dégradés. Abréviations : FcRn, récepteur Fc néonatal.

Compte tenu des limitations intrinsèques associées aux anticorps radiomarqués, diverses stratégies ont été investiguées dans le but de développer des radioligands avec des propriétés cinétiques plus désirables pour l'imagerie TEP de PD-L1. La stratégie d'optimisation la plus explorée a consisté à utiliser de plus petits formats de radioligands anti-PD-L1, comme des fragments d'anticorps ou des petites protéines (Figure 9).

1.2. Optimisation de l'imagerie TEP de PD-L1 avec des fragments d'anticorps et des petites protéines radiomarqués

Les fragments d'anticorps et les petites protéines radiomarqués possèdent un certain nombre de caractéristiques qui les rapprochent du radioligand idéal pour l'imagerie TEP. Contrairement aux anticorps entiers, ces formats présentent de courtes demi-vies plasmatiques (quelques minutes à quelques heures). En effet, leur plus petite masse moléculaire (< 60 kDa) leur permet d'être rapidement éliminés de la circulation sanguine, via filtration par le glomérule rénal puis excrétion urinaire (Xenaki, Oliveira and van Bergen en Henegouwen, 2017). De plus, les fragments d'anticorps dénués de domaine Fc ne peuvent pas interagir avec le FcRn, et ne sont donc pas protégés de la dégradation intracellulaire par celui-ci. Cette élimination rapide du

sang permet d'obtenir des images TEP avec un contraste tumeur/bruit optimal à des temps courts (1-4 h) après administration du radioligand. Ainsi, l'injection du patient et l'examen TEP peuvent être réalisés le même jour, simplifiant la procédure clinique. Des radionucléides de période plus courte, comme le ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ min) ou le gallium-68 (^{68}Ga , $t_{1/2} = 68$ min) peuvent être employés pour le radiomarquage, diminuant la dose de radioactivité reçue par le patient. Un autre avantage à l'utilisation de radioligands de plus petites tailles repose sur leur diffusion plus rapide et leur pénétration plus profonde au sein des tumeurs solides (Thurber, Schmidt and Wittrup, 2008). Ce point a notamment été mis en évidence par Maute *et al.*, qui ont comparé la distribution intra-tumorale d'un anticorps et d'une petite protéine (14 kDa) anti-hPD-L1 fluorescents, injectés dans des souris portant des tumeurs hPD-L1⁺. Tandis que le signal fluorescent intra-tumoral associé à l'anticorps était limité aux régions périvasculaires, le signal fluorescent associé à la petite protéine était quant à lui bien répandu dans toute la tumeur, atteignant des épitopes inaccessibles à l'anticorps (Maute *et al.*, 2015). Enfin, en plus de l'absence de recyclage par le FcRn, un autre aspect intéressant des fragments d'anticorps sans domaine Fc concerne leur absence d'interaction avec le récepteur Fc-gamma I (FcγRI). Ce récepteur est exprimé à la surface de diverses cellules immunitaires (par ex. macrophages) dans les tissus sains, comme le foie ou la rate. L'interaction des anticorps anti-PD-L1 radiomarqués avec le FcγRI via leur domaine Fc pourrait contribuer à leur accumulation non-spécifique dans ces tissus (Vivier *et al.*, 2019).

Différents types de fragments d'anticorps anti-PD-L1 ont été développés (Figure 9 ; Tableau 5). Le fragment variable simple chaîne (scFv pour « single-chain variable fragment », ~ 25 kDa) est obtenu par assemblage des domaines variables V_H et V_L via un petit peptide de liaison. Deux fragments scFv peuvent être fusionnés au domaine Fc pour donner un fragment scFv-Fc (~ 80-100 kDa), ou bien à 2 domaines C_{H3} pour former un minibody (~ 80 kDa). Les nanobodies (aussi appelés « single-domain antibodies », ~ 15 kDa) sont dérivés du domaine variable (nommé VHH) des anticorps naturellement présents chez les camélidés (De Vos *et al.*, 2013). Un fragment scFv C4 et un minibody C4 dérivés de l'IgG C4 ont été produits (Wei *et al.*, 2020). La biodistribution de ces 2 fragments C4 radiomarqués au ^{89}Zr a été évaluée dans des souris immunodéficientes portant des xénogreffes humaines sous-cutanées de CPNPC PD-L1⁺, ainsi que dans des souris immunocompétentes portant des tumeurs murines sous-cutanées de mélanome (Figure 5). Le ^{89}Zr -minibody C4, et d'autres fragments d'anticorps anti-PD-L1 radiomarqués au ^{89}Zr comme le F(ab')₂ dérivé de l'anticorps 10F.9G2 ou le scFv-Fc KN035, ont permis de visualiser efficacement l'expression tumorale de PD-L1 par imagerie TEP, 24 h seulement après leur injection chez les souris (Tableau 5). Le ^{89}Zr -scFv C4, ainsi que divers nanobodies anti-PD-L1 radiomarqués au ^{18}F ou au ^{68}Ga , ont été utilisés pour l'imagerie TEP de PD-L1 à des temps encore plus courts, entre 1-2h30 après leur administration (Figure 8, Tableau 5).

A côté de ces fragments d'anticorps, de petites protéines ciblant PD-L1 avec une forte affinité ont également été produites par génie génétique (Tableau 5). En plus de leurs propriétés physicochimiques *in vivo* favorables (grande stabilité, faible immunogénicité), ces petites protéines synthétiques sont facilement exprimées dans des cellules microbiennes, permettant une production à grande échelle à moindre coût (Liu *et al.*, 2019). Des variants HAC (« high-affinity consensus ») de l'ectodomain de PD-1 (HAC-PD-1, ~ 14 kDa) ont été développés. L'adnectine BMS-986192 (~ 10 kDa) et la protéine FN3_{hPD-L1} (~ 12 kDa) ont été dérivées du 10^{ème} domaine de type III (Fn3) de la glycoprotéine humaine fibronectine (Lipovsek, 2011). Les affibodies Z_{PD-L1_1} et Z_{PD-L1_4} (~ 7 kDa) sont quant à eux issus d'un des domaines de liaison aux IgGs de la protéine A de la bactérie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (González Trotter *et al.*, 2017). Enfin, le petit

peptide circulaire WL12 (~ 2 kDa) a également été sélectionné. Ces petites protéines radiomarquées au ^{64}Cu , ^{18}F ou ^{68}Ga ont montré une accumulation rapide et spécifique dans des xénogreffes humaines de tumeurs PD-L1⁺, et ont ainsi permis d'obtenir des images TEP avec un contraste tumeur/bruit optimal à des temps très courts post-injection (1-2 h) (Figure 8).

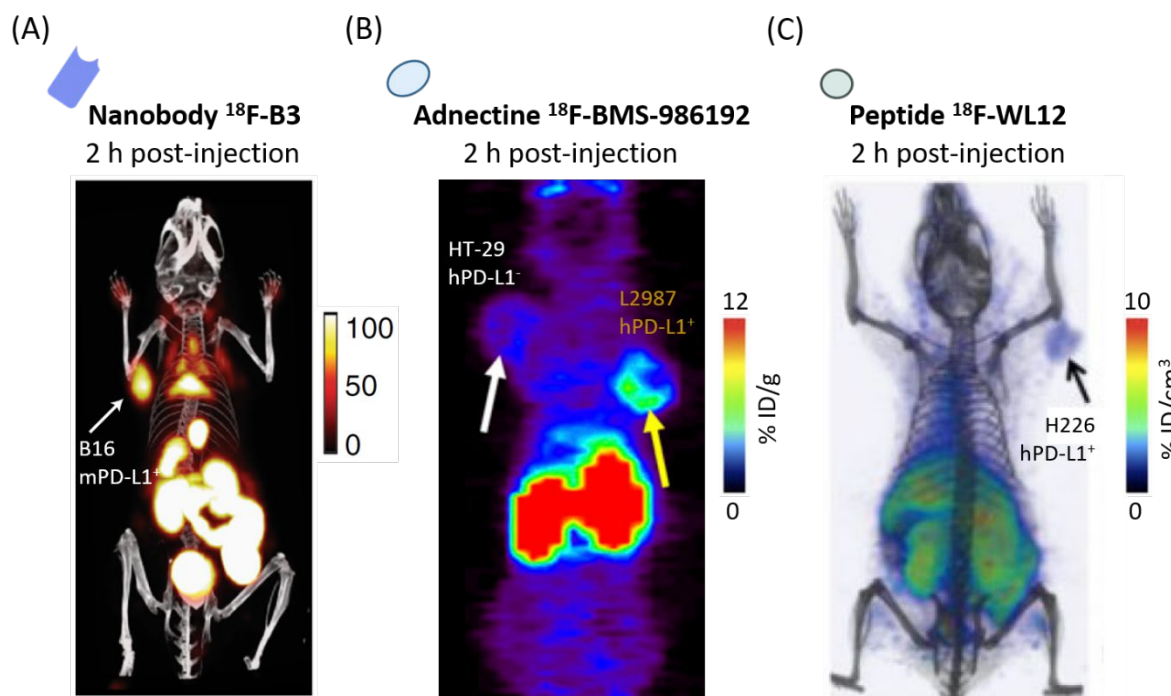


Figure 8. Imagerie TEP préclinique de PD-L1 avec divers petits radioligands anti-PD-L1. (A) Image TEP/TDM d'une souris immunocompétente portant une tumeur murine sous-cutanée de mélanome PD-L1⁺ (flèche blanche), 2 h après injection du nanobody anti-PD-L1 ^{18}F -B3. Figure adaptée de Ingram *et al.*, 2017. (B) Image TEP d'une souris immunodéficente portant des xénogreffes humaines sous-cutanées de cancer du côlon PD-L1⁻ (flèche blanche) et de cancer du poumon PD-L1⁺ (flèche jaune), 2 h après injection de l'adnectine anti-PD-L1 ^{18}F -BMS-986192. Figure adaptée de Donnelly *et al.*, 2018. (C) Image TEP/TDM (représentation en volume 3D) d'une souris immunodéficente portant une xénogreffe humaine sous-cutanée de cancer du poumon PD-L1⁺ (flèche noire), 2 h après injection du petit peptide anti-PD-L1 ^{18}F -WL12. Figure adaptée de Lesniak *et al.*, 2019. Abréviations : PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; % ID/g, pourcentage de dose injectée par gramme de tissu ; ^{18}F , fluor-18.

Compte tenu des résultats précliniques encourageants obtenus avec l'adnectine anti-PD-L1 ^{18}F -BMS-986192, celle-ci a également été utilisée dans des études TEP cliniques, impliquant des patients souffrant de CPNPC (Niemeijer *et al.*, 2018; Huisman *et al.*, 2020). Les patients ont été administrés avec l'adnectine radiomarquée puis imagés 1 h plus tard. Une accumulation plus importante du radioligand a été observée dans les lésions avec une expression de PD-L1 ≥ 50 % (mesurée par IHC), comparé aux lésions avec une expression de PD-L1 < 50 % (Niemeijer *et al.*, 2018) (Figure 6).

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP dans des modèles de CPNPC humains

Tableau 5. Imagerie TEP de PD-L1 avec des fragments d'anticorps et des petites protéines anti-PD-L1 radiomarqués. Les études précliniques et cliniques présentées dans ce tableau ont utilisé divers fragments d'anticorps, petites protéines ou peptides radiomarqués, ciblant la protéine PD-L1 humaine et/ou murine, pour détecter l'expression de PD-L1 par imagerie TEP dans différents modèles tumoraux.

Ligand anti-PD-L1	Type	Réactivité	Radio-nucléide	Modèle tumoral	Temps imagerie TEP ^a	Référence
Etudes précliniques						
F(ab') ₂	Fragment de l'IgG2 10F.9G2 (97 kDa)	Anti-souris	⁸⁹ Zr	Mélanome murin sc.	24 h	Bridgwater <i>et al.</i> , 2020
KN035	scFv-Fc (80 kDa)	Anti-humain	⁸⁹ Zr	Gliome humain sc.	24-120 h (1-5 jours)	Li <i>et al.</i> , 2018
Minibody C4 scFv C4	Fragments de l'IgG1 C4 (80 et 25 kDa)	Anti-humain et souris	⁸⁹ Zr	CPNPC humain sc. Mélanome murin sc.	24 h 1h30-2h30	Wei <i>et al.</i> , 2020
B3	Nanobody (14 kDa)	Anti-souris	¹⁸ F	Mélanome murin sc.	2 h	Ingram <i>et al.</i> , 2017
Nb109	Nanobody (14 kDa)	Anti-humain	⁶⁸ Ga	Mélanome et cancer du sein humains sc.	1 h	Lv <i>et al.</i> , 2020
Nb109	Nanobody (14 kDa)	Anti-humain	⁶⁸ Ga	Cancer colon murin (mPD-L1 ⁻ hPD-L1 ⁺) sc.	1 h	Qin <i>et al.</i> , 2021
K2	Nanobody (14 kDa)	Anti-humain	⁶⁸ Ga	Mélanome humain sc.	1h20	Bridoux <i>et al.</i> , 2020
HAC-PD-1	Petite protéine (14 kDa)	Anti-humain	⁶⁴ Cu	Cancer colon murin (mPD-L1 ⁻ hPD-L1 ⁺) sc.	1 h	Maute <i>et al.</i> , 2015
HAC-PD-1	Petite protéine (14 kDa)	Anti-humain	⁶⁴ Cu ⁶⁸ Ga	Cancer colon murin (mPD-L1 ⁻ hPD-L1 ⁺) sc.	1 h	Mayer <i>et al.</i> , 2017
Adnectine BMS-986192	Petite protéine (12 kDa)	Anti-humain	¹⁸ F	Cancer poumon et colon humains sc.	2 h	Donnelly <i>et al.</i> , 2018
Adnectine BMS-986192	Petite protéine (12 kDa)	Anti-humain	¹⁸ F	Cancer poumon et ovaires humains sc.	1 h	Stutvoet <i>et al.</i> , 2020
FN3 _{hPD-L1}	Petite protéine (12 kDa)	Anti-humain	⁶⁴ Cu	CSTN et lymphome humains sc.	4 h	Natarajan <i>et al.</i> , 2019
Affibody Z _{PD-L1_1}	Petite protéine (7 kDa)	Anti-humain	¹⁸ F	Lymphome et mélanome humains sc.	1h30	González Trotter <i>et al.</i> , 2017
Affibody Z _{PD-L1_4}	Petite protéine (7 kDa)	Anti-humain	¹⁸ F ⁶⁸ Ga	Lymphome et mélanome humains sc.	1h30	Rubins <i>et al.</i> , 2021

Tableau 5 (suite). Imagerie TEP de PD-L1 avec des fragments d'anticorps et des petites protéines anti-PD-L1 radiomarqués.

Ligand anti-PD-L1	Type	Réactivité	Radio-nucléide	Modèle tumoral	Temps imagerie TEP ^a	Référence
Etudes précliniques						
WL12	Petit peptide (2 kDa)	Anti-humain	⁶⁴ Cu	Xénogreffes CHO hPDL1 ⁺ sc.	1 h	Chatterjee <i>et al.</i> , 2017
WL12	Petit peptide (2 kDa)	Anti-humain	⁶⁸ Ga	CSTN humain sc.	1 h	De Silva <i>et al.</i> , 2018
WL12	Petit peptide (2 kDa)	Anti-humain	⁶⁴ Cu	CPNPC humain sc. CSTN humain orthotopique	2 h	Kumar <i>et al.</i> , 2019
WL12	Petit peptide (2 kDa)	Anti-humain	¹⁸ F	CPNPC et CSTN humains sc.	2 h	Lesniak <i>et al.</i> , 2019
Etudes cliniques						
Adnectine BMS-986192	Petite protéine (12 kDa)	Anti-humain	¹⁸ F	13 patients avec CPNPC avancé, avant traitement avec nivolumab	1 h	Niemeijer <i>et al.</i> , 2018
Adnectine BMS-986192	Petite protéine (12 kDa)	Anti-humain	¹⁸ F	9 patients avec CPNPC avancé	1 h	Huisman <i>et al.</i> , 2020

^aTemps d'acquisition optimal après administration du radioligand, permettant d'obtenir les images TEP de meilleure qualité en termes d'accumulation tumorale et de contraste tumeur/bruit. Abréviations : CHO, « Chinese hamster ovary » ; CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; CSTN, cancer du sein triple négatif ; Fab, « fragment antigen binding » ; Fc, fragment cristallisable ; HAC, « high-affinity consensus » ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; sc., sous-cutané ; scFv, « single-chain variable fragment » ; ¹⁸F, fluor-18 ; ⁶⁴Cu, cuivre-64 ; ⁶⁸Ga, Gallium-68 ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

En dépit de leur PK avantageuse, l'accumulation tumorale absolue de ces petits formats de radioligand anti-PD-L1 reste plus faible que pour les anticorps radiomarqués (2-10 % ID/g). En effet, même s'ils diffusent rapidement dans les tumeurs, leur élimination rapide de la circulation sanguine ne leur laisse pas beaucoup de temps pour s'accumuler dans celles-ci. Le fait que la plupart de ces petits radioligands possède un seul site de fixation à l'antigène (monovalence) peut également se traduire par une avidité moindre pour la protéine PD-L1 tumorale, en comparaison des IgGs radiomarqués bivalents. Par ailleurs, s'ils sont rapidement éliminés des autres tissus non cibles, les fragments d'anticorps/petites protéines radiomarqués sont fortement retenus dans les reins, avec des valeurs très souvent >> 30 % ID/g. Après leur filtration par le glomérule, ces radioligands sont réabsorbés et catabolisés par les cellules tubulaires proximales du parenchyme rénal. Une fois le radioligand dégradé, le radionucléide résiduel reste piégé et s'accumule dans les lysosomes de ces cellules.

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP dans des modèles de CPNPC humains

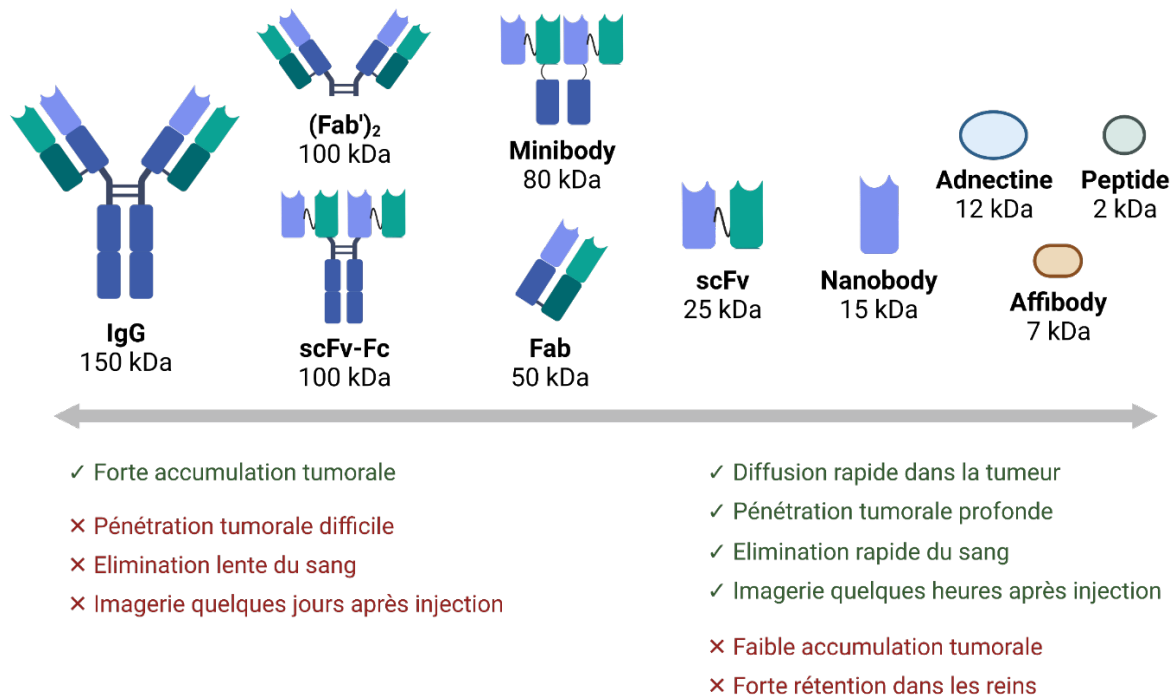


Figure 9. Différents formats de radioligands disponibles pour l'imagerie TEP de PD-L1. Représentation schématisée des divers formats de radioligands anti-PD-L1 développés pour l'imagerie TEP de PD-L1, allant des anticorps entiers et fragments d'anticorps aux petites protéines synthétiques. Ces radioligands possèdent des propriétés pharmacocinétiques bien distinctes, notamment en fonction de leur taille. Figure adaptée de Bouleau, Lebon and Truillet, 2021. Abréviations : Fab, « fragment antigen binding » ; Fc, fragment cristallisable ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; scFv, « single-chain variable fragment ».

Une autre stratégie pour optimiser la PK des anticorps radiomarqués utilisés pour l'imagerie TEP de PD-L1, sans avoir à passer par une réduction de taille, consiste à supprimer leur interaction avec le FcRn, responsable de leur demi-vie plasmatique prolongée.

1.3. Optimisation de l'imagerie TEP de PD-L1 par suppression de l'interaction entre les IgGs radiomarqués et le récepteur Fc néonatal

Le récepteur FcRn est un hétérodimère, constitué d'une chaîne lourde α (40 kDa) transmembranaire, structurellement apparentée aux molécules du CMH I. Cette chaîne lourde est associée de manière non-covalente à une protéine de β 2-microglobuline (12 kDa), formant la chaîne légère du récepteur (Pyzik *et al.*, 2019). Le FcRn est exprimé dans les cellules endothéliales, épithéliales et immunitaires de nombreux tissus de l'organisme, comme la peau, les muscles, les reins, le foie, la paroi intestinale ou encore le placenta. A pH acide (\sim pH 6), le FcRn se lie avec forte affinité aux anticorps IgGs via leur fragment Fc, et à la protéine de transport albumine. L'affinité du récepteur pour ces 2 types de protéines devient en revanche très faible à pH neutre (pH 7,4) (Roopenian and Akilesh, 2007).

La structure cristalline des complexes Fc-FcRn et des études de mutagenèse dirigée ont permis de mettre en évidence les acides aminés clés du fragment Fc des IgGs humains impliqués dans leur liaison avec le FcRn murin/humain (Kim *et al.*, 1999; Burvenich *et al.*, 2016; Pyzik *et al.*, 2019). Ces études ont ainsi identifié l'isoleucine 253 (I253) et l'histidine 310 (H310) dans le domaine C_H2, et l'histidine 435 (H435) dans le domaine C_H3. Les histidines H310 et H435 se chargent positivement à pH acide, permettant alors la formation de ponts salins avec certains résidus du FcRn (par ex. glutamine Glu117, acide aspartique Asp137 ou tryptophane Trp133). Lorsque le pH augmente (pH > 6) ces histidines sont progressivement déprotonées, expliquant ainsi la dépendance de l'interaction IgG-FcRn au pH (Roopenian and Akilesh, 2007).

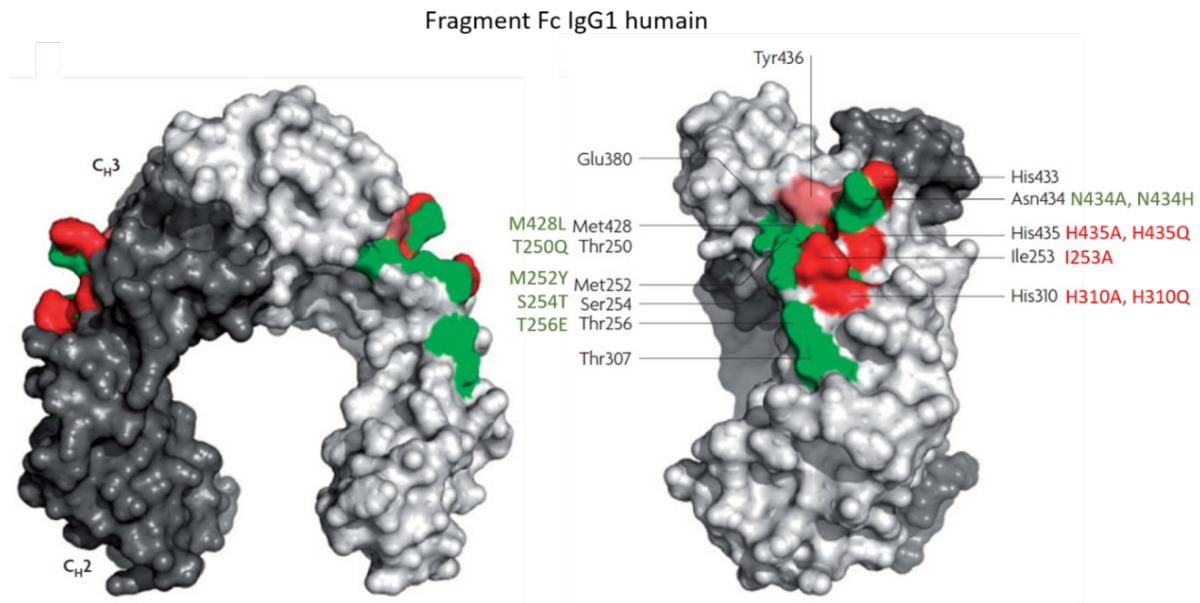


Figure 10. Modulation de l'interaction IgG-FcRn par modification génétique du fragment Fc de l'IgG. La liaison de l'IgG avec le FcRn peut être modulée en modifiant génétiquement certains résidus du fragment Fc, représentés en couleur sur la structure cristalline du fragment Fc de l'IgG1 humain. La mutation des acides aminés colorés en rouge/rose supprime ou diminue fortement l'interaction de l'IgG avec le FcRn, tandis que la mutation des acides aminés colorés en vert renforce cette interaction. Figure adaptée de Roopenian and Akilesh, 2007. Abréviations : Ala (A), alanine ; Asn (N), asparagine ; FcRn, récepteur Fc néonatal ; Gln (Q), glutamine ; Glu (E), glutamate ; His (H), histidine ; Ile (I), isoleucine ; Leu (L), leucine ; Met (M), méthionine ; Ser (S), sérine ; Thr (T), thréonine ; Tyr (Y), tyrosine.

Le FcRn joue un rôle central dans la régulation des niveaux d'IgGs circulant dans le sang, en les protégeant du catabolisme intracellulaire via un mécanisme de recyclage (Roopenian and Akilesh, 2007) (Figure 7). Ce récepteur est ainsi directement responsable de la demi-vie plasmatique prolongée des IgGs (~ 19-21 jours) en comparaison d'autres protéines, comme les IgAs (~ 5-7 jours). Chen *et al.* ont par exemple étudié la PK d'un IgG1 humain radiomarqué à l'iode-125 (¹²⁵I) dans des souris « wild-type » (WT) et dans des souris dont le gène codant la chaîne α du FcRn a été inactivé (souris FcRn KO pour « knockout »). Une élimination plasmatique 8 fois plus rapide de l'IgG1 radiomarqué a été observée chez les souris FcRn KO en comparaison des souris WT (Chen *et al.*, 2014). En plus du recyclage des IgGs, le FcRn possède également d'autres rôles physiologiques importants. Il intervient notamment dans la transcytose des IgGs d'un pôle à l'autre de certaines cellules, permettant ainsi par exemple le transfert des IgGs maternels au fœtus à travers le placenta. Le FcRn serait également impliqué dans la

régulation de la réponse immunitaire innée et dans le processus de présentation des antigènes (Pyzik *et al.*, 2019).

Le FcRn étant directement responsable de la demi-vie plasmatique des IgGs, il apparaît alors possible de moduler la durée de cette demi-vie en modifiant l'interaction IgG-FcRn. La PK des IgGs circulant dans le sang peut ainsi être spécifiquement optimisée en fonction de l'application désirée. En thérapie, l'utilisation d'IgGs (ou de protéines fusionnées au fragment Fc) avec une affinité accrue pour le FcRn à pH 6, et donc une demi-vie plasmatique encore plus longue, permettrait de réduire leur dose et/ou fréquence d'administration. L'introduction de mutations sur certains résidus du fragment Fc (par ex. thréonine T250, ou méthionine M428) a permis d'augmenter l'affinité d'IgGs humains pour le FcRn à pH 6,0, tout en maintenant une absence de liaison à pH 7,4 (Roopenian and Akilesh, 2007) (Figure 10).

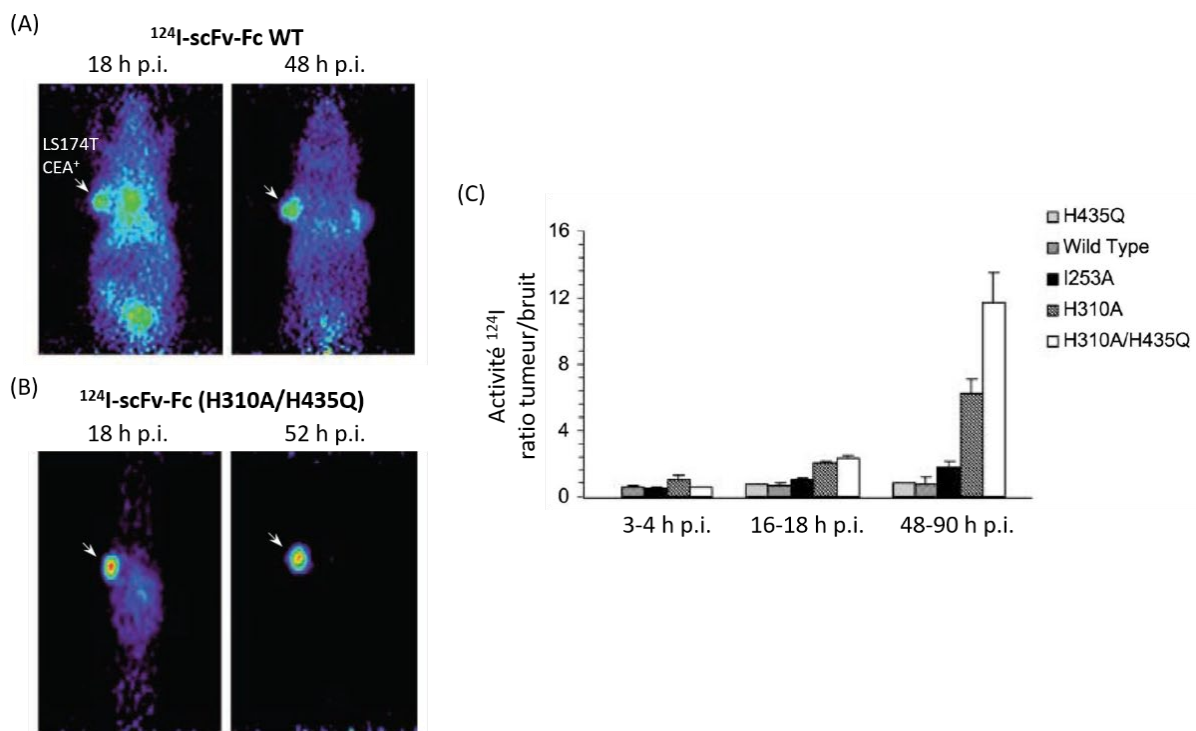


Figure 11. Imagerie TEP de la protéine CEA avec différents fragments d'anticorps ^{124}I -scFv-Fc mutants présentant une affinité réduite pour le FcRn murin. (A) (B) Images TEP de souris portant des xénogreffes humaines sous-cutanées de cancer du côlon CEA⁺ (flèches blanches), à différents temps après injection des fragments d'anticorps anti-CEA ^{124}I -scFv-Fc WT (A) et ^{124}I -scFv-Fc (H310A/H435Q) (B). (C) Ratio de signal tumeur/bruit dérivé de l'analyse des images TEP à différents temps après injection des fragments ^{124}I -scFv-Fc WT et mutants. Figure adaptée de Kenanova *et al.*, 2005. Abréviations : Ala (A), alanine ; CEA, antigène carcinoembryonnaire ; Gln (Q), glutamine ; His (H), histidine ; Ile (I), isoleucine ; p.i., post-injection ; scFv, « single-chain variable fragment » ; WT, « wild-type » ; ^{124}I , iode-124.

Tableau 6. Etudes avec des anticorps/fragments d'anticorps radiomarqués porteurs de mutations supprimant leur interaction avec le FcRn.

Ligand	Mutation(s) fragment Fc	Résultats	Référence
Fragment Fc de l'IgG1 humain	I253A, H310A, H435A	- Affinité réduite des fragments Fc mutants pour le mFcRn à pH 6. - Demi-vies plasmatiques des fragments Fc mutants radiomarqués ^{125}I réduites dans souris immunocompétentes.	Kim <i>et al.</i> , 1999
IgG1 anti-TNT-3 ciblant l'ADN	I253A	- Elimination corps entier plus rapide pour le ^{125}I -IgG1 mutant dans souris immunocompétentes comparé au ^{125}I -IgG1 WT.	Hornick <i>et al.</i> , 2000
Fragments scFv-Fc anti-CEA, avec Fc de l'IgG1 humain	I253A, H310A, H435Q, H435R, H310A/H435Q	- Demi-vies plasmatiques des $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ -scFv-Fc mutants réduites dans souris immunocompétentes. - TEP : meilleur contraste tumeur/bruit à 48 h p.i. avec ^{124}I -scFv-Fc mutants comparé au ^{124}I -scFv-Fc WT dans souris immunodéficientes avec xéno greffes humaines CEA ⁺ .	Kenanova <i>et al.</i> , 2005
Fragment scFv-Fc anti-CEA, avec Fc de l'IgG1 humain	I253A, H310A, H310A/H435Q	- Elimination plus rapide du sang et accumulation maximale dans xéno greffes humaines CEA ⁺ plus faible mais obtenue plus tôt (12 h vs 24 h p.i.) pour le double mutant $^{125}\text{I}/^{111}\text{In}$ -scFv-Fc (H310A/H435Q) comparé aux simples mutants.	Kenanova <i>et al.</i> , 2007
Fragment scFv-Fc dérivé de l'IgG4 anti-CD20 rituximab	H310A/H435Q	- TEP : accumulation rapide et spécifique du ^{124}I -scFv-Fc double mutant à 21 h p.i. dans souris immunocompétentes avec xéno greffes murine CD20 ⁺ .	Olafsen <i>et al.</i> , 2009
Fragment scFv-Fc anti-CEA, avec Fc de l'IgG1 humain	H310A	- TEP : accumulation rapide et spécifique du ^{124}I -scFv-Fc mutant à 20 h p.i. dans souris immunodéficientes avec xéno greffes humaines CEA ⁺ .	Girgis <i>et al.</i> , 2011
IgG1 ciblant la glycoprotéine D du virus herpès	H310Q	- Affinité réduite de l'IgG1 mutant pour le mFcRn. - Elimination plasmatique plus rapide pour le $^{125}\text{I}/^{111}\text{In}$ -IgG1 mutant comparé au $^{125}\text{I}/^{111}\text{In}$ -IgG1 WT.	Yip <i>et al.</i> , 2014
IgG1 hu3S193 ciblant l'antigène Lewis	I253A, I253D, I253P, H310A, H310D H310E, H310Q, H435A I253A/H310A	- Pas de liaison des IgGs hu3S193 mutants aux hFcRn et mFcRn à pH 6. - Demi-vies plasmatiques des ^{111}In -hu3S193 mutants réduites dans souris immunodéficientes et souris transgéniques hFcRn comparé au ^{111}In -hu3S193 WT.	Burvenich <i>et al.</i> , 2016

Abréviations : ADN, acide désoxyribonucléique ; Ala (A), alanine ; Arg (R), arginine ; Asp (D), aspartate ; CEA, antigène carcinoembryonnaire ; Fc, fragment cristallisable ; FcRn, récepteur Fc néonatal ; Gln (Q), glutamine ; Glu (E), glutamate ; His (H), histidine ; Ile (I), isoleucine ; p.i., post-injection ; Pro (P), proline ; scFv, « single-chain variable fragment » ; WT, « wild-type » ; $^{99\text{m}}\text{Tc}$, technétium-99m ; ^{111}In , indium-111 ; ^{124}I , iode-124 ; ^{125}I , iode-125 ; ^{131}I , iode-131.

A l'opposé, des IgGs radiomarqués avec une affinité moindre pour le FcRn, et donc une élimination plus rapide du sang, se révèlent particulièrement adaptés pour l'imagerie TEP diagnostique. La substitution des acides aminés clés (I253, H310 et H435) impliqués dans l'interaction IgG-FcRn par une alanine A ou une glutamine Q (par ex. I253A, H310A, H435A, H310Q) a fortement réduit l'affinité des IgG1s mutants pour le FcRn (humain/murin) à pH 6

(Kim *et al.*, 1999; Yip *et al.*, 2014; Burvenich *et al.*, 2016) (Figure 10). Cette diminution d'affinité s'est traduite par une élimination *in vivo* plus rapide des IgGs mutants, avec un effet encore plus marqué pour les IgGs porteurs d'une double mutation (Tableau 6). Par exemple, Kenanova *et al.* ont produit des fragments scFv-Fc (105 kDa) ciblant l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) humain en introduisant diverses mutations sur le fragment Fc, dont la double mutation H310A/H435Q. Les fragments scFv-Fc, radiomarqués à l'iode-125/131 (^{125}I , ^{131}I), ont été injectés dans des souris immunocompétentes. La demi-vie plasmatique terminale ($t_{1/2\beta}$) du scFv-Fc double mutant était de 8 h, contre 12 jours pour le scFv-Fc WT (Kenanova *et al.*, 2005). Les fragments scFv-Fc anti-CEA ont également été radiomarqués à l'iode-124 (^{124}I), afin d'étudier leur biodistribution par TEP dans des souris immunodéficientes portant des xénogreffes humaines de cancer du côlon CEA⁺. L'élimination plus rapide du scFv-Fc double mutant a permis d'obtenir des images TEP de meilleur contraste, avec un ratio tumeur/bruit (muscle) de 11,7 pour le ^{124}I -scFv-Fc (H310A/H435Q) à 48 h post-injection, contre seulement 0,6 pour le ^{124}I -scFv-Fc WT (Figure 11).

En résumé, il apparaît donc possible d'accélérer l'élimination *in vivo* des anticorps radiomarqués, soit en réduisant leur taille avec l'utilisation de plus petits fragments d'anticorps, soit en supprimant leur interaction avec le FcRn par l'introduction de mutations génétiques sur le fragment Fc. Dans le cadre de cette thèse, ces 2 stratégies ont été appliquées à l'IgG C4, ciblant la protéine PD-L1 humaine et murine, dans le but d'optimiser l'imagerie immunoTEP de PD-L1. L'objectif était d'obtenir des images TEP avec un contraste tumeur PD-L1⁺/bruit élevé à des temps plus courts post-injection en comparaison de l'IgG C4 radiomarqué. Un fragment Fab dérivé de l'IgG C4 et un IgG C4 doublement muté sur son fragment Fc (H310A/H435Q) ont été produits. La PK et la biodistribution *in vivo* de l'IgG C4, de l'IgG C4 mutant, et du Fab C4, radiomarqués au ^{89}Zr , ont été évaluées et comparées dans des souris portant des xénogreffes humaines de CPNPC PD-L1⁺ et PD-L1⁻.

2. Mise en place des modèles précliniques de cancer du poumon non à petites cellules humain

2.1. Sélection des lignées cellulaires humaines de CPNPC par Western Blot

Une des premières étapes de la thèse a consisté à mettre en place les modèles de xénogreffes humaines de CPNPC dans lesquels les études d'imagerie TEP avec les radioligands C4 allaient être réalisées. L'objectif était de choisir un modèle de CPNPC avec une expression endogène de PD-L1 (PD-L1⁺), permettant ainsi d'évaluer la capacité des radioligands C4 à détecter l'expression tumorale de PD-L1. Un modèle de CPNPC n'exprimant pas PD-L1 (PD-L1⁻) devait également être sélectionné comme contrôle négatif, afin d'estimer l'accumulation tumorale non-spécifique des radioligands C4. Pour cela, diverses lignées cellulaires humaines de CPNPC ont été mises en culture et amplifiées (Tableau 7, Annexe 1).

Tableau 7. Lignées cellulaires humaines de CPNPC cultivées et analysées par Western Blot pour l'expression de PD-L1.

Lignée cellulaire	Sous-type de CPNPC	Expression de PD-L1 déterminée par WB
A549	Adénocarcinome	-
HCC15	Carcinome épidermoïde	-
HCC44	Adénocarcinome	+
H322	Adénocarcinome (carcinome bronchoalvéolaire)	-
H358	Adénocarcinome (carcinome bronchoalvéolaire)	++
H1975	Adénocarcinome	++
CAL-12T	Non renseigné	+++

Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; WB, Western Blot.

L'expression totale de PD-L1 dans les lysats de cellules entières issus des différentes lignées de CPNPC cultivées a été analysée par Western Blot (WB) (Tableau 7, Figure 12, Annexe 1). La protéine α -tubuline a été utilisée comme contrôle de dépôt, en supposant que son niveau d'expression ne varie pas entre les différentes lignées cellulaires tumorales. Les protéines contenues dans les lysats cellulaires ont tout d'abord été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Les protéines ont ensuite été déplacées du gel vers une membrane solide par transfert électrophorétique liquide. La membrane a été incubée avec un anticorps primaire anti-PD-L1 (clone E1L3N), puis avec un anticorps secondaire ciblant l'anticorps primaire et conjugué à l'enzyme peroxydase de raifort (« horseradish peroxidase », HRP). L'ajout d'un substrat de l'enzyme a conduit à la formation d'un produit chimioluminescent dont le signal a été détecté à l'aide d'un imageur. Après révélation de la première protéine d'intérêt PD-L1, le « stripping » de la membrane a consisté à éliminer les anticorps primaires et secondaires fixés sur celle-ci, afin de pouvoir la réutiliser pour un second cycle d'immunodétection de la protéine α -tubuline.

Parmi les lignées cellulaires de CPNPC avec une expression de PD-L1 détectée par WB (H1975, HCC44, H358 et CAL-12T), la lignée H1975 a finalement été sélectionnée. Cette lignée présentait la vitesse de croissance *in vitro* la plus élevée et a déjà été utilisée dans la littérature comme modèle de CPNPC PD-L1⁺ (Truillet *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2020). De plus, après un test d'implantation sous-cutanée des 4 lignées cellulaires PD-L1⁺ dans des souris nues (N = 1 souris par lignée), la xénotransplante H1975 a montré la vitesse de pousse *in vivo* la plus rapide. Parmi les lignées cellulaires de CPNPC n'exprimant pas PD-L1 (A549, H322, et HCC15), la lignée A549 a été choisie. De même que pour la lignée H1975, cette lignée poussait relativement bien *in vitro* et *in vivo*, et a déjà été employée comme modèle de CPNPC PD-L1⁻ (Ehlerding *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2019).

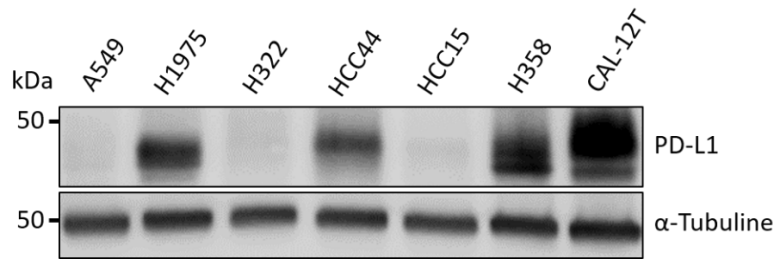


Figure 12. Caractérisation de l’expression de PD-L1 dans diverses lignées humaines de CPNPC par Western Blot. Image de la membrane après immunodétection de la protéine PD-L1 et de l’ α -tubuline. La même quantité de protéines totales (30 μ g) contenues dans les lysats des lignées cellulaires a été déposée dans chaque puit du gel d’électrophorèse. Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 ».

2.1. Caractérisation de l’expression de PD-L1 par les lignées cellulaires de CPNPC par cytométrie de flux

Une fois les lignées cellulaires H1975 et A549 sélectionnées, l’expression de PD-L1 à leur surface a été vérifiée par cytométrie de flux (Annexe 1). Les suspensions de cellules individuelles ont été marquées avec un anticorps primaire anti-PD-L1 (clone 29E.2A3) ou avec son contrôle isotype, tous deux conjugués au fluorophore phycoérythrine (PE). Le contrôle isotype est un anticorps de la même espèce et du même isotype que l’anticorps anti-PD-L1, mais ne ciblant pas PD-L1. Ce contrôle permet ainsi de déterminer le bruit fluorescent lié à une fixation non-spécifique de l’anticorps anti-PD-L1 (par ex. liaison aux récepteurs Fc γ à la surface de certaines cellules immunitaires). Le niveau d’autofluorescence naturelle des cellules, provenant de divers composés (par ex. acides aminés aromatiques), a également été évalué en passant des cellules non marquées au cytomètre.

Lors de leur passage dans le cytomètre, les cellules ont été frappées individuellement par un faisceau laser. La lumière diffusée par la cellule et le signal fluorescent émis par le fluorophore PE excité ont alors été collectés par une série de filtres, puis détectés par des tubes photomultiplicateurs (PMTs). Les PMTs ont ensuite converti les signaux lumineux en signaux électriques proportionnels. Les paramètres de chacune des impulsions électriques ainsi créées ont été enregistrés : la hauteur H du pic (V), la largeur W du pic (μ s), et l’aire A du pic (V. μ s). Enfin, ces signaux électriques ont été convertis en données digitales (‘AttuneTM NxT Flow Cytometer Basic Training’, 2018).

La première étape dans l’analyse des résultats de cytométrie de flux (étape de « gating ») a consisté à distinguer les cellules tumorales en fonction de leurs propriétés de diffusion vers l’avant (« forward scatter », FSC) et de diffusion latérale (« side scatter », SSC) de la lumière. La diffusion de lumière vers l’avant est proportionnelle à la taille de la cellule, tandis que la diffusion de lumière latérale dépend de sa granularité. Les débris cellulaires présentent des niveaux de diffusion plus faibles par rapport aux cellules entières, et se retrouvent ainsi dans la partie inférieure gauche du graphique FSC-H = f(SSC-H) (Figure 13). Une fois la population de cellules tumorales définie, une seconde étape de gating a été effectuée afin d’exclure les événements coïncidents. Ces événements arrivent lorsque plusieurs cellules sont frappées par le laser en un temps trop rapproché (par ex. si elles sont collées ensemble). Il n’est alors pas possible de séparer leurs pics respectifs. Les événements non coïncidents, représentant bien des cellules

individuelles, se retrouvent dans la partie inférieure du graphique $SSC-W = f(SSC-H)$ (Figure 13). Aucune étape de gating supplémentaire n'a été réalisée.

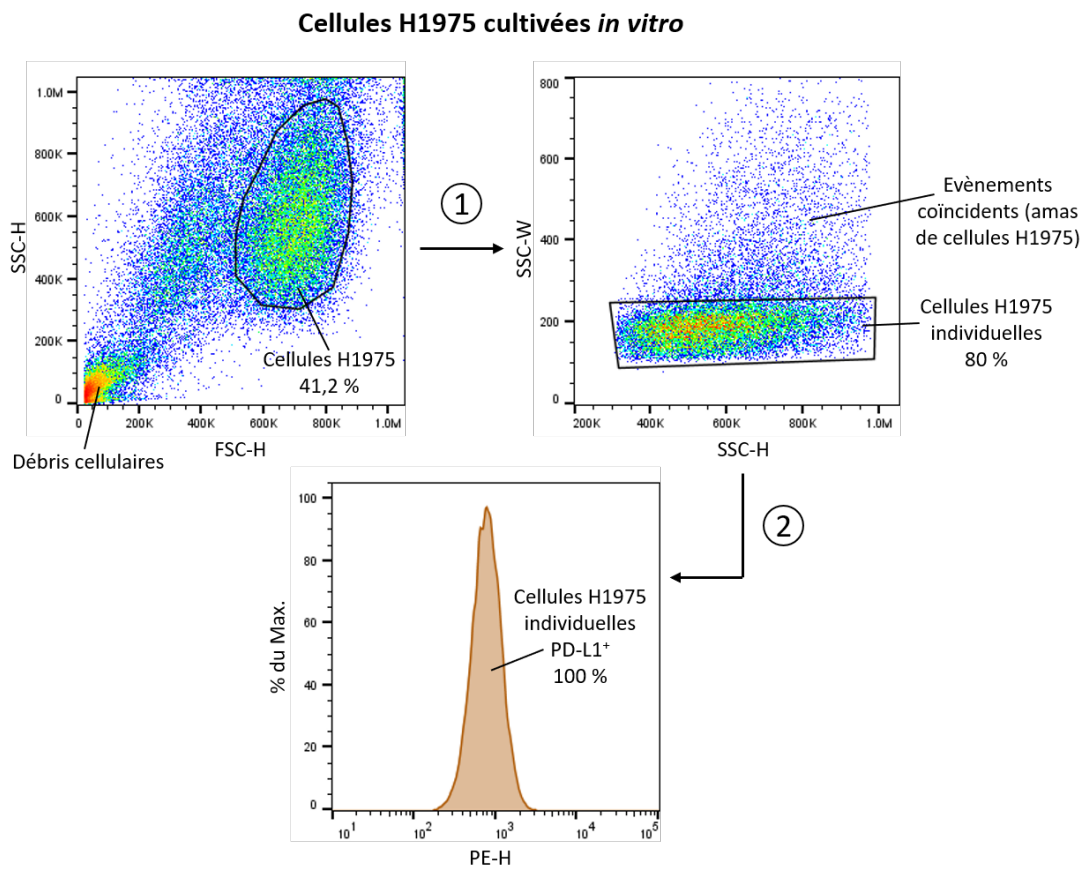


Figure 13. Stratégie de « gating » appliquée aux expériences de cytométrie de flux sur les cellules humaines de CPNPC cultivées *in vitro*. Graphiques représentatifs obtenus lors d'une des expériences de cytométrie de flux réalisées sur les cellules H1975 marquées avec l'anticorps fluorescent anti-PD-L1-PE. (1) Les cellules tumorales ont été distinguées des débris cellulaires sur le graphique $SSC-H = f(FSC-H)$. (2) Les événements coincidents ont ensuite été exclus de la population cellulaire H1975 sur le graphique $SSC-W = f(SSC-H)$. Pour chaque nouvelle population définie, le pourcentage d'événements de la population parentale est indiqué. Abréviations : FSC, « forward scatter » ; PE, phycoérythrine ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; SSC, « side scatter ».

La concentration optimale en anticorps anti-PD-L1 fluorescent utilisée pour le marquage des cellules a été déterminée par titration de l'anticorps sur les cellules H1975 PD-L1⁺ (Figure 14). Sur les histogrammes PE-H, un décalage positif du pic de fluorescence a bien été observé avec les concentrations croissantes en anticorps anti-PD-L1-PE utilisées. L'intensité de fluorescence médiane (MFI pour « median fluorescence intensity ») du signal PE-H a commencé à atteindre un plateau (saturation des sites de fixation PD-L1) à partir d'une concentration en anticorps de ~ 7,5 µg/mL (50 nM). Pour toutes les expériences de cytométrie réalisées par la suite, il a donc été choisi d'utiliser l'anticorps anti-PD-L1 et son contrôle isotype fluorescents à une concentration de 10 µg/mL. Cette concentration est 2 fois plus faible que celle recommandée par le fournisseur, soulignant l'importance de l'étape de titration de l'anticorps dans un souci d'économie de réactif et de qualité des résultats.

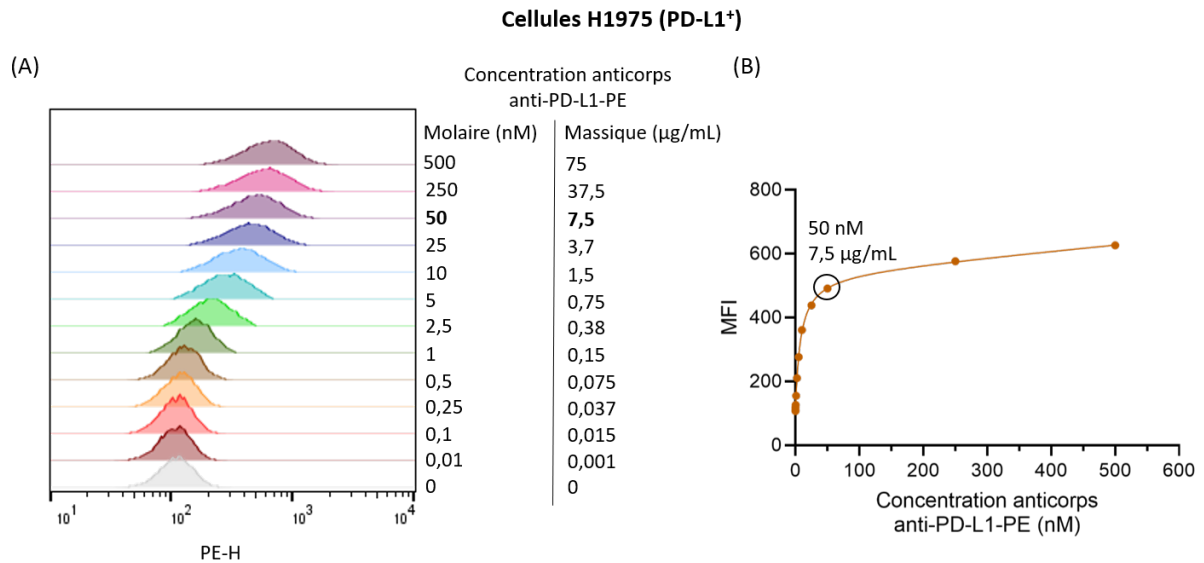


Figure 14. Titration de l'anticorps anti-PD-L1 fluorescent avec les cellules humaines de CPNPC PD-L1⁺. (A) Histogrammes PE-H obtenus après incubation des cellules H1975 avec une gamme de concentrations de l'anticorps anti-PD-L1 fluorescent. (B) MFI du signal PE-H en fonction de la concentration en anticorps anti-PD-L1 fluorescent utilisée pour marquer les cellules H1975. Abréviations : MFI, « median fluorescence intensity » ; PE, phycoérythrine ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 ».

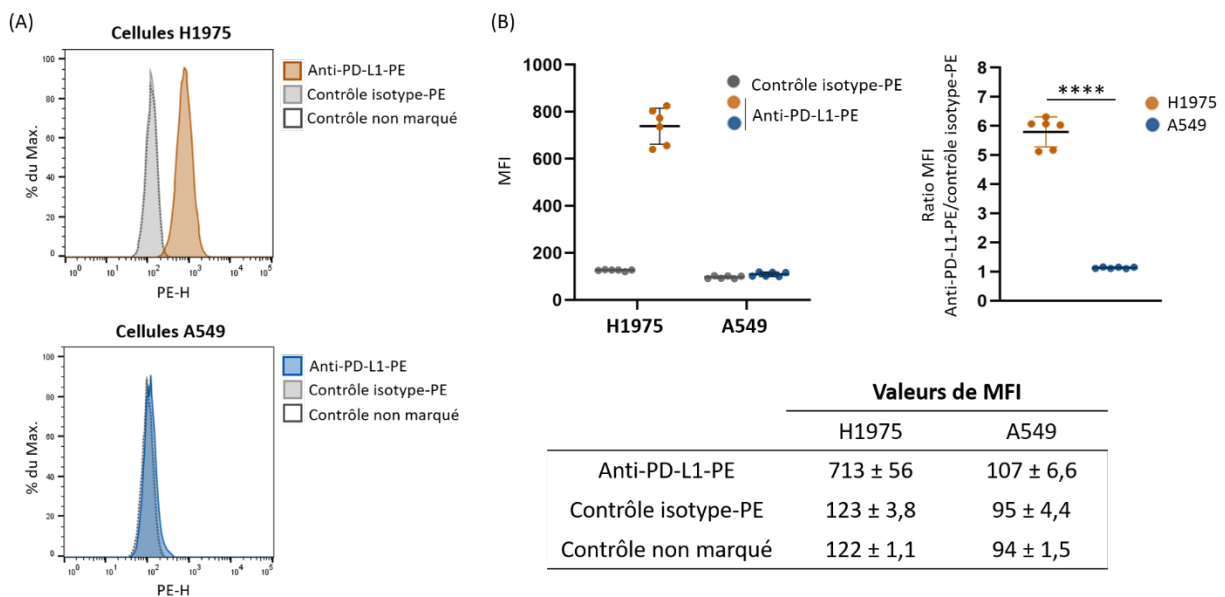


Figure 15. Caractérisation de l'expression de PD-L1 par les cellules humaines de CPNPC par cytométrie de flux. (A) Histogrammes représentatifs obtenus lors des expériences de cytométrie de flux réalisées sur les cellules de CPNPC H1975 (PD-L1⁺) et A549 (PD-L1⁻) cultivées *in vitro*. (B) Valeurs de MFI du signal PE-H obtenues avec l'anticorps anti-PD-L1 et le contrôle isotype fluorescents. Les valeurs de moyenne ± écart-type sont indiquées (N = 6 expériences indépendantes par lignée cellulaire). La comparaison statistique a été effectuée avec le test t de Student bilatéral non-apparié (**** p < 0,0001). Abréviations : MFI, « median fluorescence intensity » ; PE, phycoérythrine ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 ».

Les expériences de cytométrie de flux ont bien confirmé l'expression endogène de PD-L1 à la surface des cellules H1975, et son absence (ou très faible) expression à la surface des cellules A549 (Figure 15). Sur les histogrammes PE-H, un décalage positif du pic de fluorescence a été observé pour les cellules H1975 marquées avec l'anticorps anti-PD-L1-PE par rapport aux cellules marquées avec l'isotype contrôle-PE ou non marquées. Ce déplacement n'a en revanche pas été constaté pour les cellules A549 marquées avec l'anticorps anti-PD-L1-PE, dont le pic est resté superposé à ceux du contrôle isotype-PE et du contrôle non marqué. Les valeurs de MFI du signal PE-H obtenues après marquage avec l'anticorps anti-PD-L1-PE étaient de 713 ± 56 pour les cellules H1975 contre 107 ± 7 ($\sim 6,7$ fois moins) pour les cellules A549. Pour les 2 lignées cellulaires, les anticorps fluorescents ne se sont pas liés de manière non spécifique aux cellules tumorales, comme le montrent la superposition des pics PE-H du contrôle isotype-PE et du contrôle non marqué et les valeurs de MFI similaires associées.

Un fois sélectionnées et bien caractérisées pour leur expression de PD-L1, à la fois par Western Blot et par cytométrie de flux, les lignées cellulaires H1975 (PD-L1⁺) et A549 (PD-L1⁻) ont alors été utilisées pour produire les modèles de xénogreffes humaines de CPNPC.

2.2. Production des modèles de xénogreffes humaines de CPNPC

Les cellules humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺) et A549 (PD-L1⁻) ont été implantées en sous-cutané, au niveau des 2 flancs inférieurs de souris nudes femelles immunodéficientes (Annexe 1). Le taux de prise des tumeurs était de $\sim 70-80$ %. Les modèles précliniques hétérotopiques de CPNPC, le plus souvent sous-cutanés, sont généralement choisis pour leur facilité d'implémentation. Le développement des tumeurs sous-cutanées accessibles et apparentes est également pratique à évaluer. Cependant, ces modèles sous-cutanés de CPNPC ne reconstituent pas le microenvironnement pulmonaire originel et restent donc peu représentatifs des tumeurs primitives du poumon retrouvées en clinique (Kellar, Egan and Morris, 2015).

Les modèles précliniques orthotopiques de CPNPC fournissent une représentation plus réaliste des tumeurs pulmonaires humaines et permettent ainsi notamment de prédire l'efficacité des traitements de manière plus fiable (Kellar, Egan and Morris, 2015). Cependant, la mise en place de tels modèles est souvent complexe, nécessitant des compétences chirurgicales. Les modèles orthotopiques de CPNPC peuvent être obtenus par injection de cellules tumorales dans les poumons des souris par voie intra-trachéale ou après thoracotomie. Le suivi longitudinal de la croissance tumorale se révèle également plus technique. La localisation et le volume des tumeurs pulmonaires peuvent être évalués par imagerie TDM, offrant un très bon contraste au niveau des poumons (Buckle and Van Leeuwen, 2010). L'imagerie par bioluminescence peut également être utilisée, à condition que les cellules implantées aient été préalablement génétiquement modifiées pour exprimer l'enzyme luciférase. Dans ce cas, l'injection intrapéritonéale des souris avec le substrat de l'enzyme luciférine conduit à l'émission d'un signal bioluminescent, proportionnel à la quantité de cellules tumorales viables présentes (Buckle and Van Leeuwen, 2010).

Les souris ont été utilisées pour les expériences d'imagerie TEP/TDM lorsque leurs tumeurs sous-cutanées ont atteint ~ 8 mm de diamètre le plus large, ce qui a représenté $\sim 5-6$ semaines de pousse pour les tumeurs H1975, et ~ 4 semaines de pousse pour les tumeurs A549. A la fin des examens d'imagerie, les tumeurs ont été récupérées afin de caractériser leur niveau d'expression *in vivo* de PD-L1 par cytométrie de flux et par immunohistochimie (IHC).

2.3. Caractérisation de l'expression de PD-L1 dans les tumeurs de CPNPC par cytométrie de flux

Pour obtenir des suspensions de cellules individuelles analysables en cytométrie de flux à partir des tumeurs solides A549 et H1975, il a été nécessaire de digérer les composants de la matrice extracellulaire et de cliver les jonctions entre cellules tumorales. Pour cela, une dissociation mécanique de la tumeur a tout d'abord été réalisée, suivie d'une digestion enzymatique (Annexe 1). L'objectif était d'obtenir une suspension avec une majorité de cellules viables et peu de débris cellulaires, sans endommagement ou clivage de la protéine membranaire PD-L1 d'intérêt (Reichard and Asosingh, 2019).

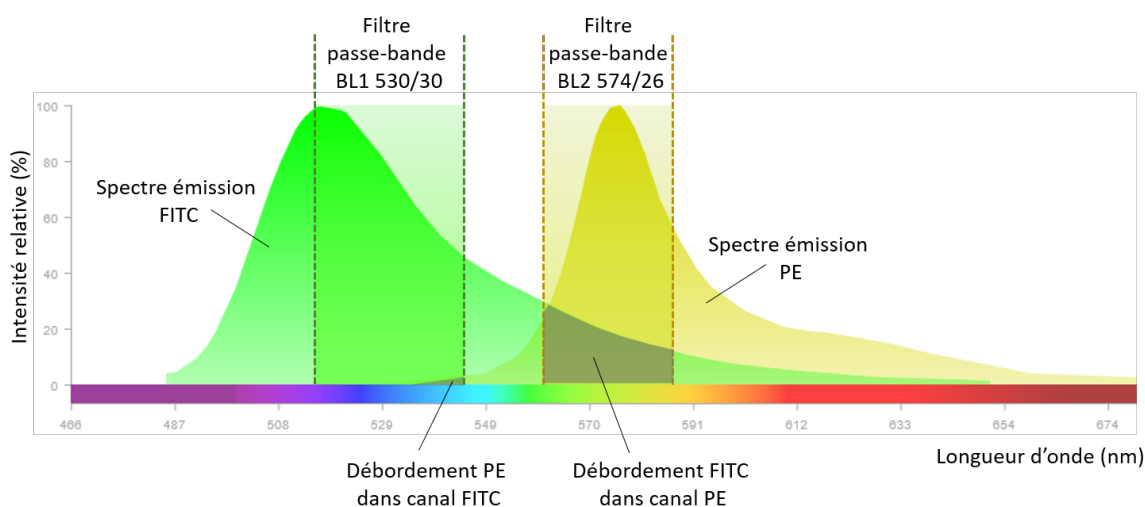


Figure 16. Chevauchement des spectres d'émission des fluorophores PE et FITC. Le signal FITC est détecté dans le canal BL1 du cytomètre, tandis que le signal PE est collecté dans le canal BL2. Le débordement du signal fluorescent de chaque fluorophore dans le canal de détection qui n'est pas le sien est représenté par les surfaces grisées. La figure a été réalisée à l'aide de l'outil « Fluorescence SpectraViewer » de ThermoFisher (*Fluorescence SpectraViewer*). Abréviations : FITC, isothiocyanate de fluorescéine ; PE, phycoérythrine.

Contrairement aux cellules cultivées *in vitro*, les suspensions cellulaires dérivées des tumeurs solides contenaient une proportion non négligeable de cellules mortes (~ 15-30 %). Or, les cellules mortes possèdent une forte auto-fluorescence et interagissent de manière non-spécifique avec les anticorps fluorescents, ce qui peut fausser les résultats (faux positifs). Pour supprimer ces cellules mortes de l'analyse, les cellules ont été incubées avec un marqueur de viabilité fluorescent (Zombie Green) en plus du marquage avec l'anticorps fluorescent (anti-PD-L1 ou contrôle isotype). Ce marqueur de viabilité réagit de manière covalente avec les protéines exprimées à la surface des cellules. En présence de cellules mortes à la membrane endommagée perméable, le marqueur de viabilité interagit avec les protéines de surface mais aussi avec les protéines intracellulaires. Ces cellules présentent donc une plus forte intensité de fluorescence, permettant de les distinguer facilement des cellules vivantes.

Suspension cellulaire de tumeur H1975

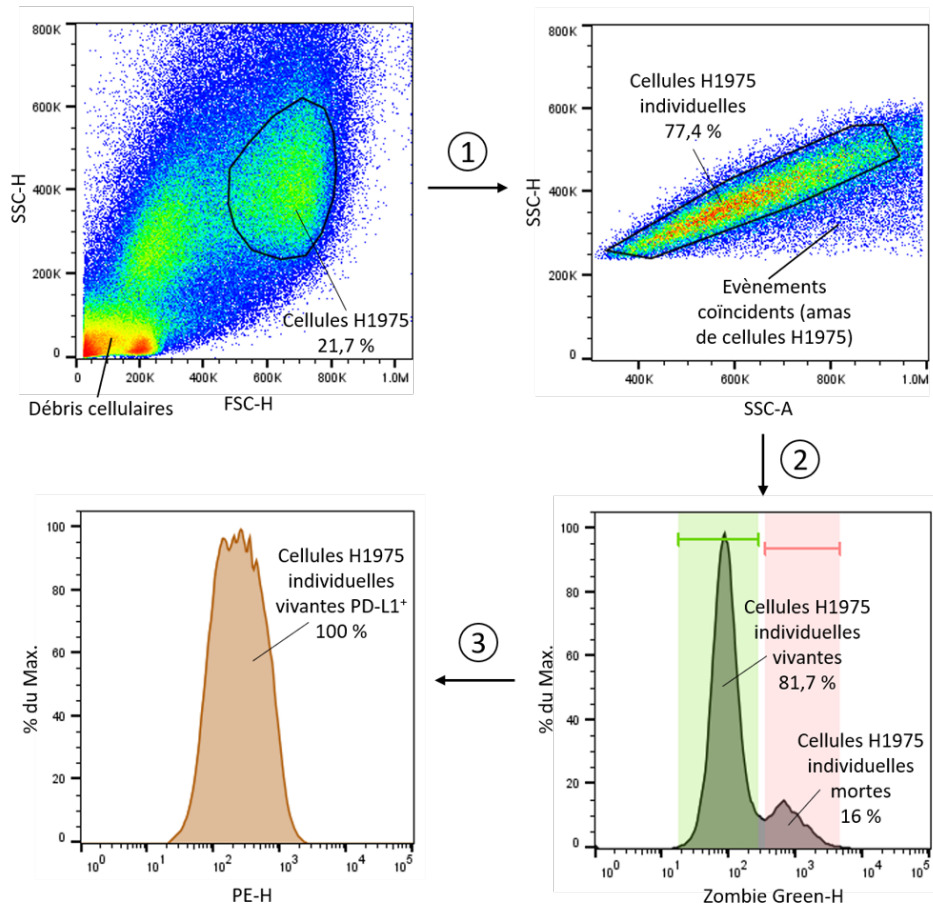


Figure 17. Stratégie de « gating » appliquée aux expériences de cytométrie de flux sur les cellules issues des tumeurs de CPNPC. Graphiques représentatifs obtenus lors d'une des expériences de cytométrie de flux réalisées sur les suspensions cellulaires issues des tumeurs H1975. Les cellules ont été doublement marquées avec l'anticorps anti-PD-L1-PE et le marqueur de viabilité fluorescent (Zombie Green). (1) Les cellules tumorales ont été distinguées des débris cellulaires sur le graphique SSC-H = f(FSC-H). (2) Les cellules individuelles ont ensuite été retenues sur le graphique SSC-H = f(SSC-A). (3) Les cellules mortes ont finalement été exclues sur l'histogramme Zombie Green-H. Pour chaque nouvelle population définie, le pourcentage d'évènements de la population parentale est indiqué. Abréviations : FSC, « forward scatter » ; PE, phycoérythrine ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; SSC, « side scatter ».

Chaque expérience de cytométrie de flux pour laquelle les cellules sont incubées avec plus d'un marqueur fluorescent à la fois (ici par ex. avec 2) nécessite une étape de compensation. La compensation permet de corriger le bruit associé au débordement de fluorescence des fluorophores, c'est-à-dire lorsque le signal fluorescent d'un fluorophore est détecté dans son canal cible mais aussi (dans une moindre mesure) dans les canaux cibles des autres fluorophores utilisés. Le marqueur de viabilité fluorescent Zombie-Green possède un spectre d'émission similaire au fluorophore isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Le signal du fluorophore PE déborde peu dans le canal de détection du fluorophore FITC, tandis que le débordement de fluorescence du FITC dans le canal PE est plus important, soulignant l'importance de la procédure de compensation (Figure 16). L'utilisation de fluorophores présentant un chevauchement spectral moins important aurait été préférable, mais le choix a été limité par la présence d'un seul laser bleu d'excitation (488 nm) sur le cytomètre. Les contrôles de compensation passés au cytomètre ont permis de

généraliser une matrice de compensation, contenant les valeurs de débordement du signal de chaque fluorophore dans chaque canal (Annexe 1).

Les résultats de cytométrie obtenus sur les cellules tumorales doublement marquées (anti-PD-L1-PE/contrôle isotype-PE + marqueur de viabilité) ont tout d'abord été corrigés en appliquant la matrice de compensation préalablement calculée. La même stratégie de gating que présentée précédemment pour les expériences de cytométrie sur les cellules cultivées *in vitro* a ensuite été employée, en ajoutant une dernière étape de discrimination des cellules vivantes et mortes (Figure 17).

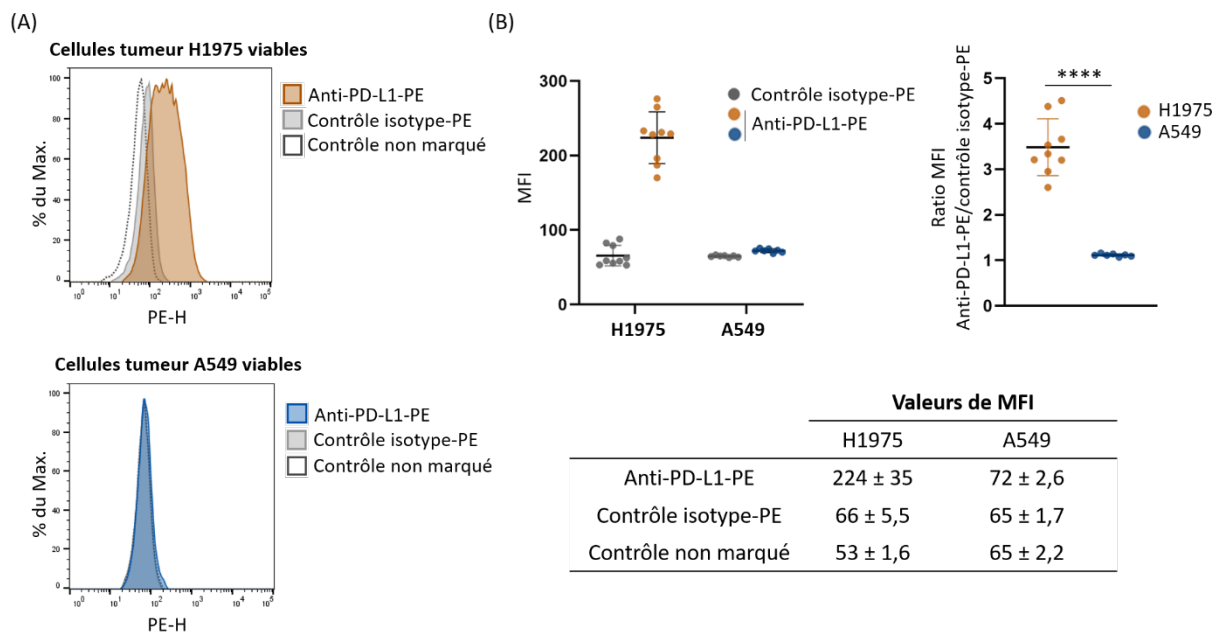


Figure 18. Caractérisation de l'expression *in vivo* de PD-L1 dans les tumeurs H1975 et A549 par cytométrie de flux. (A) Histogrammes PE-H représentatifs obtenus lors des expériences de cytométrie de flux sur les cellules dissociées des tumeurs solides H1975 et A549. (B) Valeurs de MFI du signal PE-H obtenues avec l'anticorps anti-PD-L1 et le contrôle isotype fluorescents. Les valeurs de moyenne ± écart-type sont indiquées (N = 9 tumeurs H1975, et N = 7 tumeurs A549). La comparaison statistique a été effectuée avec le test t de Student bilatéral non-apparié (**** p < 0,0001). Abréviations : MFI, « median fluorescence intensity » ; PE, phycoérythrine ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 ».

Les expériences de cytométrie de flux ont bien montré l'expression de PD-L1 au sein des tumeurs H1975, tandis que les tumeurs A549 ont été confirmées comme PD-L1⁻ (Figure 18). Les valeurs de MFI du signal PE-H obtenues après marquage avec l'anticorps anti-PD-L1-PE étaient de 224 ± 35 pour les cellules H1975 contre 72 ± 2,6 (~ 3 fois moins) pour les cellules A549. Pour les cellules dérivées des tumeurs H1975, un léger décalage entre les pics du contrôle non marqué et du contrôle isotype-PE a été observé sur les histogrammes PE-H, se traduisant par une valeur de MFI légèrement plus élevée pour le contrôle isotype-PE. Cette différence peut s'expliquer par une petite fixation non spécifique des anticorps fluorescents sur les cellules de la suspension tumorale.

2.4. Caractérisation de l'expression de PD-L1 dans les tumeurs de CPNPC par immunohistochimie

En parallèle des expériences de cytométrie de flux, l'expression de PD-L1 au sein des tumeurs H1975 et A549 a également été évaluée par immunohistochimie (IHC) (Annexe 1). Les coupes de tumeur congelées ont été incubées avec un anticorps primaire anti-PD-L1, puis avec un anticorps secondaire ciblant l'anticorps primaire et conjugué à la HRP. L'activité de l'enzyme HRP a été détectée par ajout du substrat 3-3'-diaminobenzidine (DAB), formant un précipité marron à l'emplacement de la protéine cible PD-L1. Une contre-coloration des sections a ensuite été réalisée avec de l'hématoxyline pour colorer les noyaux cellulaires en bleu/violet. Les coupes de tumeur colorées ont été visualisées à l'aide d'un microscope optique à lumière transmise (Figure 19).

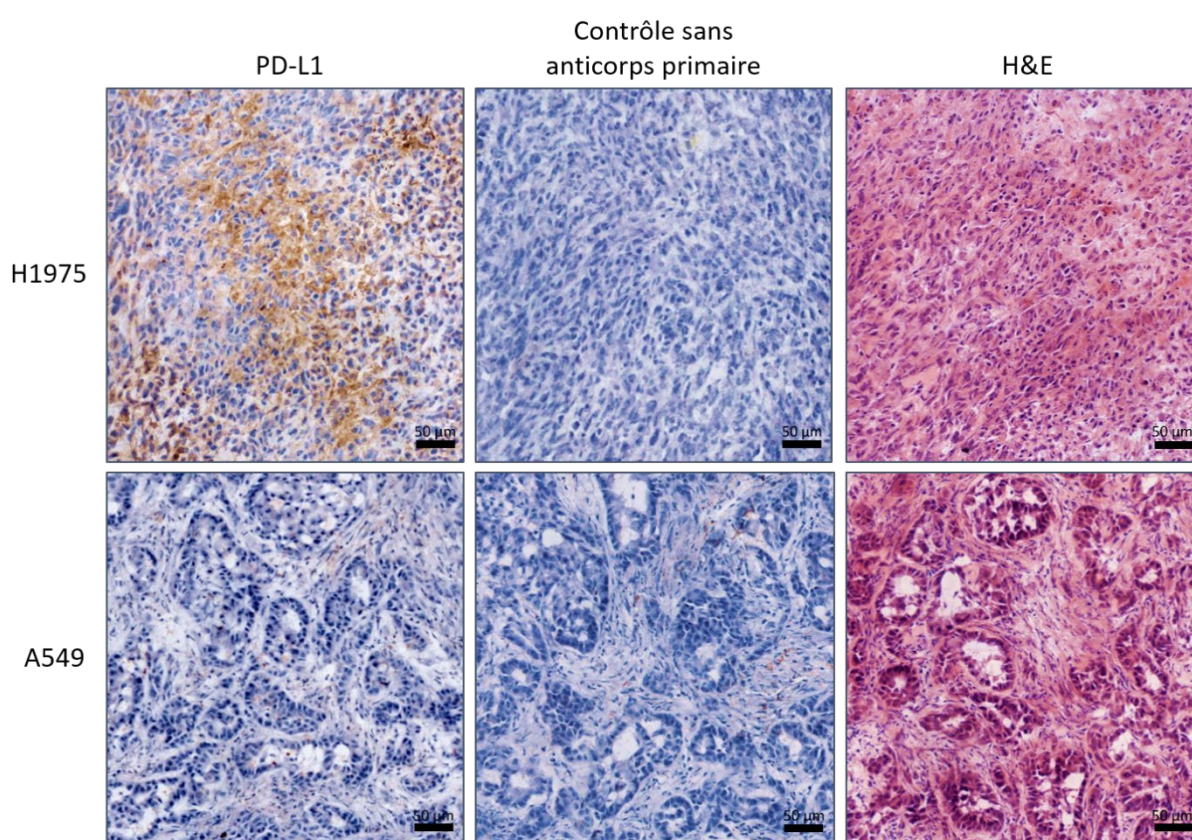


Figure 19. IHC anti-PD-L1 et coloration H&E des coupes de tumeurs H1975 et A549. Images représentatives (agrandissement x 20) des sections de tumeurs H1975 et A549 après IHC anti-PD-L1. Un contrôle sans anticorps primaire anti-PD-L1 et une coloration H&E ont été effectués sur des coupes adjacentes. Barres d'échelle : 50 µm. Abréviations : H&E, hématoxyline et éosine ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 ».

Pour chaque coupe de tumeur analysée par IHC anti-PD-L1, une double coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) a été effectuée sur une coupe adjacente (Figure 19, Annexe 1). Tandis que l'hématoxyline colore les noyaux cellulaires en bleu/violet, l'éosine colore le cytoplasme des cellules et les tissus conjonctifs en nuances de rose plus ou moins vif. La coloration H&E sur les coupes adjacentes a permis de bien visualiser les zones de nécrose, afin de sélectionner

uniquement les régions viables sur les coupes IHC anti-PD-L1. Ces zones de nécrose, présentes dans la plupart des sections analysées, peuvent fixer les anticorps primaires et secondaires de manière non spécifique et mener ainsi à de faux signaux positifs. La fixation non-spécifique éventuelle de l'anticorps secondaire a aussi été contrôlée sur une coupe adjacente à la coupe IHC anti-PD-L1, en supprimant seulement l'étape d'incubation avec l'anticorps primaire (Figure 19). Un contrôle positif, consistant à analyser en parallèle une section de tissu dont l'expression de PD-L1 est avérée, n'a en revanche pas pu être réalisé. Dans le cas des analyses IHC anti-PD-L1 effectuées sur des biopsies tumorales de patients, ce contrôle positif peut par exemple être un échantillon prélevé sur les amygdales palatines exprimant PD-L1.

L'IHC anti-PD-L1 sur les coupes de tumeur H1975 a révélé une expression de PD-L1, caractérisée par une coloration marron des membranes cellulaires dans certaines zones viables. Cette coloration associée à PD-L1 n'a en revanche pas été observée sur les coupes de tumeurs A549 (Figure 19). Aucune coloration marron n'a non plus été détectée sur les coupes contrôles sans anticorps primaire, montrant que l'anticorps secondaire ne s'est pas fixé de manière non spécifique. L'analyse de l'expression de PD-L1 par IHC sur les coupes de tumeurs congelées a ainsi confirmé les résultats obtenus par cytométrie de flux, avec une expression *in vivo* de PD-L1 positive pour le modèle H1975 et négative (ou très faible) pour le modèle A549.

En parallèle de la mise en place et de la caractérisation des modèles de xénogreffes humaines de CPNPC PD-L1⁺ (H1975) et PD-L1⁻ (A549), l'autre étape essentielle à la réalisation des études d'imagerie TEP a bien évidemment consisté à produire les radioligands C4 anti-PD-L1.

3. Production et caractérisation des radioligands C4

3.1. Production des ligands C4

Les 3 ligands C4 anti-PD-L1 – IgG C4, IgG C4 (H310A/H435Q) et Fab C4 – ont été produits par le Laboratoire d'Immunogénicité Cellulaire et Biotechnologies (LICB) du Service d'Ingénierie Moléculaire pour la Santé (SIMoS), faisant partie de l'Institut des sciences du vivant Frédéric Joliot (CEA Paris-Saclay) (Annexe 1).

Brièvement, les fragments d'ADN complémentaire (ADNc) codant pour les anticorps/fragment d'anticorps C4 ont été clonés dans 2 plasmides d'expression. Des cellules humaines (HEK293) ont été transfectées transitoirement avec ces plasmides recombinants (Figure 20). Une fois transfectées, les cellules ont été cultivées pour produire le ligand C4, sécrété dans le milieu de culture. Le ligand C4 a ensuite été purifié du surnageant de culture par chromatographie d'affinité. Une seconde étape de chromatographie par exclusion de taille a permis de remplacer le tampon (par du PBS) et d'enlever les éventuels agrégats. La pureté de la solution de ligand C4 obtenue a finalement été contrôlée par SDS-PAGE.

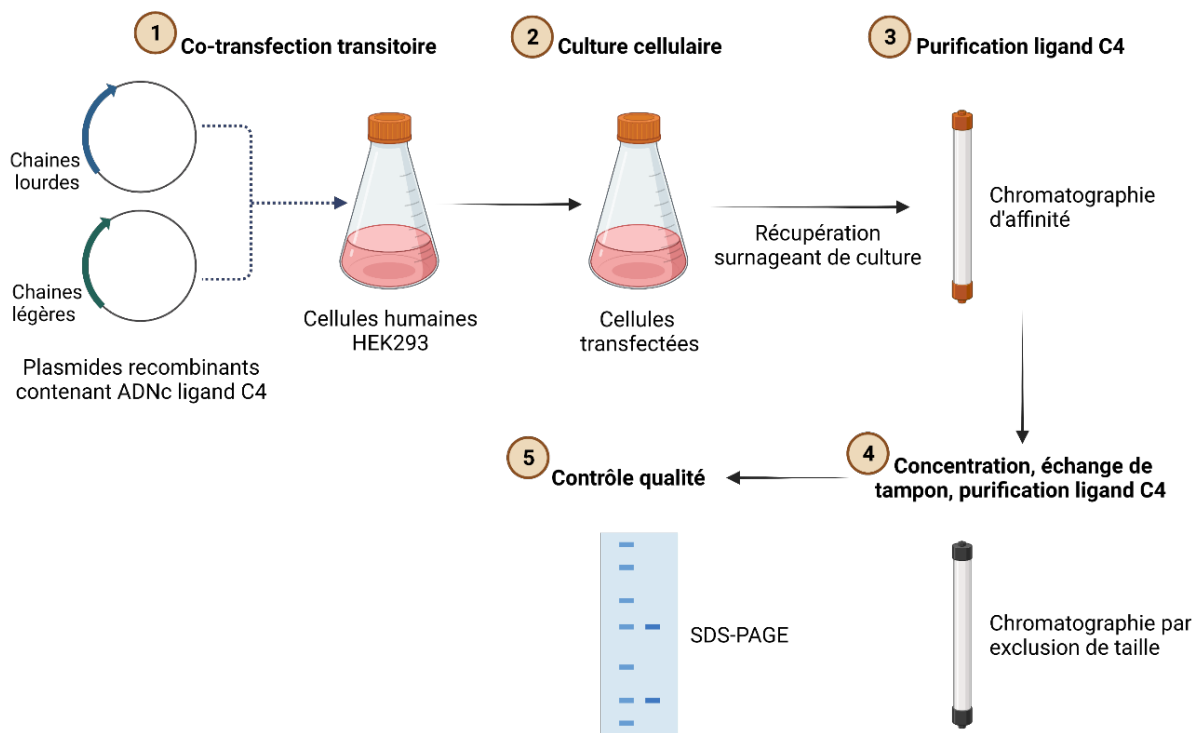


Figure 20. Représentation schématique des différentes étapes de production et de purification des ligands C4 anti-PD-L1. Les étapes réalisées avant la transfection des plasmides recombinants dans les cellules humaines ne sont pas représentées. Abréviations : ADNc, ADN complémentaire ; SDS-PAGE, électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

3.2. Mesure de l'affinité des ligands C4 pour la protéine PD-L1 humaine par interférométrie bio-couche

L'affinité et la cinétique de liaison des ligands C4 à la protéine PD-L1 humaine ont été évaluées par interférométrie bio-couche (BLI pour « biolayer interferometry ») au laboratoire LICB (Annexe 1). Cette technique permet de mesurer en temps réel les interactions entre un analyte en solution et un ligand immobilisé à la surface d'un biocapteur (Tobias *et al.*, 2021). Pour les mesures de BLI avec l'IgG C4 et l'IgG C4 (H310A/H435Q), les 2 anticorps ont été immobilisés sur des biocapteurs via leur fragment Fc, puis ils ont été exposés à différentes concentrations d'une protéine PD-L1 humaine recombinante en solution. Pour le fragment Fab C4, c'est la protéine PD-L1, préalablement biotinylée, qui a été immobilisée sur des biocapteurs recouverts de streptavidine, puis exposée à différentes concentrations du Fab C4 en solution. Après l'étape d'association, les biocapteurs ont été plongés dans de la solution tampon sans analyte, et les complexes analyte/ligand liés à leur surface se sont alors dissociés naturellement. Les courbes d'association/dissociation obtenues lors de l'étude de l'interaction entre l'IgG C4 et la protéine PD-L1 humaine sont présentées en exemple dans la Figure 21.

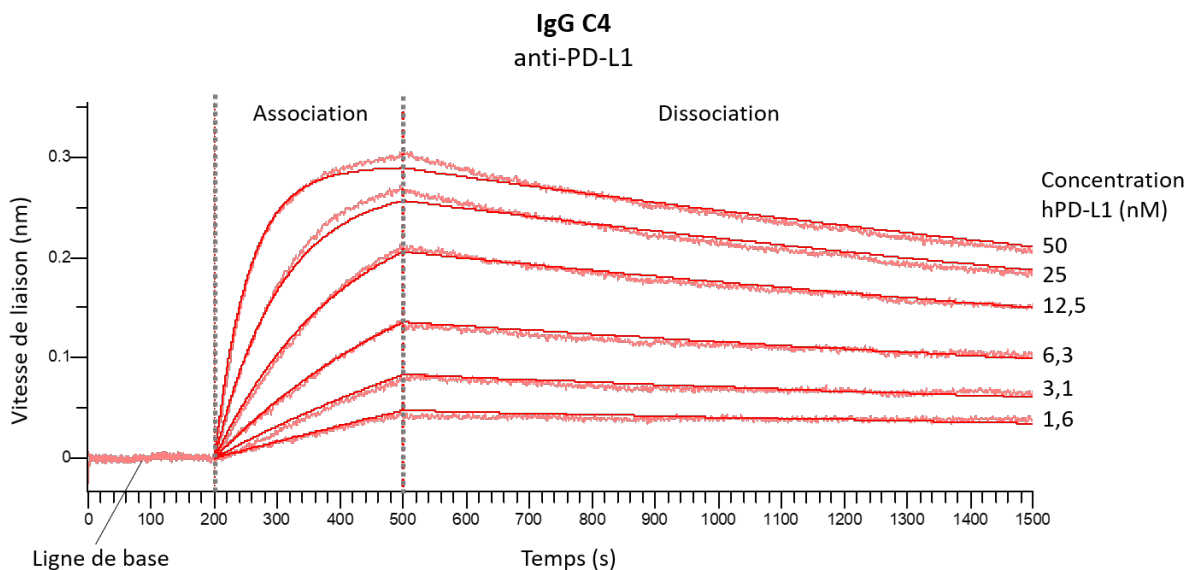


Figure 21. Cinétique de liaison de l'IgG C4 à la protéine PD-L1 humaine mesurée par interférométrie bio-couche. Courbes représentatives de l'interaction entre l'IgG C4 immobilisé sur les biocapteurs et la protéine PD-L1 humaine à différentes concentrations en solution. Les étapes d'association et de dissociation de l'anticorps avec PD-L1 sont représentées. Les courbes ont été ajustées à un modèle de liaison 1:1 (lignes rouges solides). Abréviations : PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 ».

Les constantes cinétiques calculées par ajustement des courbes d'association/dissociation à un modèle de liaison 1:1 sont présentées dans le Tableau 8. La constante d'affinité K_D (M) a été calculée comme le ratio de la constante de vitesse de dissociation k_d (s^{-1}) sur la constante de vitesse d'association k_a ($M^{-1}.s^{-1}$) :

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}$$

Cette constante d'affinité K_D correspond à la concentration en analyte occupant à l'équilibre 50 % des sites de liaison à la surface du biocapteur. Ainsi, plus l'affinité de liaison entre l'analyte et le ligand est forte, plus la valeur de K_D est faible.

Tableau 8. Constantes cinétiques de liaison des ligands C4 à la protéine PD-L1 humaine. La cinétique de liaison entre la protéine PD-L1 humaine et les ligands C4, conjugués ou non au chélateur desferrioxamine (DFO), a été mesurée par interférométrie bio-couche (N = 1 expérience par ligand C4).

Ligand C4	K_D (nM)	k_a ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_d (s^{-1})
IgG C4	0,85	$3,67 \times 10^5$	$3,15 \times 10^{-4}$
DFO-IgG C4	0,79	$3,76 \times 10^5$	$2,99 \times 10^{-4}$
IgG C4 (H310A/H435Q)	1,16	$3,47 \times 10^5$	$4,04 \times 10^{-4}$
DFO-IgG C4 (H310A/H435Q)	1,04	$3,39 \times 10^5$	$3,53 \times 10^{-4}$
Fab C4	1,59	$3,95 \times 10^5$	$6,31 \times 10^{-4}$
DFO-Fab C4	1,36	$3,86 \times 10^5$	$5,27 \times 10^{-4}$

Abréviations : DFO, desferrioxamine ; k_a , constante de vitesse d'association ; k_d , constante de vitesse de dissociation ; K_D , constante d'affinité.

Les expériences de BLI ont montré que l'IgG C4, l'IgG C4 (H310A/H435Q) et le Fab C4 se lient avec une très forte affinité à la protéine PD-L1 humaine, avec des valeurs de constante d'affinité K_D nanomolaires (Tableau 8). La valeur de K_D de 0,85 nM de l'IgG C4 est proche de la valeur de 1,5 nM mesurée pour ce même anticorps dans une précédente publication (Truillet *et al.*, 2018). Les valeurs de constante d'affinité des 3 ligands C4 pour la protéine PD-L1 humaine sont également du même ordre de grandeur que celles obtenues pour d'autres ligands anti-PD-L1 utilisés dans des études d'imagerie TEP (Tableau 9).

Les valeurs de K_D obtenues pour l'IgG C4, l'IgG C4 (H310A/H435Q) et le Fab C4 conjugués à la desferrioxamine (DFO) sont similaires à celles mesurées pour les ligands non conjugués (Tableau 8). La conjugaison des ligands C4 au chélateur DFO, nécessaire pour le radiomarquage au ^{89}Zr , n'a donc pas impacté leur affinité pour PD-L1.

Tableau 9. Constante d'affinité K_D de divers ligands anti-PD-L1 pour la protéine PD-L1 humaine. Ces valeurs de constante d'affinité K_D ont été mesurées par interférométrie bio-couche (BLI) ou par résonance de plasmons de surface (SPR).

Ligand anti-PD-L1	K_D (nM)	Méthode de mesure	Référence
IgG1 C4	1,5	BLI	Truillet et al., 2018
Minibody C4	0,007	BLI	Wei et al., 2020
scFv C4	0,55	BLI	Wei et al., 2020
IgG1 Atezolizumab	1,8	BLI	Moroz et al., 2018
IgG4 REGN3504	0,26	SPR	Kelly et al., 2021
scFv-Fc KN035	2,9	BLI	Li et al., 2018
Nanobody Nb09	2,9	SPR	Lv et al., 2020
Nanobody K2	3,8	SPR	Bridoux et al., 2020
Petite protéine HAC-PD-1	0,11	SPR	Maute et al., 2015
Adnectine BMS-986192	< 0,01	SPR	Donnelly et al., 2018
Petite protéine FN3 _{hPD-L1}	0,61	BLI	Natarajan et al., 2019
Affibody Z _{PD-L1_1}	1,0	SPR	González Trotter et al., 2017
Affibody Z _{PD-L1_4}	0,07	SPR	Rubins et al., 2020

Abréviations : BLI, interférométrie bio-couche ; Fc, fragment cristallisable ; K_D , constante d'affinité ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; scFv, « single-chain variable fragment » ; SPR, résonance de plasmons de surface.

Il serait intéressant de rajouter à cette étude une mesure de l'affinité de l'IgG C4 mutant (H310A/H435Q) pour le FcRn murin et le FcRn humain, en comparaison de l'IgG C4 parental (par ex. par BLI ou test ELISA).

3.3. Radiomarquage des ligands C4 au zirconium-89

Afin d'être détectés *in vivo* par imagerie TEP, les ligands C4 anti-PD-L1 ont été radiomarqués avec l'émetteur de positons zirconium-89 (^{89}Zr , $t_{1/2} = 3,3$ jours) (Annexe 1). La production du ^{89}Zr est réalisée au sein d'un cyclotron, via le bombardement d'une cible d'yttrium-89 (^{89}Y) par un faisceau de protons de faible énergie (< 20 MeV) (van de Watering *et al.*, 2014). Des réactions nucléaires compétitives peuvent également générer de petites quantités d'autres radionucléides non désirés comme le zirconium-88 (^{88}Zr , $t_{1/2} = 83,4$ jours) ou l'yttrium-88 (^{88}Y , $t_{1/2} = 106,6$ jours). Le ^{89}Zr se désintègre tout d'abord en yttrium-89 métastable ($^{89\text{m}}\text{Y}$, $t_{1/2} = 15,7$ s) par émission de positons (23 %) ou capture d'électrons (77 %). Le $^{89\text{m}}\text{Y}$ se désintègre ensuite en ^{89}Y stable par émission de photons gamma de haute énergie (909 keV) (Dilworth and Pascu, 2018) (Figure 22).

De manière générale, le radionucléide choisi pour une étude TEP doit posséder idéalement une période correspondant à la demi-vie plasmatique du ligand radiomarqué (van de Watering *et al.*, 2014). Le ^{89}Zr est ainsi bien adapté pour le radiomarquage des anticorps, sa demi-vie de 3,3 jours étant compatible avec leur lente PK *in vivo*. De plus, en raison de leur énergie moyenne relativement faible (396 keV), les positons émis lors de la désintégration du ^{89}Zr parcourent seulement une courte distance (1,2 mm) avant leur annihilation avec un électron de la matière et l'émission de deux photons gamma (511 keV) à 180° l'un de l'autre. Le ^{89}Zr permet ainsi d'obtenir des images TEP de haute résolution.

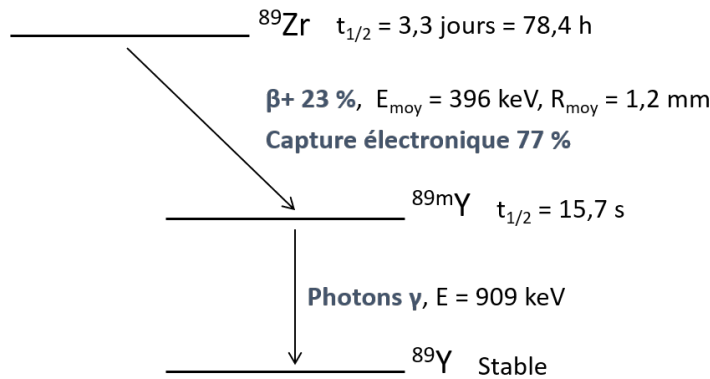


Figure 22. Schéma de désintégration du zirconium-89. Abréviations : E_{moy} , énergie moyenne des particules ; R_{moy} , distance moyenne parcourue par les particules dans la matière ; $t_{1/2}$, période du radionucléide ; ^{89}Y , yttrium-89 ; $^{89\text{m}}\text{Y}$, yttrium-89 métastable ; ^{89}Zr , zirconium-89.

Pour le radiomarquage au ^{89}Zr , le dérivé de la desferrioxamine (DFO) p-NCS-Bz-DFO a tout d'abord été conjugué de manière covalente et non-spécifique aux résidus lysines accessibles des ligands C4 (Figure 23). La chélation non covalente du $^{89}\text{Zr}^{4+}$ aux complexes DFO-ligand C4 a ensuite été effectuée (Vosjan *et al.*, 2010) (Figure 23). Les solutions de radioligands C4 ainsi obtenues ont été purifiées par filtration sur gel, afin de séparer les petites molécules ($^{89}\text{Zr}^{4+}$ libre et ^{89}Zr -DFO) des composés de plus grande masse moléculaire (radioligands C4).

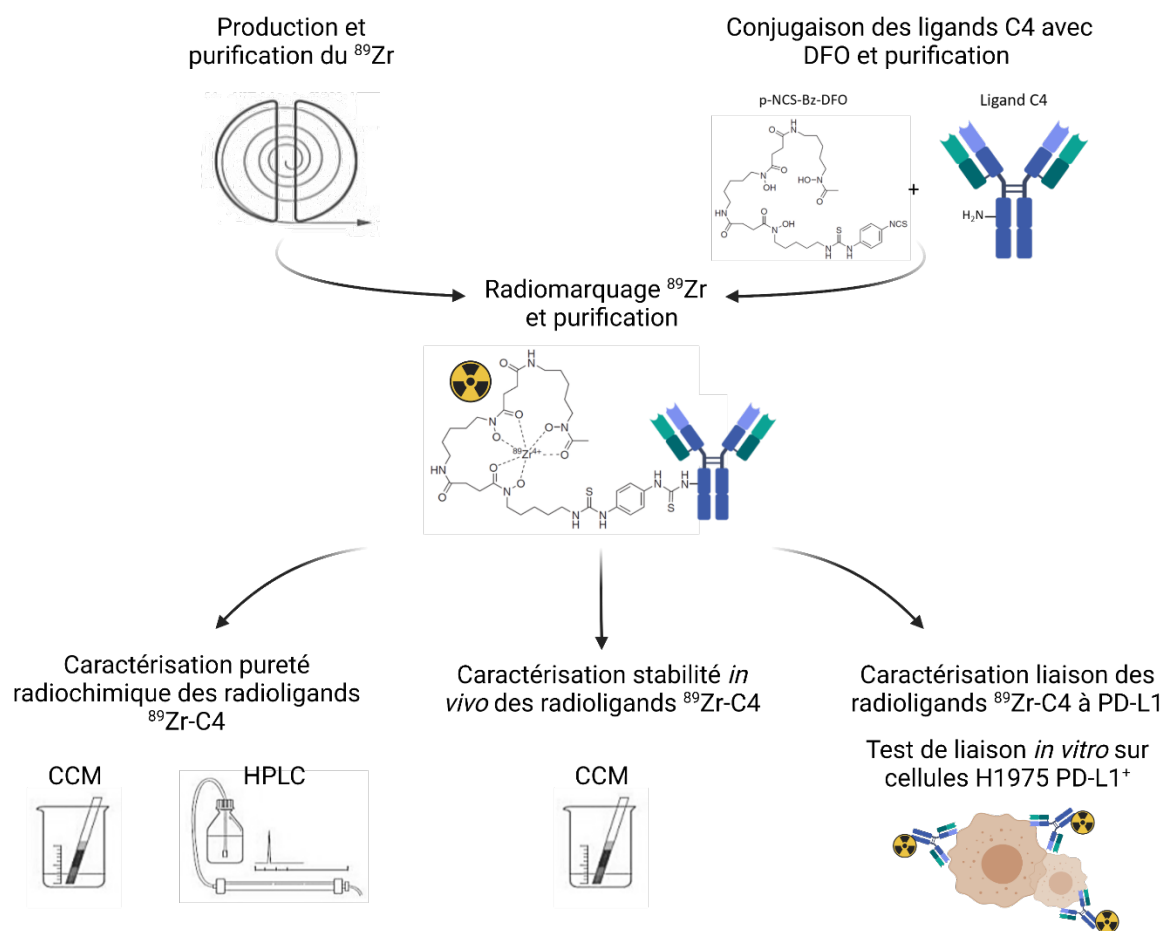


Figure 23. Représentation schématique des différentes étapes de radiomarquage et de caractérisation des radioligands C4 anti-PD-L1. Abréviations : CCM, chromatographie sur couche mince ; DFO, desferrioxamine ; HPLC, chromatographie liquide haute pression ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; ^{89}Zr , zirconium-89.

Le rendement de radiomarquage (%) a été évalué comme l'activité (MBq) associée au radioligand C4 avant purification divisée par l'activité (MBq) de la solution de ^{89}Zr utilisée pour le radiomarquage (les 2 valeurs d'activité étant ramenées au même temps). Les valeurs de rendement obtenues pour les expériences de radiomarquage des ligands C4 étaient comprises entre 39 et 87 % (Tableau 10).

L'activité spécifique (MBq/nmol) a été calculée comme l'activité (MBq) de la solution de radioligand C4 après purification divisée par la quantité (nmol) de ligand C4 utilisée pour le radiomarquage. Les valeurs d'activité spécifique obtenues après radiomarquage des ligands C4 étaient comprises entre 2,0 et 11,6 MBq/nmol (Tableau 10), l'objectif étant d'obtenir les valeurs les plus élevées possibles. En effet, pour pouvoir encore détecter les radioligands C4 par imagerie TEP plusieurs jours après leur injection chez les animaux, l'activité de solution radioactive administrée devait idéalement être $\geq 3,7$ MBq (100 μCi). Une activité spécifique élevée du radioligand C4 (par ex. 7,5-11,6 MBq/nmol) a permis d'injecter une telle activité tout en limitant la quantité totale (nmol) de ligand C4 administré, le but étant de rester en dose traceuse. Une plus faible valeur d'activité spécifique du radioligand C4 (par ex. 2,0 MBq/nmol) a en revanche

imposé l'administration d'une quantité totale de ligand C4 plus importante pour pouvoir respecter la limite minimale d'activité injectée. Néanmoins, seule une expérience de radiomarquage (du Fab C4) a abouti à une activité spécifique < 5 MBq/nmol.

La pureté radiochimique des radioligands C4 après purification a été évaluée par chromatographie sur couche mince (CCM) (Figure 23). La solution de radioligand C4 a été déposée sur une plaque recouverte d'une fine couche de silice (phase stationnaire). L'extrémité inférieure de la plaque a ensuite été immergée dans de l'éluant (phase mobile) qui a alors migré sur la plaque par capillarité, entraînant avec lui les composés présents dans la solution radioactive. Après élution, les différentes espèces radioactives séparées sur la plaque ont été détectées à l'aide d'un scanner pour CCM (Figure 24).

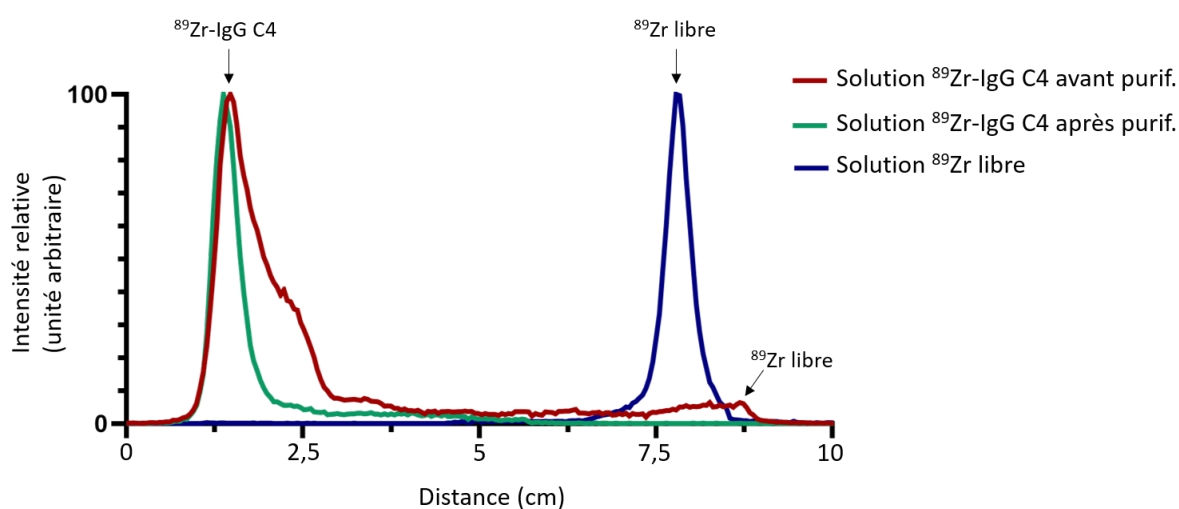


Figure 24. Evaluation de la pureté radiochimique des solutions de radioligands C4 par chromatographie sur couche mince. Radio-chromatogrammes CCM représentatifs d'une solution de ^{89}Zr -IgG C4, avant et après purification par filtration sur gel. Le radio-chromatogramme CCM d'une solution de ^{89}Zr -oxalate (^{89}Zr libre) est également représenté. Un seul pic (en vert sur la figure), correspondant à la détection du radioligand C4, était présent sur le radio-chromatogramme de la solution de ^{89}Zr -IgG C4 purifiée, montrant bien l'absence de ^{89}Zr libre dans cette solution. La proportion (%) de ^{89}Zr -IgG C4 dans la solution purifiée a été obtenue en calculant l'aire sous le pic. Abréviations : CCM, chromatographie sur couche mince ; purif., purification ; ^{89}Zr , zirconium-89.

La pureté radiochimique des radioligands C4 après purification a également été vérifiée via chromatographie liquide haute pression (HPLC) par exclusion de taille (Figure 23). La solution de radioligand C4 a été entraînée par de l'éluant (phase mobile) à travers une colonne remplie de particules poreuses (phase stationnaire). En sortie de colonne, un détecteur de lumière UV et un détecteur à scintillation ont permis la détection des différentes espèces présentes dans la solution éluées l'une après l'autre (Figure 25).

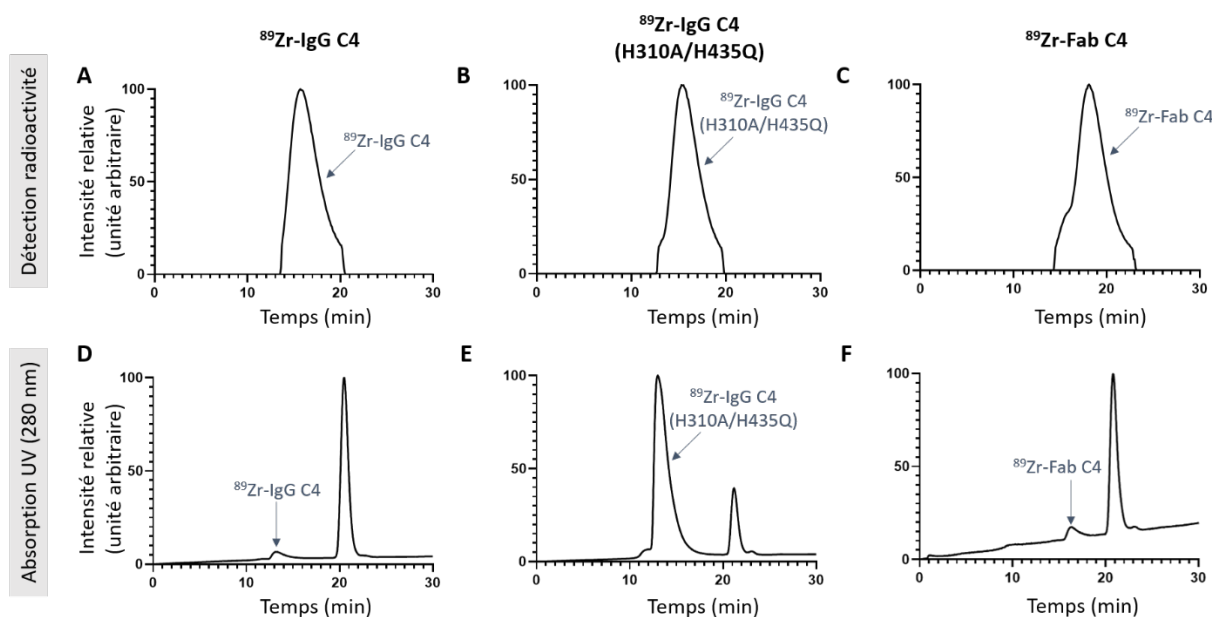


Figure 25. Evaluation de la pureté radiochimique des radioligands C4 par chromatographie liquide haute pression. Chromatogrammes HPLC représentatifs des solutions de ^{89}Zr -IgG C4 (A) (D), ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) (B) (E) et ^{89}Zr -Fab C4 (C) (F), après purification par filtration sur gel. (A) (B) (C) Le pic présent sur le radio-chromatogramme correspond à la détection du radioligand C4. Aucun autre pic n'a été observé. La proportion (%) de radioligand C4 dans la solution a été obtenue en calculant l'aire sous le pic. (D) (E) (F) Le radioligand C4 a aussi été détecté par absorption de la lumière UV à 280 nm. Le second pic observé sur le chromatogramme UV (temps de rétention de ~ 22 min) correspond à l'acide gentisique encore présent dans la solution de radioligand purifiée. Abréviations : HPLC, chromatographie liquide haute pression ; UV, ultra-violet ; ^{89}Zr , zirconium-89.

La pureté radiochimique des solutions de radioligands C4 purifiées a été mesurée comme > 96 %, à la fois par CCM et par HPLC, sur l'ensemble des expériences de radiomarquage réalisées (N = 6) (Tableau 10).

Tableau 10. Caractérisation des expériences de radiomarquage des ligands C4 au ^{89}Zr .

Ligand C4 radiomarké au ^{89}Zr	Rendement de radiomarquage (%)	Activité spécifique (MBq/nmol)	Pureté radiochimique CCM (%)	Pureté radiochimique HPLC (%)
IgG C4	61	11,6	97	/
IgG C4	85	9,5	96	100
IgG C4 (H310A/H435Q)	53	6,2	98	/
IgG C4 (H310A/H435Q)	75	5,3	97	99
Fab C4	39	7,5	98	/
Fab C4	87	2,0	98	100

Abréviations : CCM, chromatographie sur couche mince ; HPLC, chromatographie liquide haute pression ; ^{89}Zr , zirconium-89.

La stabilité *in vitro* du ^{89}Zr -IgG C4 dans du sérum de souris à 37°C a été analysée par CCM pour différents temps d'incubation dans une précédente publication (Truillet *et al.*, 2018). Les radio-chromatogrammes obtenus ont montré que plus de 98 % du ^{89}Zr -IgG C4 était encore intact après 120 h (5 jours) d'incubation dans le sérum de souris, suggérant ainsi une bonne stabilité *in vivo* du radioligand. La stabilité *in vivo* des radioligands C4 a été évaluée par CCM en prélevant le sérum de souris injectées avec les radioligands à la fin des expériences d'imagerie TEP longitudinale. Les 3 radioligands C4 ont démontré une bonne stabilité *in vivo*, avec 97 % du ^{89}Zr -IgG C4, 95 % du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) et 97 % du ^{89}Zr -Fab C4 encore intacts dans le sérum des souris 7 jours après leur injection.

3.4. Test de liaison des radioligands C4 aux cellules de CPNPC PD-L1⁺

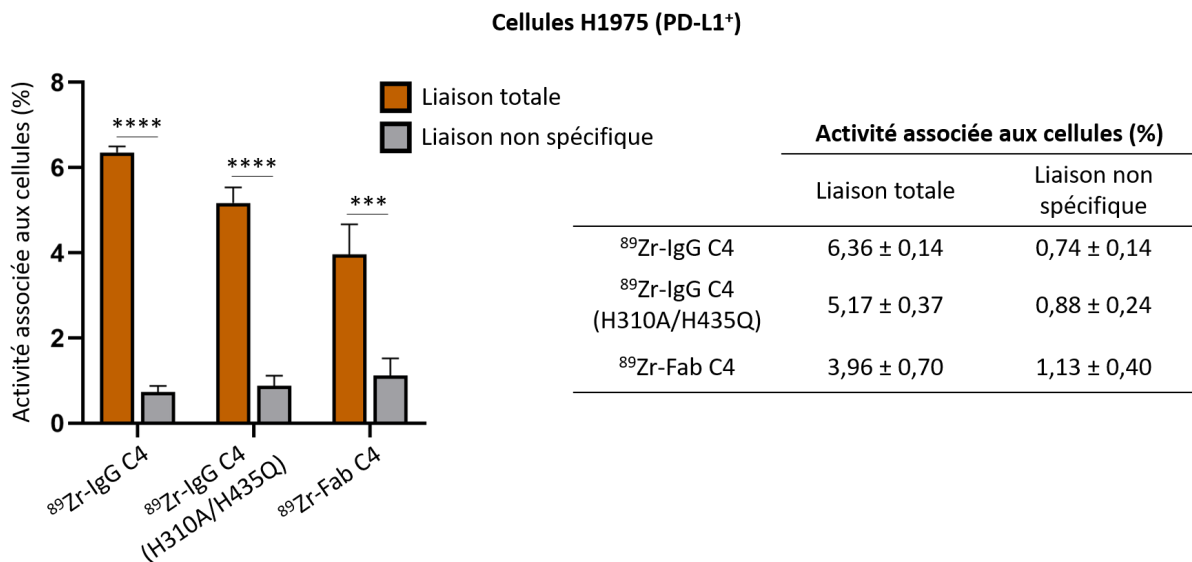


Figure 26. Test de liaison des radioligands C4 aux cellules de CPNPC PD-L1⁺. Liaisons totale et non spécifique des radioligands ^{89}Zr -IgG C4, ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) et ^{89}Zr -Fab C4 aux cellules H1975 PD-L1⁺, après 2 h d'incubation à 37°C. Les données sont présentées comme la valeur moyenne ± l'écart-type (N = 6 réplicats par condition). Les comparaisons statistiques ont été effectuées avec le test t de Student bilatéral apparié (**** p < 0,0001, *** p < 0,001). Abréviations : PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; ^{89}Zr , zirconium-89.

Une fois les ligands C4 anti-PD-L1 radiomarqués au ^{89}Zr , des tests de liaison *in vitro* ont été réalisés afin de vérifier la spécificité de ces radioligands pour la protéine PD-L1, exprimée à la surface des cellules de CPNPC H1975 (Figure 23, Annexe 1). Les cellules H1975 en suspension ont été incubées avec le ^{89}Zr -IgG C4, le ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) ou le ^{89}Zr -Fab C4 pendant 2 h à 37°C. Pour évaluer la fixation cellulaire non-spécifique, les cellules ont également été incubées avec chaque radioligand C4 en présence d'un fort excès molaire (100x) de ligand C4 froid (non radiomarqué). L'activité associée aux cellules a été mesurée avec un compteur à rayons gamma, et exprimée en pourcentage de l'activité totale ajoutée dans chaque échantillon cellulaire.

Les 3 radioligands C4 anti-PD-L1 se sont bien liés aux cellules H1975 PD-L1⁺, avec des valeurs d'activité associée aux cellules de $6,36 \pm 0,14$ % pour le ⁸⁹Zr-IgG C4, de $5,17 \pm 0,37$ % pour le ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q), et de $3,96 \pm 0,70$ % pour le ⁸⁹Zr-Fab C4 (Figure 26). Cette interaction a été significativement bloquée en co-incubant les cellules avec un fort excès de ligand C4 froid. Ces résultats ont ainsi validé la liaison spécifique *in vitro* des radioligands C4 à la protéine PD-L1 exprimée à la surface des cellules H1975.

En plus des tests de liaison réalisés au cours de cette thèse, la fraction immunoréactive du ⁸⁹Zr-IgG C4, c'est-à-dire le pourcentage de radioligand capable de se lier à PD-L1, a été déterminée dans une précédente publication (Truillet *et al.*, 2018). Les résultats ont montré que 93 % de l'anticorps radiomarqué ont interagit avec la protéine PD-L1 exprimée à la surface de cellules humaines de cancer de la prostate (PC3), indiquant ainsi que l'étape de radiomarquage de l'IgG C4 n'a pas altéré sa capacité de liaison à PD-L1.

Une fois les modèles précliniques de CPNPC humain PD-L1⁺ et PD-L1⁻ développés d'un côté, et les radioligands C4 anti-PD-L1 produits de l'autre, les expériences d'imagerie TEP de PD-L1 ont pu être réalisées.

4. Imagerie TEP/TDM de PD-L1 avec les radioligands C4 dans les modèles précliniques de CPNPC humain

4.1. Présentation des expériences d'imagerie TEP/TDM longitudinale réalisées

L'IgG C4, l'IgG C4 (H310A/H435Q) et le Fab C4, radiomarqués au ⁸⁹Zr, ont été injectés ($3,7 \pm 0,7$ MBq, $0,6 \pm 0,3$ nmol) dans des souris nudes femelles (10 ± 1 semaines, $27,8 \pm 1,3$ g) portant les xénogreffes sous-cutanées H1975 (PD-L1⁺) ou A549 (PD-L1⁻) (Tableau 11, Annexe 1). Pour les expériences dites de « blocking », en plus du ligand C4 radiomarqué, les souris ont été co-injectées avec un excès molaire (20x, $\sim 1,2$ nmol) de ligand C4 froid. Des examens TEP/TDM des souris ont ensuite été réalisés à différents temps post-injection : 1 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, et également 7 jours (sauf pour le ⁸⁹Zr-Fab) (Figure 27).

Une fois reconstruites, les images TEP/TDM ont été analysées avec le logiciel PMOD (Annexe 1). Pour quantifier l'accumulation des radioligands C4, des volumes d'intérêt (VOI pour « volume of interest ») ont été dessinés dans les principaux organes sains et dans la tumeur. La concentration moyenne en activité (kBq/cm³) extraite de chacun de ces VOIs a été corrigée par rapport au temps d'injection et divisée par l'activité totale administrée (kBq), pour finalement obtenir le pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu (% ID/cm³). Les valeurs de concentration en activité (% ID/cm³) dans les organes sains (cœur, foie, reins, rate, et muscle) et dans les tumeurs H1975 et A549 ainsi déterminées pour l'ensemble des expériences d'imagerie TEP/TDM longitudinale réalisées (Tableau 11) sont regroupées dans le document Annexe 2.

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP dans des modèles de CPNPC humains

Tableau 11. Résumé des expériences d'imagerie TEP/TDM longitudinale réalisées avec les radioligands C4 anti-PD-L1 dans les modèles de xénogreffes humaines de CPNPC PD-L1⁺ et PD-L1⁻. Pour chaque expérience, les activités indiquées ont été corrigées par rapport au temps d'injection du radioligand pour tenir compte de la décroissance radioactive. Les données sont présentées comme la valeur moyenne \pm l'écart-type.

Modèle de CPNPC humain	Ligand C4 radiomarqué au ⁸⁹ Zr	Activité spécifique (MBq/nmol)	Activité injectée (MBq)	Quantité radioligand injectée (nmol)	Quantité ligand froid co-injectée (nmol)	Nombre de souris
H1975 (PD-L1 ⁺)	IgG C4	11,6	4,3 \pm 0,4	0,36 \pm 0,03	/	6
	IgG C4	9,5	3,7 \pm 0,4	0,40 \pm 0,04	1,2 nmol	3
	IgG C4 (H310A/H435Q)	6,2	4,2 \pm 0,2	0,66 \pm 0,03	/	6
	IgG C4 (H310A/H435Q)	6,2	3,7 \pm 0,2	0,60 \pm 0,02	1,2 nmol	4
	Fab C4	7,5	4,0 \pm 0,3	0,54 \pm 0,03	/	6
	Fab C4	7,5	4,2 \pm 0,3	0,57 \pm 0,03	1,2 nmol	4
A549 (PD-L1 ⁻)	IgG C4 (H310A/H435Q)	5,3	2,4 \pm 0,2	0,45 \pm 0,03	/	6
	IgG C4 (H310A/H435Q)	5,3	2,4 \pm 0,2	0,48 \pm 0,02	1,2 nmol	3
	Fab C4	2,0	2,6 \pm 0,3	1,33 \pm 0,13	/	5

Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

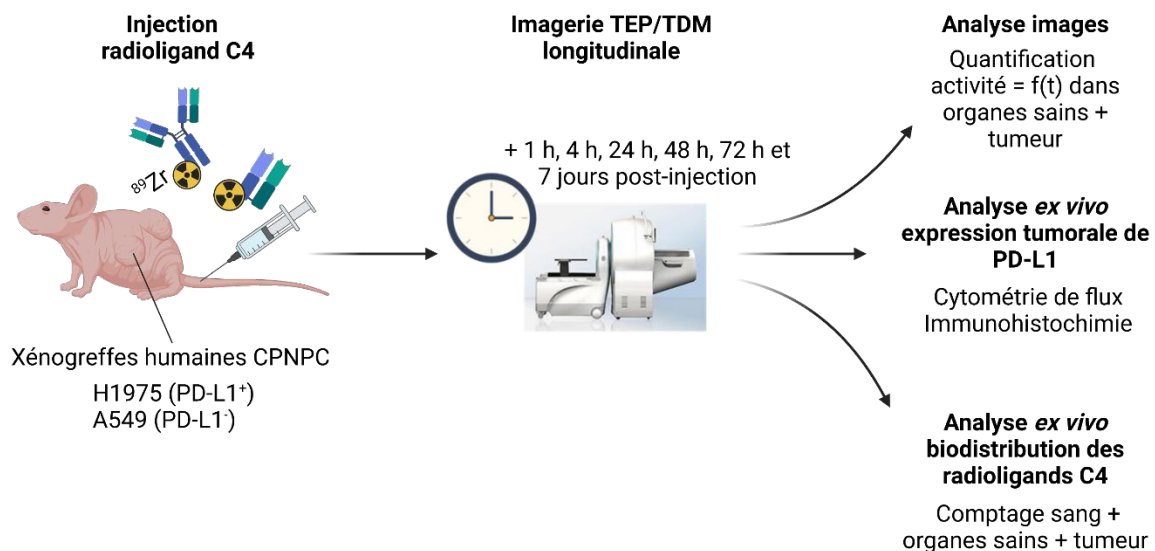


Figure 27. Représentation schématique des différentes étapes d'une expérience d'imagerie TEP/TDM longitudinale. Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; TDM, tomodynamométrie ; TEP, tomographie par émission de positons ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

Après la dernière session d'imagerie, les animaux ont été sacrifiés. Un échantillon de sang ainsi que les principaux organes et les tumeurs sous-cutanées ont été prélevés. La biodistribution des radioligands C4 dans ces différents tissus a été évaluée *ex vivo* à l'aide d'un compteur à rayons gamma (Annexe 1). Les valeurs d'accumulation des radioligands C4 dans les tissus mesurées par biodistribution *ex vivo* (% ID/g) étaient fortement corrélées aux valeurs d'accumulation dans ces mêmes tissus extraites de l'analyse des images TEP/TDM acquises juste avant le sacrifice des souris (% ID/cm³) (Figure 28). Ce résultat soutient le fait que la quantification de l'accumulation des radioligands C4 *in vivo* via l'analyse des images TEP/TDM est relativement correcte et fiable.

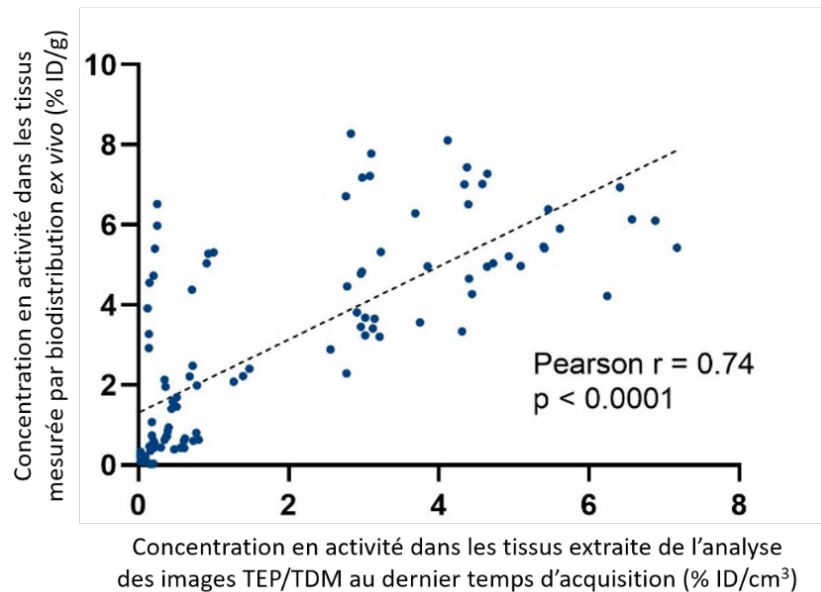


Figure 28. Corrélation entre la quantification de l'accumulation des radioligands C4 dans les tissus par biodistribution *ex vivo* et par analyse des images TEP/TDM. Les données des expériences d'imagerie TEP/TDM effectuées avec les radioligands ⁸⁹Zr-IgG C4, ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) et ⁸⁹Zr-Fab C4 sur les souris portant les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺), avec ou sans co-injection d'une dose bloquante de ligand froid, ont été regroupées (N = 6 expériences). Pour le ⁸⁹Zr-Fab C4, les reins ont été exclus de l'analyse car les valeurs d'activité mesurées par comptage *ex vivo* étaient > 200 % ID/g. La corrélation entre les valeurs d'activité mesurées par les 2 méthodes a été évaluée par le test de Pearson. Abréviations : % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; % ID/g, pourcentage de dose injectée par gramme de tissu.

4.2. Pharmacocinétique sanguine des radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC PD-L1⁺

La PK sanguine du ⁸⁹Zr-IgG C4, du ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) et du ⁸⁹Zr-Fab C4 a été étudiée à partir des images TEP/TDM longitudinales obtenues sur les souris portant les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺), après injection des radioligands en dose traceuse (sans blocking) (Tableau 11). La concentration en activité dans le sang associée aux radioligands C4 a été dérivée du VOI placé dans le cœur sur les images TEP/TDM.

4.2.1. Biodistribution sanguine des radioligands C4

Les 3 radioligands C4 ont montré des cinétiques d'élimination de la circulation sanguine bien distinctes. Le fragment ^{89}Zr -Fab C4 a été éliminé du sang le plus rapidement, avec une activité $< 1\%$ ID/cm³ dès 4 h après injection (Figure 29). Comme attendu, compte tenu de son incapacité à être recyclé par le FcRn, le ^{89}Zr -IgG C4 mutant a aussi été rapidement éliminé du sang en comparaison du ^{89}Zr -IgG C4 WT. En effet, l'accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) dans le VOI cœur était $< 1\%$ ID/cm³ à partir de 48 h post-injection, tandis que celle du ^{89}Zr -IgG C4 était encore de $\sim 3\%$ ID/cm³ à 7 jours post-injection (dernière session d'imagerie) (Figure 29). Sur les images TEP/TDM obtenues à 48 h post-injection, le signal du ^{89}Zr -IgG C4 dans le cœur était ainsi encore clairement visible, tandis que celui du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) était indétectable (Figure 29).

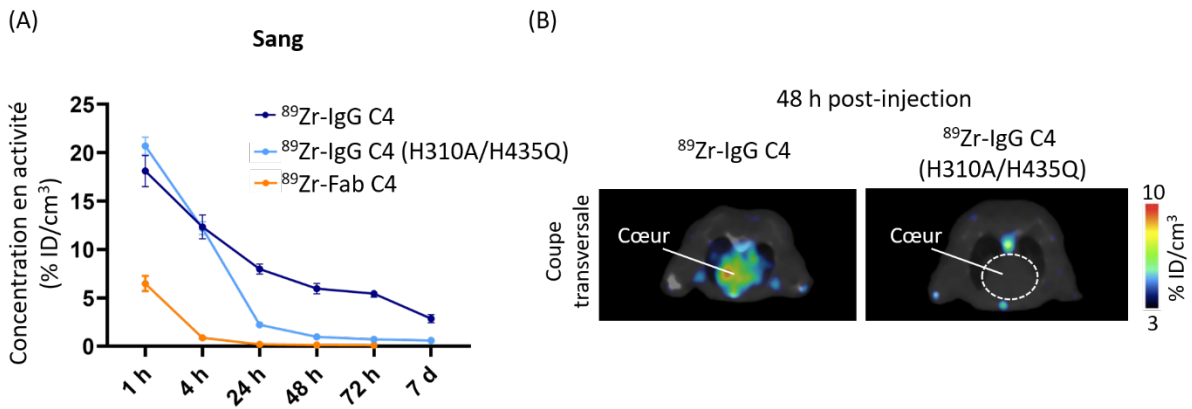


Figure 29. Biodistribution sanguine des radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1⁺. (A) Concentration en activité dans le sang (% ID/cm³) (VOI cœur) déterminée à différents temps après injection des radioligands C4 dans les souris portant les xéno greffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺). (B) Images TEP/TDM représentatives (coupes transversales), obtenues 48 h après administration du ^{89}Zr -IgG C4 et du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q). Abréviations : % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ^{89}Zr , zirconium-89.

4.2.2. Modélisation de la PK plasmatique des radioligands C4

L'activité des radioligands C4 dans le plasma a été dérivée de leur activité dans le sang extraite du VOI cœur. Une telle estimation non-invasive de l'activité plasmatique des radioligands à partir de l'analyse des images TEP/TDM permet d'éviter les prélèvements répétés de sang sur les animaux pour comptage *ex vivo* de l'activité dans le plasma. Ces prélèvements peuvent s'avérer particulièrement complexes d'un point de vue technique et éthique/règlementaire chez les souris, en raison de leur faible volume sanguin. En considérant que les anticorps/fragments d'anticorps n'interagissent pas avec les globules rouges, et qu'ils sont ainsi essentiellement distribués dans le plasma, la concentration en activité dans le plasma $C_{plasma}(t)$ des radioligands C4 (% ID/cm³ ou % ID/mL) a été calculée selon la formule suivante :

$$C_{plasma}(t) = \frac{C_{sang}(t)}{0,55}$$

Avec :

- $C_{sang}(t)$ concentration en activité dans le VOI cœur (% ID/cm³ ou % ID/mL).
- La valeur 0,55 représentant la proportion de plasma dans le volume de sang total (Mathew, Sankar and Varacallo, 2021).

Pour chacun des radioligands C4, les valeurs de concentration en activité dans le plasma $C_{plasma}(t)$, obtenues pour chaque animal à chaque temps d'acquisition TEP/TDM, ont été regroupées. Ces données ont ensuite été ajustées à un modèle bi-compartmental avec injection par bolus intraveineux et élimination d'ordre 1 (Figure 30), permettant ainsi l'estimation de divers paramètres pharmacocinétiques (Tableau 12, Annexe 1).

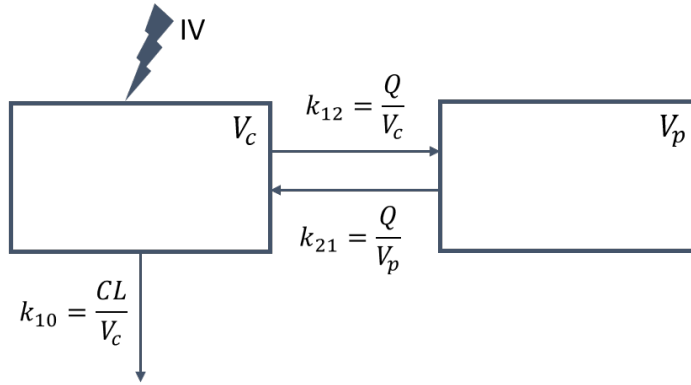


Figure 30. Représentation schématique du modèle bi-compartmental avec injection intraveineuse et élimination d'ordre 1. Abréviations : CL , clairance du compartiment central ; IV , injection intraveineuse ; k_{10} , constante de vitesse d'élimination du compartiment central ; k_{12} , constante de vitesse de distribution du compartiment central vers le compartiment périphérique ; k_{21} , constante de vitesse de distribution du compartiment périphérique vers le compartiment central ; Q , clairance du compartiment périphérique vers le compartiment central ; V_C , volume du compartiment central ; V_P , volume du compartiment périphérique.

Tableau 12. Pharmacocinétique plasmatique des radioligands C4.

	⁸⁹ Zr-IgG C4	⁸⁹ Zr-IgG C4 (H310A/H435Q)	⁸⁹ Zr-Fab C4
$t_{1/2\alpha}$ (h)	2,94	4,53	0,16
$t_{1/2\beta}$ (h)	80,25	86,55	1,50
V_c (mL)	2,71	2,41	2,31
CL (mL.h ⁻¹)	0,047	0,16	2,46
k_{10} (h ⁻¹)	0,017	0,066	1,06
k_{12} (h ⁻¹)	0,11	0,08	1,91
k_{21} (h ⁻¹)	0,12	0,02	1,92
AUC_{plasma} (% ID*h/mL)	2137	629	41

Abréviations : AUC_{plasma} , aire sous la courbe ajustée de la concentration en activité dans le plasma en fonction du temps ; CL , clairance du compartiment central ; k_{10} , constante de vitesse d'élimination du compartiment central ; k_{12} , constante de vitesse de distribution du compartiment central vers le compartiment périphérique ; k_{21} , constante de vitesse de distribution du compartiment périphérique vers le compartiment central ; $t_{1/2\alpha}$, demi-vie biologique de distribution ; $t_{1/2\beta}$, demi-vie biologique d'élimination ; V_C , volume du compartiment central ; % ID, pourcentage de dose injectée ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP dans des modèles de CPNPC humains

La demi-vie biologique d'élimination ($t_{1/2\beta}$) du fragment ^{89}Zr -Fab C4 a été estimée à 1,5 h, avec la valeur de clairance (CL) maximale de 2,46 mL.h⁻¹. La clairance du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) était de 0,16 mL.h⁻¹ contre seulement 0,047 mL.h⁻¹ pour le ^{89}Zr -IgG C4, concordant avec l'élimination plus rapide de l'IgG C4 mutant. En revanche, la demi-vie biologique d'élimination estimée pour le ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) ($t_{1/2\beta} = 86,55$ h) était similaire à celle du ^{89}Zr -IgG C4 ($t_{1/2\beta} = 80,25$ h). Cela pourrait s'expliquer par une plus forte rétention du ^{89}Zr -IgG C4 mutant dans le compartiment périphérique. En effet, la valeur de constante de vitesse de distribution du compartiment périphérique vers le compartiment central (k_{21}) était 6 fois plus faible pour le ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) comparé au ^{89}Zr -IgG C4. En accord avec les valeurs de clairance, l'exposition plasmatique ($\text{AUC}_{\text{plasma}}$) était la plus importante pour le ^{89}Zr -IgG C4, suivi du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) (~ 3,4 fois plus faible) et du ^{89}Zr -Fab C4 (~ 52 fois plus faible).

4.3. Accumulation des radioligands C4 dans les xénogreffes humaines de CPNPC PD-L1⁺

Comme observé sur les images TEP/TDM, les 3 radioligands C4 ont été capables de détecter efficacement l'expression de PD-L1 dans les xénogreffes humaines sous-cutanées de CPNPC H1975 (Figure 31), avec cependant des différences marquées en termes d'accumulation et de cinétique tumorales.

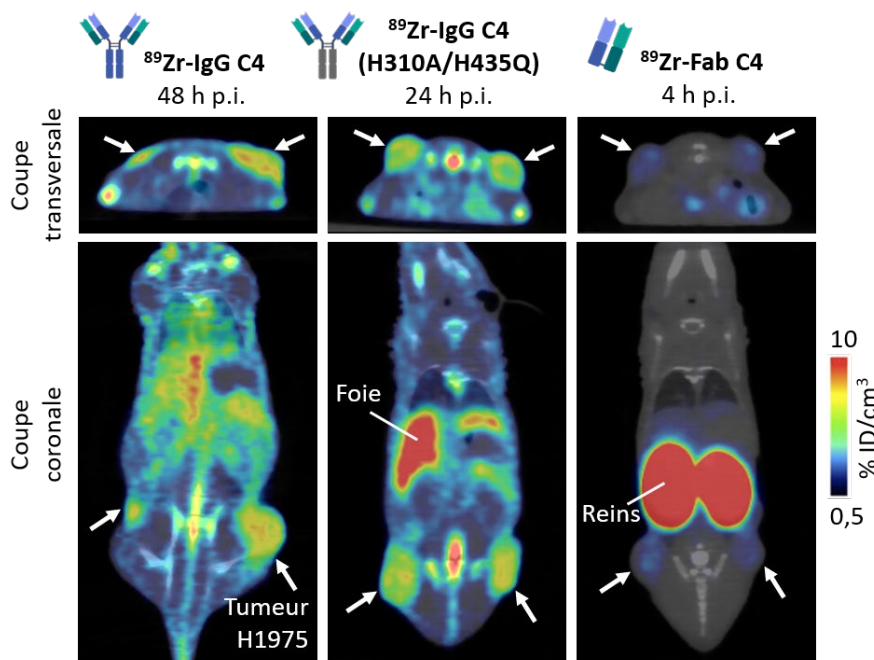


Figure 31. Imagerie TEP/TDM de PD-L1 avec les radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1⁺. Images TEP/TDM représentatives (coupes transversales et coronales) de souris nues femelles portant les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 PD-L1⁺ sur chaque flanc (flèches blanches), après administration des radioligands C4. Les images ont été obtenues au temps d'acquisition optimal post-injection (en termes de ratio de signal tumeur/bruit) pour chacun des radioligands. Abréviations : p.i., post-injection ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ^{89}Zr , zirconium-89.

4.3.1. Accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 dans les xénogreffes H1975

Les images TEP optimales avec le ^{89}Zr -IgG C4 ont été observées 48 h après injection, avec une accumulation maximale (C_{\max}) dans les xénogreffes H1975 de $4,85 \pm 0,61$ % ID/cm³, un ratio de signal tumeur/muscle maximal (TMR_{\max}) de $8,34 \pm 0,63$ et un ratio de signal tumeur/sang (TBR) de $0,84 \pm 0,35$ (Figure 32). Le muscle est communément choisi comme organe sain de référence PD-L1⁻ pour évaluer le contraste tumeur/bruit de fond.

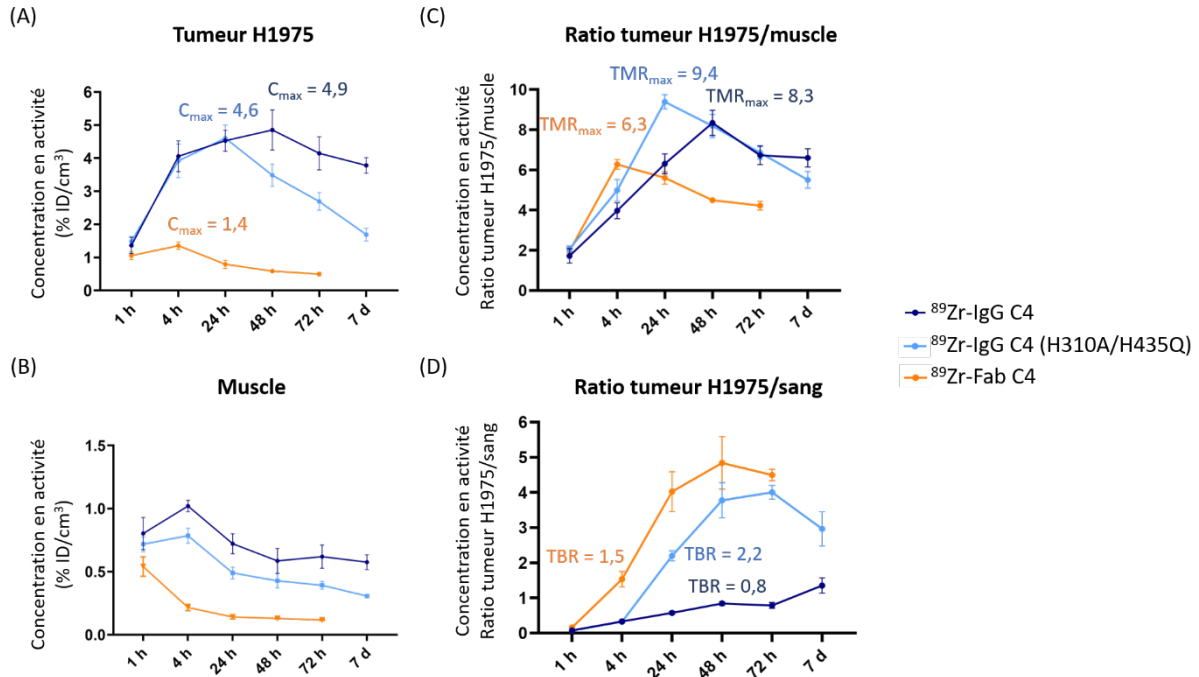


Figure 32. Biodistribution des radioligands C4 dans les xénogreffes humaines de CPNPC PD-L1⁺. (A) (B) Concentrations en activité (% ID/cm³) dans la tumeur H1975 (A) et dans le muscle (B) déterminées à différents temps après injection des radioligands C4 dans les souris portant les xénogreffes sous-cutanées H1975 (PD-L1⁺). (C) (D) Ratio de la concentration en activité dans la tumeur H1975 sur la concentration en activité dans le muscle (C) et dans le sang (D). Les données sont présentées comme la valeur moyenne \pm l'écart-type ($N = 6$ souris par radioligand). Abréviations : C_{\max} , concentration en activité maximale dans la tumeur ; CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; TBR, ratio de signal tumeur/sang ; TMR_{\max} , ratio de signal tumeur/muscle maximal ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ^{89}Zr , zirconium-89.

L'obtention des images TEP de meilleur contraste tumeur/bruit 48 h après injection du ^{89}Zr -IgG C4 concorde avec les résultats préalablement publiés pour ce même anticorps radiomarqué et pour le ^{89}Zr -atezolizumab, dans le même modèle préclinique de CPNPC H1975 (Moroz *et al.*, 2018; Truillet *et al.*, 2018). En effet, les images TEP optimales avec ces anticorps radiomarqués ont également été observées 48 h après leur administration, avec des valeurs d'accumulation maximale dans la tumeur H1975 de $C_{\max} \sim 7,1$ % ID/g pour le ^{89}Zr -IgG C4, et $C_{\max} \sim 4,0$ % ID/g pour le ^{89}Zr -atezolizumab (activités mesurées par comptage *ex vivo*) (Tableau 13). Par ailleurs, l'accumulation maximale du ^{89}Zr -IgG C4 dans la tumeur H1975 mesurée dans notre étude via l'analyse des images TEP/TDM ($C_{\max} \sim 4,9$ % ID/cm³) est similaire aux valeurs de C_{\max} obtenues par la même méthode d'analyse avec d'autres anticorps anti-PD-L1

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP dans des modèles de CPNPC humains

radiomarqués au ^{89}Zr , dans des xénogreffes humaines de cancer du poumon PD-L1⁺ (Ehlerding *et al.*, 2019; Christensen *et al.*, 2020) (Tableau 13).

Tableau 13. Accumulation tumorale de divers radioligands anti-PD-L1 dans des modèles précliniques de cancer du poumon humain PD-L1⁺. Les radioligands anti-PD-L1 ont été injectés dans des souris immunodéficientes portant des xénogreffes humaines sous-cutanées de cancer du poumon PD-L1⁺. L'accumulation tumorale des radioligands a été quantifiée par analyse des images TEP, ou par comptage *ex vivo* des tumeurs après sacrifice des animaux.

Ligand anti-PD-L1	Radio-nucléide	Modèle sc. cancer poumon humain	Accumulation tumorale maximale	Méthode mesure accumulation tumorale	Temps acquisition TEP p.i.	Référence
IgG1 C4	^{89}Zr	H1975	7,1 % ID/g TMR ~ 15	Comptage <i>ex vivo</i>	48 h	Truillet <i>et al.</i> , 2018
IgG1 Atezolizumab	^{89}Zr	H1975	4,0 % ID/g TMR ~ 4,8	Comptage <i>ex vivo</i>	48 h	Moroz <i>et al.</i> , 2018
IgG1 Atezolizumab	^{89}Zr	H460 ^a	4,4 % ID/g ^b TMR ~ 3,6	Analyse images TEP	96 h (4 jours)	Ehlerding <i>et al.</i> , 2019
IgG1 6E11	^{89}Zr	HCC827	5,1 % ID/g TMR ~ 5,5	Analyse images TEP	72 h	Christensen <i>et al.</i> , 2020
IgG4 SHR-1316	^{124}I	Modèle PDX CPNPC	TMR ~ 5,3	Analyse images TEP	24 h	Wen <i>et al.</i> , 2020
IgG4 REGN3504	^{89}Zr	H441 HCC827	52 % ID/g 39 % ID/g	Comptage <i>ex vivo</i>	144 h (6 jours)	Kelly <i>et al.</i> , 2021
Minibody C4 (80 kDa)	^{89}Zr	H1975	6,0 % ID/g TMR ~ 9,0	Comptage <i>ex vivo</i>	24 h	Wei <i>et al.</i> , 2020
scFv C4 (25 kDa)			2,0 % ID/g TMR ~ 5,2		2h30	
Adnectine BMS-986192 (10 kDa)	^{18}F	L2987	2,4 % ID/g TMR ~ 11	Analyse images TEP	2 h	Donnelly <i>et al.</i> , 2018
Adnectine BMS-986192 (10 kDa)	^{18}F	H292	1,3 % ID/g	Analyse images TEP	1 h	Stutvoet <i>et al.</i> , 2020
		H358	1,6 % ID/g			
Peptide WL12 (2 kDa)	^{18}F	H226	2,8 % ID/g	Comptage <i>ex vivo</i>	2 h	Lesniak <i>et al.</i> , 2019

^aL'expression de PD-L1 dans ce modèle a été induite par radiothérapie fractionnée. ^bLes valeurs de concentration en activité du radioligand dans la tumeur extraites de l'analyse des images TEP sont données en % ID/g, en considérant une masse volumique du tissu tumoral de 1 g/cm³. Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; PDX, « patient-derived xenograft » ; p.i., post-injection ; sc., sous-cutané ; scFv, « single-chain variable fragment » ; TMR, ratio de signal tumeur/muscle ; % ID/g, pourcentage de dose injectée par gramme de tissu ; ^{18}F , fluor-18 ; ^{89}Zr , zirconium-89 ; ^{124}I , iode-124.

4.3.2. Accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) dans les xénogreffes H1975

La clairance plus élevée du ^{89}Zr -IgG C4 mutant a permis d'obtenir les images TEP de meilleur contraste plus tôt en comparaison du ^{89}Zr -IgG C4 parental. L'accumulation tumorale du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) a ainsi culminé 24 h après son injection, avec des valeurs de C_{max} , TMR_{max} et TBR de $4,60 \pm 0,39$ % ID/cm³, $9,39 \pm 0,36$ et $2,20 \pm 1,21$, respectivement (Figure 32). L'élimination plus rapide du ^{89}Zr -IgG C4 mutant du sang ne s'est pas accompagnée d'une accumulation maximale réduite du radioligand dans la tumeur H1975, qui est restée similaire à celle du ^{89}Zr -IgG C4. Cela pourrait notamment s'expliquer par le fait que l'IgG C4 mutant possède toujours 2 sites de liaison à l'antigène (à l'opposé du fragment Fab C4 monovalent), maintenant ainsi une forte avidité pour la protéine PD-L1 tumorale. Par ailleurs, l'accumulation tumorale maximale du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) mesurée dans notre étude ($C_{\text{max}} \sim 4,6$ % ID/cm³) est proche de celle obtenue avec le ^{89}Zr -minibody C4 dans le même modèle préclinique de CPNPC H1975, également à 24 h post-injection ($C_{\text{max}} \sim 6,0$ % ID/g) (Wei *et al.*, 2020) (Tableau 13).

4.3.3. Accumulation du ^{89}Zr -Fab C4 dans les xénogreffes H1975

La courte demi-vie plasmatique du ^{89}Zr -Fab C4 a permis d'obtenir des images TEP avec un contraste tumeur/bruit optimal dès 4 h après injection (Figure 32). Cependant, l'accumulation absolue maximale du ^{89}Zr -Fab C4 dans les xénogreffes H1975 s'est révélée bien plus faible ($\sim 3,5$ fois plus faible) que celle des 2 ^{89}Zr -IgGs C4, avec une valeur de C_{max} de $1,36 \pm 0,11$ % ID/cm³, une valeur de TMR_{max} de $6,28 \pm 0,24$ et une valeur de TBR de $1,53 \pm 0,85$. Cette faible accumulation tumorale reste néanmoins proche des valeurs obtenues avec d'autres petits radioligands anti-PD-L1 dans diverses xénogreffes humaines de cancer du poumon PD-L1⁺, comme avec le ^{89}Zr -scFv C4 ($C_{\text{max}} \sim 2,0$ % ID/g), l'adnectine ^{18}F -BMS-986192 ($C_{\text{max}} \sim 1,3-2,4$ % ID/g), ou le petit peptide ^{18}F -WL12 ($C_{\text{max}} \sim 2,8$ % ID/g) (Donnelly *et al.*, 2018; Lesniak *et al.*, 2019; Stutvoet *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2020) (Tableau 13).

4.3.4. Intérêt translationnel de l'utilisation du ^{89}Zr -IgG C4 mutant et du ^{89}Zr -Fab C4

Les radioligands exhibant peu de bruit de fond global (lié à l'activité dans le sang), comme le ^{89}Zr -Fab C4 ou le ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q), facilitent la détection de faibles niveaux d'expression tumorale de PD-L1. Cet aspect pourrait se révéler particulièrement important pour l'imagerie TEP clinique de PD-L1, puisque les patients présentant des tumeurs avec seulement 1 % de cellules PD-L1⁺ (analyse IHC) répondent déjà mieux aux immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 que les patients avec des tumeurs PD-L1⁻ (Passiglia *et al.*, 2016).

La double mutation H310A/H435Q introduite sur l'IgG1 C4 pour éviter son recyclage par le FcRn murin possède également un fort intérêt translationnel, car le site de liaison des anticorps IgG1s au récepteur FcRn humain implique également les résidus conservés H310 et H435 (Burvenich *et al.*, 2016; Pyzik *et al.*, 2019). Cependant, il est à noter que les IgG1s humains se lient avec une plus forte affinité à pH 6,0 au FcRn murin qu'au FcRn humain (Roopenian and Akilesh, 2007). Par exemple, Burvenich *et al.* ont montré que la constante d'affinité de l'IgG1 humanisé hu3S193 ciblant l'antigène Lewis (mesurée par résonance de plasmons de surface) était de $K_D = 106$ nM pour le FcRn murin contre $K_D = 5595$ nM pour le FcRn humain (Burvenich *et*

al., 2016). Cette différence d'affinité était corrélée à une demi-vie plasmatique plus longue du hu3S193 radiomarqué à l'indium-111 (^{111}In) dans des souris exprimant le FcRn murin que dans des souris transgéniques exprimant le FcRn humain. Ainsi, le ^{89}Zr -IgG C4 WT présenterait peut-être une élimination plus rapide chez les humains que chez les souris, et sa différence de clairance avec le ^{89}Zr -IgG C4 mutant (H310A/H435Q) pourrait donc être moins marquée.

Compte tenu de sa PK rapide, le Fab C4 pourrait être radiomarqué au ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ min) et les patients pourraient être injectés avec le radioligand et imagés le même jour, selon des procédures cliniques similaires à celles actuellement appliquées pour les examens TEP au ^{18}F -fluorodésoxyglucose (FDG). De plus, l'imagerie TEP de PD-L1 avec le ^{18}F -Fab C4 permettrait de pouvoir éventuellement effectuer un autre examen TEP combiné directement le jour suivant, avec un radioligand ciblant une autre protéine d'intérêt (par ex. PD-1, CD8, EGFR). Cela permettrait de récolter un plus grand nombre d'informations sur le profil tumoral du patient, afin d'affiner la stratégie thérapeutique. Cette démarche a par exemple été suivie par Niemeijer *et al.*, qui ont effectué une double imagerie TEP, à la fois de PD-L1 et de PD-1, chez des patients souffrant de CPNPC. Les patients ont tout d'abord été injectés avec l'adnectine anti-PD-L1 ^{18}F -BMS-986192 et imagés le jour 1, puis ils ont été injectés avec l'anticorps anti-PD-1 ^{89}Zr -nivolumab le jour 2 et imagés 7 jours plus tard (Niemeijer *et al.*, 2018).

4.4. Comparaison de l'accumulation des radioligands C4 dans les xénogreffes humaines de CPNPC PD-L1⁺ et PD-L1⁻

Pour confirmer que l'accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) et du ^{89}Zr -Fab C4 dans les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 était bien spécifique à PD-L1, la biodistribution des 2 radioligands a aussi été évaluée dans le modèle préclinique de CPNPC A549 (PD-L1⁻). Cette expérience n'a en revanche pas été réalisée avec le ^{89}Zr -IgG C4 car son accumulation tumorale spécifique à PD-L1 a déjà été mis en évidence dans une précédente publication (Truillet *et al.*, 2018).

Comme observé sur les images TEP/TDM, le ^{89}Zr -IgG C4 mutant et le fragment ^{89}Zr -Fab C4 se sont bien accumulés dans les tumeurs H1975 PD-L1⁺, tandis que leur signal était quasiment indétectable dans les tumeurs A549 PD-L1⁻ (Figure 33). L'accumulation tumorale maximale des 2 radioligands C4 était ~ 2 fois plus importante dans les xénogreffes PD-L1⁺ que dans les xénogreffes PD-L1⁻, avec des valeurs de C_{max} de $4,60 \pm 0,39$ contre $2,27 \pm 0,30$ % ID/cm³ pour le ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) à 24 h post-injection, et de $1,36 \pm 0,11$ contre $0,65 \pm 0,27$ % ID/cm³ pour le ^{89}Zr -Fab C4 à 4 h post-injection (Figure 34). De même, les valeurs de TMR_{max} obtenues avec le ^{89}Zr -IgG C4 mutant étaient de $9,39 \pm 0,36$ pour la tumeur H1975 contre $4,56 \pm 0,40$ pour la tumeur A549 (à 24 h p.i.), et celles obtenues avec le ^{89}Zr -Fab C4 étaient de $6,28 \pm 0,24$ pour la tumeur H1975 contre $2,85 \pm 1,18$ pour la tumeur A549 (à 4 h p.i.). Ces résultats ont ainsi montré que les radioligands anti-PD-L1 ^{89}Zr -IgG C4 mutant et ^{89}Zr -Fab C4 ciblent spécifiquement les tumeurs PD-L1⁺.

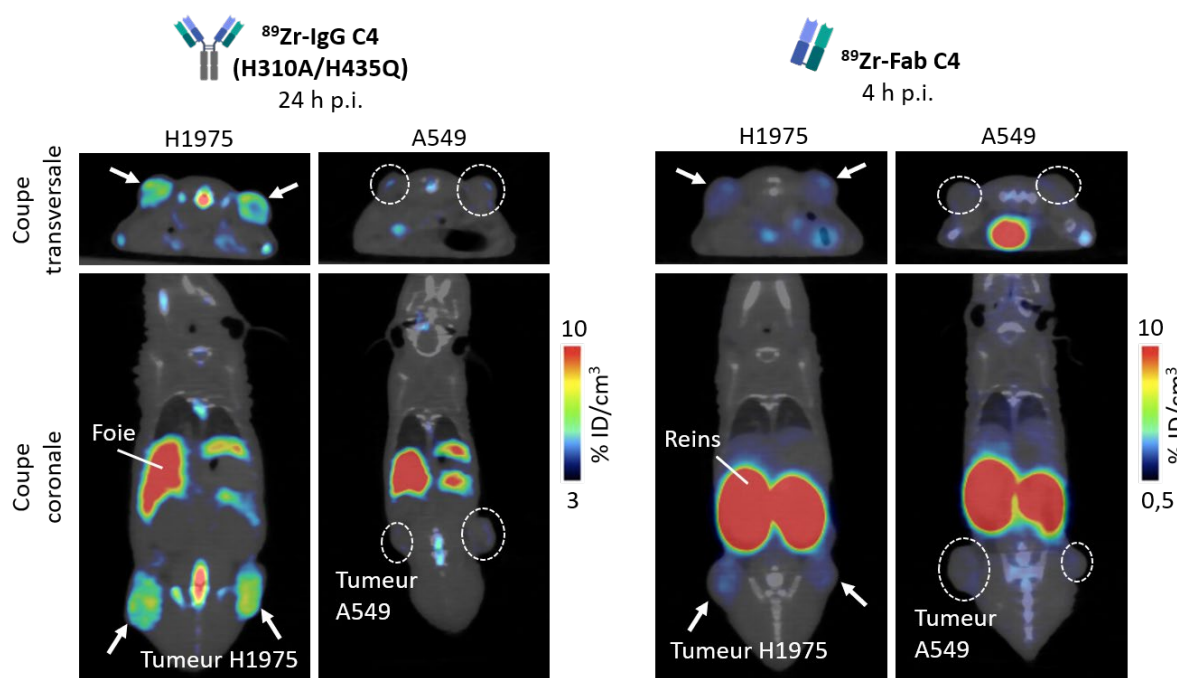


Figure 33. Imagerie TEP/TDM de PD-L1 avec les radioligands C4 dans les modèles précliniques de CPNPC humain PD-L1⁺ et PD-L1⁻. Images TEP/TDM représentatives (coupes transversales et coronales) de souris nues femelles portant les xénogreffes humaines sous-cutanées H1975 PD-L1⁺ (flèches blanches) et A549 PD-L1⁻ (cercles blancs en pointillés), après administration des radioligands C4. Les images ont été obtenues au temps d'acquisition optimal post-injection pour chacun des radioligands. Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; p.i., post-injection ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

La valeur d'accumulation non spécifique du ⁸⁹Zr-IgG C4 mutant dans la tumeur A549 PD-L1⁻ (~ 2 % ID/cm³) est similaire aux valeurs obtenues avec d'autres anticorps anti-PD-L1 radiomarqués au ⁸⁹Zr dans des xénogreffes humaines sous-cutanées de CPNPC n'exprimant pas (ou peu) PD-L1. Le ⁸⁹Zr-atezolizumab a ainsi montré une activité de 1,6 % ID/g dans le même modèle A549, tandis que l'IgG1 ⁸⁹Zr-6E11 s'est accumulé à hauteur de 1,4 % ID/g dans les xénogreffes H1703 exprimant peu PD-L1 (Ehlerding *et al.*, 2019; Christensen *et al.*, 2020). Cette petite accumulation non spécifique des anticorps radiomarqués peut s'expliquer par l'effet de perméabilité et de rétention améliorées (effet EPR pour « enhanced permeability and retention effect »). Cet effet apparaît lorsque la perméabilité anormale des vaisseaux sanguins tumoraux favorise l'extravasation des grosses molécules (comme les IgGs) au sein de la tumeur solide. En l'absence d'un système de drainage lymphatique tumoral fonctionnel, ces molécules s'accumulent alors dans la lésion (Thurber, Schmidt and Wittrup, 2008).

A part dans la tumeur, le ⁸⁹Zr-IgG C4 mutant et le ⁸⁹Zr-Fab C4 n'ont pas montré de différences significatives de biodistribution dans les autres tissus entre les souris implantées avec les xénogreffes H1975 (PD-L1⁺) et celles implantées avec les xénogreffes A549 (PD-L1⁻) (Figure 34). Une activité plus importante des 2 radioligands C4 dans le foie a néanmoins été observée dans le modèle A549, qui pourrait compenser leur absence d'accumulation spécifique dans la tumeur. Pour le ⁸⁹Zr-Fab C4, l'activité plus élevée dans le cœur (sang) obtenue dans le modèle A549 peut s'expliquer par la plus forte quantité totale de fragment d'anticorps administrée aux souris pour cette expérience (en raison d'une faible activité spécifique) en comparaison de l'expérience dans le modèle H1975 (1,33 contre 0,54 nmol) (Tableau 11).

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP dans des modèles de CPNPC humains

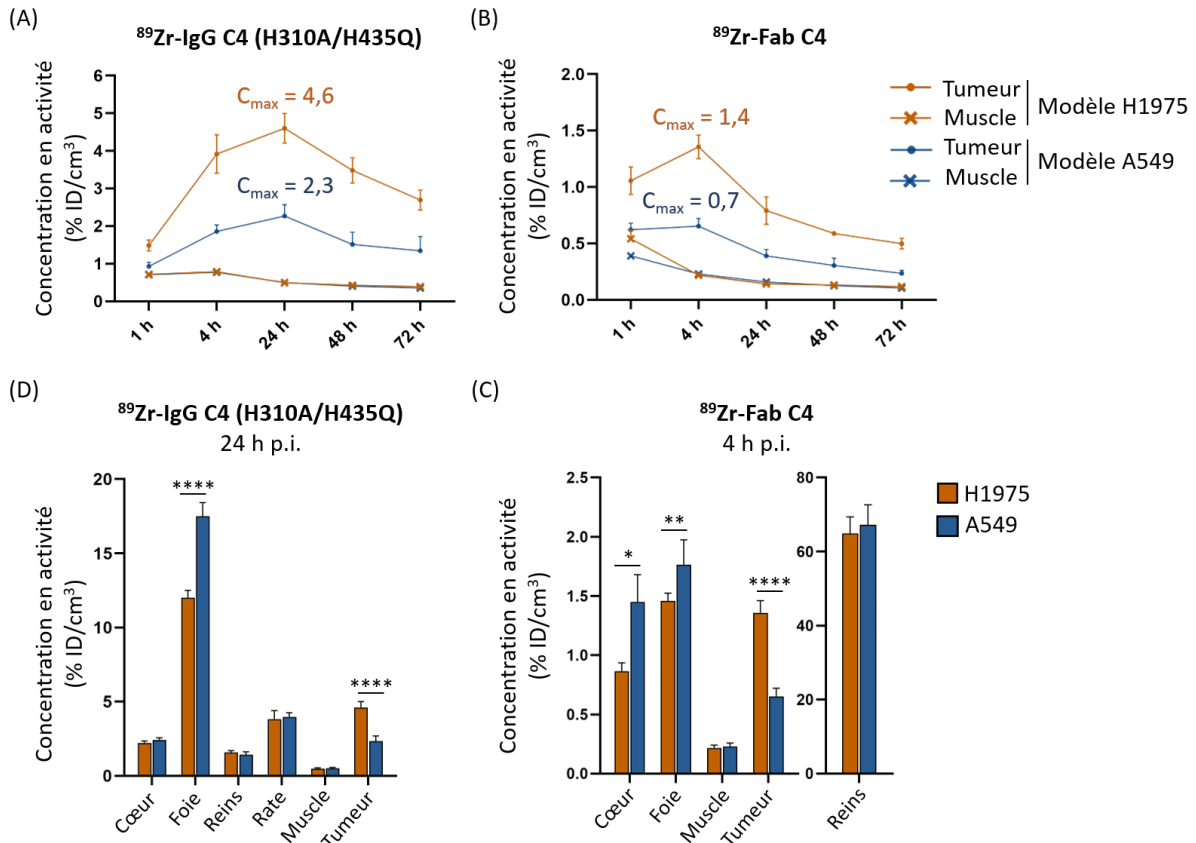


Figure 34. Biodistribution des radioligands C4 dans les xénogreffes humaines de CPNPC PD-L1⁺ et PD-L1⁻. (A) (B) Concentrations en activité (% ID/cm³) du ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) (A) et du ⁸⁹Zr-Fab C4 (B) dans la tumeur et dans le muscle déterminées à différents temps après injection des radioligands dans les souris portant les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺) ou A549 (PD-L1⁻). (C) (D) Concentrations en activité (% ID/cm³) du ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) (C) et du ⁸⁹Zr-Fab C4 (D) dans les organes sains et dans la tumeur obtenues au temps d'acquisition TEP/TDM optimal après injection du radioligand dans les souris portant les xénogreffes H1975 ou A549. Les données sont présentées comme la valeur moyenne ± l'écart-type (N = 5-6 souris par expérience). Les comparaisons statistiques ont été effectuées avec le test t de Student bilatéral non apparié (* p < 0,05, ** p < 0,01, **** p < 0,0001). Abréviations : C_{max}, concentration en activité maximale dans la tumeur ; CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; p.i., post-injection ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

4.5. Expériences de blocking avec les radioligands C4 dans les modèles précliniques de CPNPC PD-L1⁺ et PD-L1⁻

En plus des expériences d'imagerie TEP réalisées dans le modèle préclinique de CPNPC A549 (PD-L1⁻), des expériences de blocking ont été effectuées afin de valider que l'accumulation des 3 radioligands C4 dans les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺) est bien spécifique à PD-L1. Ces expériences de blocking ont consisté à co-administrer un excès molaire (20x) de ligand C4 froid, en plus du radioligand C4 en dose traceuse, aux souris portant les xénogreffes H1975 (et A549 seulement pour le ⁸⁹Zr-IgG C4 mutant) (Tableau 11). Des images TEP/TDM ont ensuite été obtenues au temps d'acquisition optimal associé à chaque radioligand

(Figure 35). Si l'accumulation tumorale du ligand C4 est bien médiée par PD-L1, le ligand C4 non radiomarqué en fort excès devrait venir saturer les sites de fixation PD-L1 au sein de la tumeur H1975 PD-L1⁺. Cela se traduirait alors par une diminution de l'accumulation du radioligand C4 dans la tumeur, celui-ci ne pouvant plus se fixer à PD-L1.

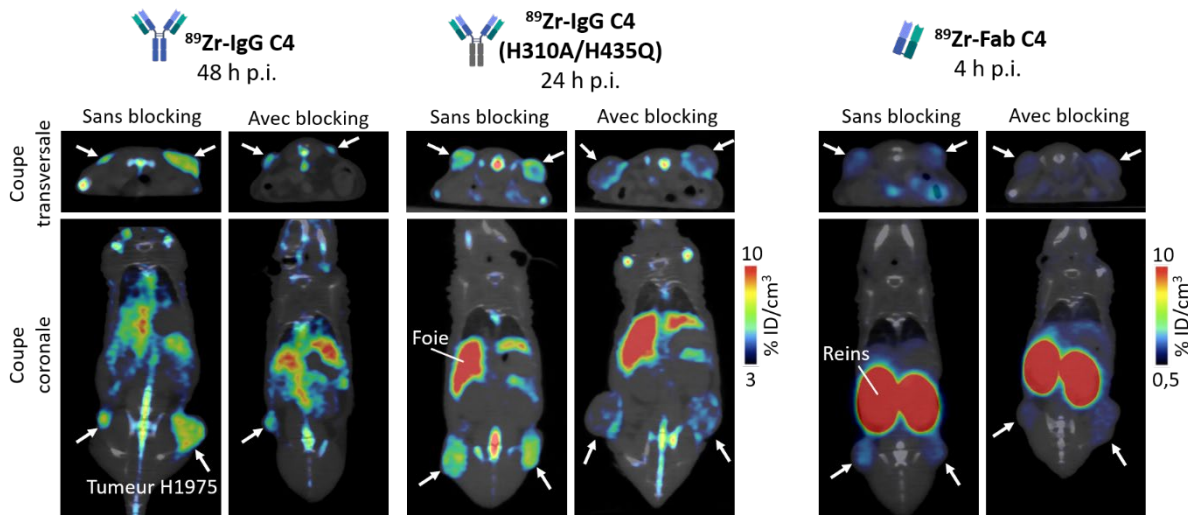


Figure 35. Imagerie TEP/TDM de PD-L1 avec les radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1⁺ avec ou sans blocking. Images TEP/TDM représentatives (coupes transversales et coronales) de souris nues femelles portant les xénogreffes humaines sous-cutanées H1975 PD-L1⁺ (flèches blanches), après administration des radioligands C4 avec ou sans co-injection d'une dose bloquante de ligand C4 froid. Les images ont été obtenues au temps d'acquisition optimal post-injection pour chacun des radioligands. Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; p.i., post-injection ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

L'accumulation du ⁸⁹Zr-IgG C4, du ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) et du ⁸⁹Zr-Fab C4 dans les xénogreffes H1975 a été effectivement réduite de 45 %, 53 % et 54 % respectivement, chez les souris co-injectées avec l'excès de ligand C4 froid, en comparaison des souris uniquement injectées avec la dose traceuse de radioligand C4 (Figure 36). Les valeurs d'activité dans la tumeur H1975 étaient ainsi de $4,85 \pm 0,61$ contre $2,17 \pm 0,55$ % ID/cm³ pour le ⁸⁹Zr-IgG C4 à 48 h post-injection, de $4,60 \pm 0,39$ contre $2,43 \pm 0,32$ % ID/cm³ pour le ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) à 24 h post-injection, et de $1,36 \pm 0,11$ contre $0,73 \pm 0,03$ % ID/cm³ pour le ⁸⁹Zr-Fab C4 à 4 h post-injection. Pour les 3 radioligands C4, le ratio de signal tumeur H1975/muscle était également significativement plus faible chez les souris ayant reçu la dose bloquante de ligand C4 froid (Figure 36). Ces résultats ont ainsi confirmé que les radioligands C4 ciblent bien les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺) *in vivo* de manière spécifique à PD-L1.

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP dans des modèles de CPNPC humains

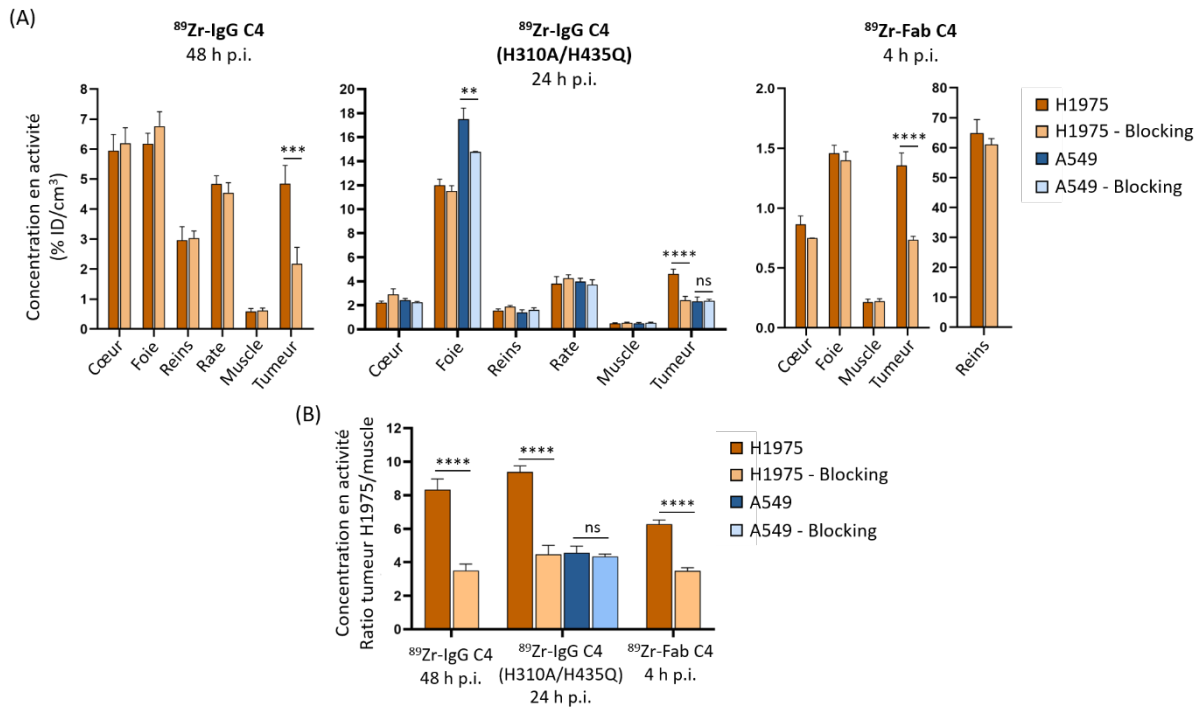


Figure 36. Expériences de blocking avec les radioligands C4 dans les modèles précliniques de CPNPC humain PD-L1⁺ et PD-L1⁻. (A) Concentrations en activité (% ID/cm³) des radioligands C4 dans les organes sains et dans la tumeur obtenues au temps d'acquisition TEP/TDM optimal après injection du radioligand C4 dans les souris portant les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺) et A549 (PD-L1⁻), avec ou sans co-injection d'une dose bloquante de ligand C4 froid. (B) Ratio de la concentration en activité dans la tumeur sur la concentration en activité dans le muscle, calculé pour les 3 radioligands C4 en condition ou non de blocking. Les données sont présentées comme la valeur moyenne \pm l'écart-type (N = 5-6 souris par expérience sans blocking, N = 3-4 souris par expérience avec blocking). Les comparaisons statistiques ont été effectuées avec le test t de Student bilatéral non apparié (** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001). Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; ns, non significatif ; p.i., post-injection ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

A l'opposé de la tumeur H1975 PD-L1⁺, aucune variation d'accumulation du ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) dans la tumeur A549 PD-L1⁻ n'a été détectée entre les souris ayant reçu ou non une dose bloquante de ligand froid, montrant bien qu'il s'agit ici d'une (petite) accumulation non spécifique (Figure 36). Par ailleurs, les valeurs d'activité du ⁸⁹Zr-IgG C4 mutant et du ⁸⁹Zr-Fab C4 dans la tumeur H1975 en condition de blocking étaient similaires aux valeurs d'activité obtenues avec ces mêmes radioligands dans la tumeur A549 (Figure 34) : $\sim 2,3-2,4$ % ID/cm³ à 24 h post-injection pour le ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q), et $\sim 0,7$ % ID/cm³ à 4 h post-injection pour le ⁸⁹Zr-Fab C4. Cela suggère que la co-injection de l'excès molaire (20x) de ligand C4 froid a permis la saturation presque complète des sites de fixation PD-L1 au sein des xénogreffes H1975.

La biodistribution des 3 radioligands C4 dans les tissus sains n'a quant à elle pas été impactée par la co-injection de ligand C4 froid, indiquant que l'accumulation des radioligands C4 dans ces tissus n'est pas liée à PD-L1 (Figure 36). Le même résultat a précédemment été obtenu lors d'une expérience de blocking avec le ⁸⁹Zr-IgG C4 dans le même modèle préclinique de CPNPC H1975 : aucune différence d'accumulation de l'anticorps radiomarqué dans les organes sains n'a

été observée à 48 h post-injection lorsque les souris ont été co-injectée ou non avec un excès molaire (30x) d'IgG C4 froid (Truillet *et al.*, 2018).

4.6. Accumulation des radioligands C4 dans les tissus sains dans le modèle préclinique de CPNPC PD-L1⁺

Chez les souris implantées avec les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺), l'accumulation des radioligands C4 dans les autres tissus que la tumeur H1975 était relativement faible, à l'exception du foie, des reins et de la rate (Figure 37).

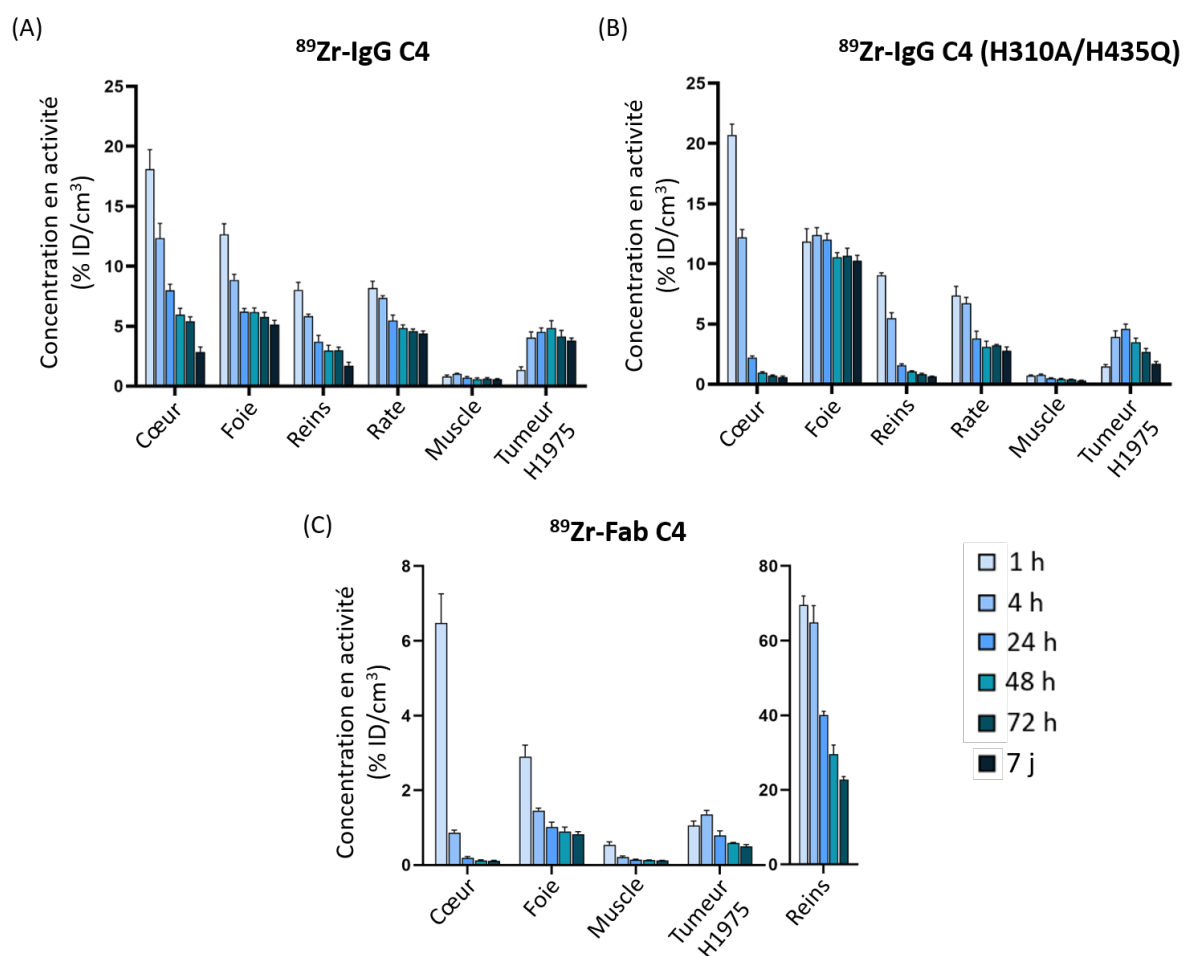


Figure 37. Biodistribution des radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC PD-L1⁺. (A) (B) (C) Concentrations en activité (% ID/cm³) du ⁸⁹Zr-IgG C4 (A), du ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) (B) et du ⁸⁹Zr-Fab C4 (C) dans les organes sains et dans la tumeur, déterminées à différents temps après injection des radioligands dans les souris portant les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺). Les données sont présentées comme la valeur moyenne ± l'écart-type (N = 6 souris par radioligand). Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

4.6.1. Accumulation des radioligands C4 dans le foie

Les 2 anticorps radiomarqués ^{89}Zr -IgG C4 et ^{89}Zr -IgG C4 mutant se sont accumulés dans le foie. L'activité du ^{89}Zr -IgG C4 dans cet organe a progressivement diminué au cours du temps, passant de $12,66 \pm 5,23$ % ID/cm³ à 1 h post-injection à $5,12 \pm 0,36$ % ID/cm³ à 7 jours post-injection (Figure 37). Étonnamment, cette réduction progressive du signal radioactif n'a pas été observée avec le ^{89}Zr -IgG C4 mutant. En effet, son activité dans le foie est toujours restée > 10 % ID/cm³, même au bout de 7 jours après injection (Figure 37). L'accumulation hépatique du ^{89}Zr -IgG C4 mutant sur la durée de l'expérience d'imagerie TEP/TDM longitudinale (du jour 0 au jour 7 post-injection) a ainsi été presque 2 fois plus importante que celle du ^{89}Zr -IgG C4, avec une valeur moyenne d'aire sous la courbe $C_{\text{foie}} (\% \text{ ID/cm}^3) = f(t)$ de $\text{AUC}_{0-7} = 112\,520$ % ID*h/cm³ pour le ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) contre seulement $\text{AUC}_{0-7} = 60\,355$ % ID*h/cm³ pour le ^{89}Zr -IgG C4. La rétention accrue du ^{89}Zr -IgG C4 mutant dans le foie en comparaison du ^{89}Zr -IgG C4 WT est d'ailleurs bien visible sur les images TEP/TDM (Figure 38). A l'opposé des 2 IgGs C4 radiomarqués, l'accumulation maximale du fragment ^{89}Zr -Fab C4 dans le foie (observée à 1 h post-injection) était < 3 % ID/cm³.

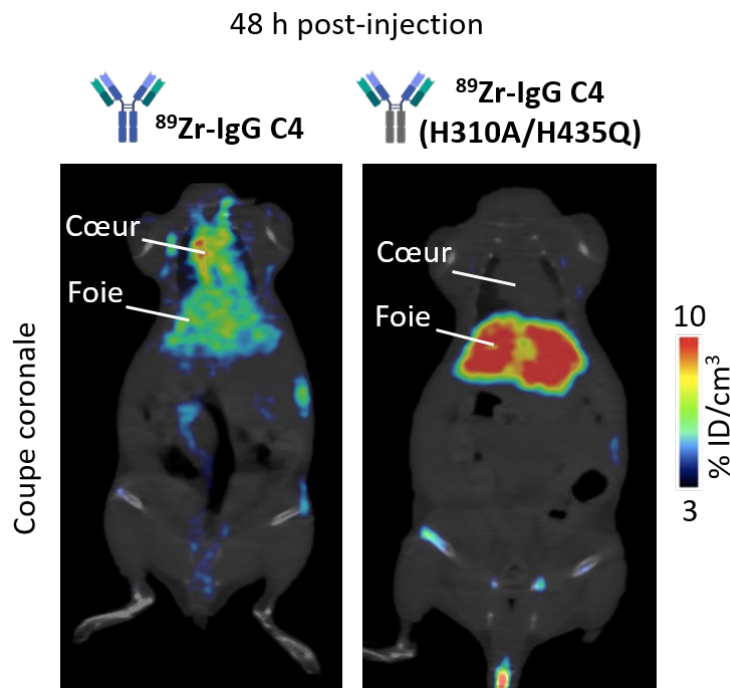


Figure 38. Accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 et du ^{89}Zr -IgG C4 mutant dans le foie. Images TEP/TDM représentatives (coupes coronales) montrant l'accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 et du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) dans le foie, 48 h après leur injection dans des souris nues femelles portant les xéno greffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺). Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ^{89}Zr , zirconium-89.

L'accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 et du ^{89}Zr -IgG C4 mutant dans le foie s'explique par le fait que les anticorps sont principalement éliminés de l'organisme par la voie hépatobiliaire. Par ailleurs, la rétention plus importante de l'activité du ^{89}Zr -IgG C4 mutant dans le foie en comparaison du ^{89}Zr -IgG C4 WT concorde avec les résultats précédemment observés dans d'autres études précliniques. Notamment, Kenanova *et al.* ont produit un fragment scFv-Fc

mutant (H310A/H435Q) ciblant l'antigène CEA. Après son injection dans des souris nues, le fragment anti-CEA ^{111}In -scFv-Fc (H310A/H435Q) s'est fortement accumulé dans le foie, avec une valeur d'activité de 24,9 % ID/g à 24 h post-injection (Kenanova *et al.*, 2007). Un autre exemple a été apporté par Jaggi *et al.*, qui ont injecté l'anticorps IgG1 anti-CD33 ^{111}In -HuM195 dans des souris immunocompétentes. En plus du radioligand, une forte dose d'IgG polyclonal humain a été co-administrée aux souris dans le but de moduler la PK *in vivo* du ^{111}In -HuM195. En effet, en se liant de manière compétitive au FcRn murin, ces IgGs ont permis d'inhiber l'interaction du ^{111}In -HuM195 avec celui-ci. L'étude *ex vivo* de la biodistribution du ^{111}In -HuM195 6 jours après son injection chez les souris a montré que son activité dans le sang était bien plus faible (~ 20 fois plus) chez les souris co-injectées avec l'IgG polyclonal humain (en comparaison des souris co-injectées avec une solution saline contrôle). Au contraire, l'activité dans le foie du ^{111}In -HuM195 était quant à elle significativement plus élevée (~ 2 fois plus) chez les souris traitées avec l'IgG polyclonal humain (Singh Jaggi *et al.*, 2007). Enfin, dans une autre étude, Yip *et al.* ont généré un anticorps IgG1, ciblant la glycoprotéine D du virus de l'herpès, avec la mutation H310Q. L'IgG1 mutant et l'IgG1 WT radiomarqués au ^{111}In ont été injectés dans des souris immunocompétentes. L'étude *ex vivo* de la biodistribution des radioligands a là encore révélé une élimination plus rapide du sang mais une rétention accrue dans le foie (~ 2 fois plus élevée à 24 h p.i.) du ^{111}In -IgG1 (H310Q) en comparaison du ^{111}In -IgG1 WT (Yip *et al.*, 2014). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que les IgGs radiomarqués captés par le foie sont normalement recyclés dans la circulation sanguine grâce au FcRn, exprimé dans de nombreuses cellules hépatiques (par ex. cellules endothéliales, cellules de Kupffer, hépatocytes) (Pyzik *et al.*, 2019). En l'absence d'interaction possible avec le FcRn, ces IgGs radiomarqués sont alors dégradés par les cellules hépatiques au lieu d'être relargués dans le sang, expliquant l'accumulation accrue des radionucléides résiduels (par ex. ^{111}In , ^{89}Zr) dans les lysosomes de ces cellules (Figure 39).

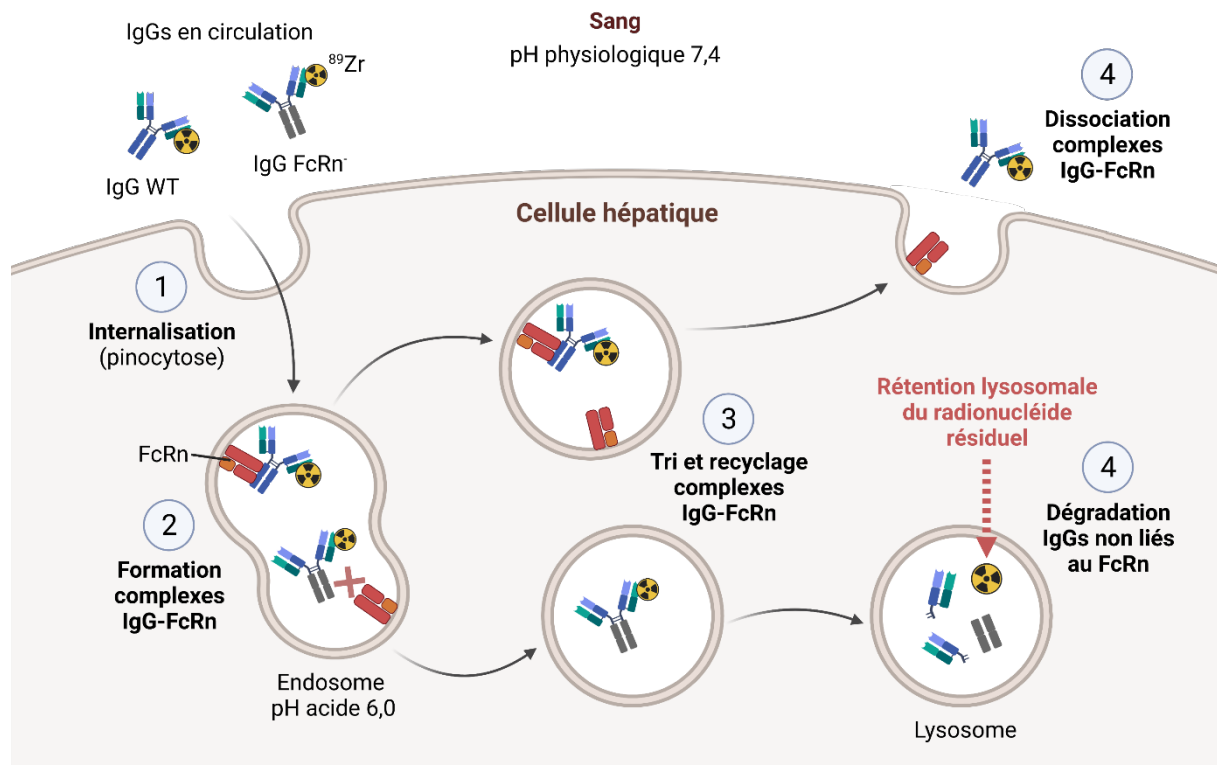


Figure 39. Catabolisme des IgGs radiomarqués dans le foie en l'absence de recyclage par le FcRn. Abréviations : FcRn, récepteur Fc néonatal ; WT, « wild-type » ; ^{89}Zr , zirconium-89.

4.6.2. Accumulation des radioligands C4 dans les reins

Comme clairement observé sur les images TEP/TDM (Figure 40), le fragment ^{89}Zr -Fab C4 s'est très fortement accumulé dans les reins, avec des concentrations en activité allant de $69,57 \pm 28,48$ % ID/cm³ (1 h post-injection) à $22,76 \pm 10,20$ % ID/cm³ (72 h post-injection) (Figure 37). L'accumulation rénale maximale du ^{89}Zr -IgG C4 et du ^{89}Zr -IgG C4 mutant obtenue à 1 h post-injection était 8 fois plus faible que celle du ^{89}Zr -Fab C4 (~ 8,5 % ID/cm³), et a ensuite diminué au cours du temps.

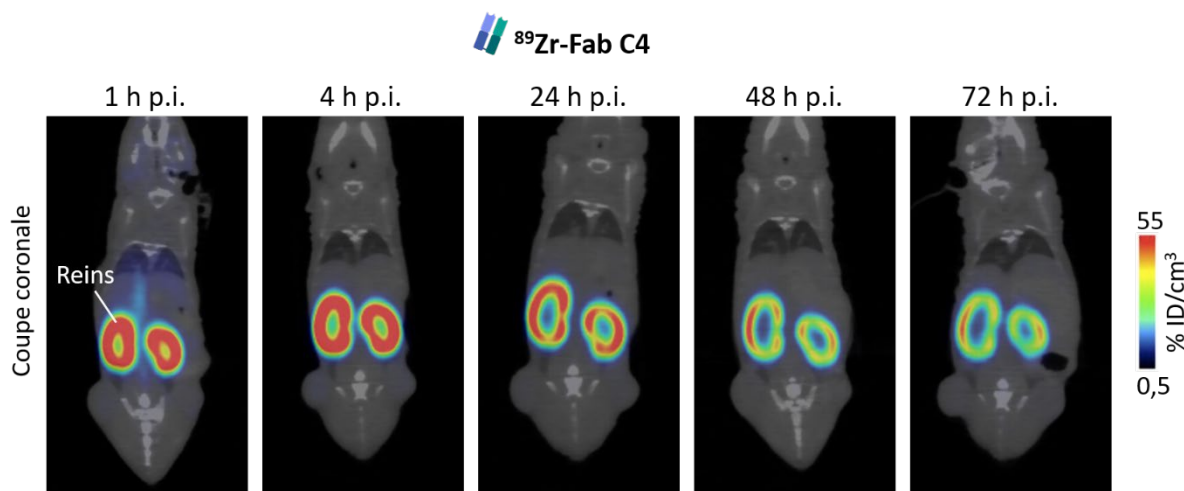


Figure 40. Accumulation du fragment ^{89}Zr -Fab C4 dans les reins. Images TEP/TDM représentatives (coupes coronales) montrant la rétention de l'activité associée au ^{89}Zr -Fab C4 dans les reins, après son injection dans des souris nudes femelles portant les xénogreffes humaines sous-cutanées de CPNPC H1975 (PD-L1⁺). Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; p.i., post-injection ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ^{89}Zr , zirconium-89.

Contrairement aux IgGs C4 radiomarqués, le fragment ^{89}Zr -Fab C4 était suffisamment petit (< 60 kDa) pour être majoritairement filtré par les reins, puis éliminé par excrétion urinaire (Xenaki, Oliveira and van Bergen in Henegouwen, 2017). Après filtration par le glomérule rénal, le fragment d'anticorps radiomarqué semble avoir été réabsorbé par les cellules tubulaires proximales, principalement situées dans le cortex rénal (partie externe du rein entourant la région médullaire et le pelvis) (Vegt *et al.*, 2010). Une fois le ^{89}Zr -Fab C4 catabolisé par ces cellules, le radionucléide ^{89}Zr résiduel est resté piégé dans leurs lysosomes. La rétention d'activité dans le cortex rénal était bien visible sur les images TEP/TDM, formant une couronne de signal autour des régions centrales (Figure 40). En raison de ce signal intense dans les reins, l'utilisation du ^{89}Zr -Fab C4 dans des études TEP précliniques pourrait empêcher la détection correcte d'organes cibles situés à proximité des reins (par ex. rate ou pancréas), ce qui a été le cas dans notre étude pour la rate. Une stratégie permettant de réduire l'accumulation rénale des petits radioligands consiste à co-infuser une solution d'acides aminés basiques lors de leur administration. Ces acides aminés chargés positivement se lient à la membrane des cellules tubulaires proximales chargée négativement, inhibant ainsi de manière compétitive la réabsorption du radioligand (Vegt *et al.*, 2010). Des études précliniques ont montré que l'accumulation rénale de fragments Fabs radiomarqués avec divers radionucléides était fortement diminuée lorsque les souris étaient administrées à plusieurs reprises (avant et après injection du radioligand) avec une solution de

lysine, sans que cela n'impacte le niveau d'activité dans les autres organes (Pimm and Gribben, 1994; Behr *et al.*, 1995). Par exemple, l'activité dans les reins associée à un fragment ^{111}In -Fab murin a été réduite de 90 % par 5 injections répétées de L-lysine (5 x 500 mg/kg) (Pimm and Gribben, 1994). Cette stratégie est également employée en clinique dans le cadre de la thérapie radionucléide par récepteur de peptide (PRRT). Ce type de thérapie utilise des peptides analogues de l'hormone somatostatine comme l'octréotide, radiomarqués avec l'émetteur β^- lutécium-177 (^{177}Lu), pour cibler les tumeurs neuroendocrines surexprimant le récepteur de la somatostatine. Les patients traités par PRRT sont administrés avec une solution d'acides aminés basiques (lysine + arginine) afin d'inhiber l'absorption rénale du radiopharmaceutique, et réduire ainsi la radiotoxicité associée au traitement (Rolleman *et al.*, 2003).

4.6.3. Accumulation des radioligands C4 dans la rate

L'accumulation maximale du ^{89}Zr -IgG C4 et du ^{89}Zr -IgG C4 mutant dans la rate a été observée 1 h après injection, avec des concentrations en activité de $8,17 \pm 3,38$ % ID/cm³ et $7,35 \pm 0,78$ %ID/cm³ respectivement, avant de diminuer progressivement (Figure 37). L'intense signal dans les reins associé au fragment ^{89}Zr -Fab C4 a empêché de détecter correctement la rate sur les images TEP/TDM, et l'accumulation du fragment d'anticorps radiomarqué dans cet organe n'a ainsi pas pu être quantifiée.

Les valeurs d'accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 dans le foie, les reins, la rate et le muscle déterminées ici à partir de l'analyse des images TEP/TDM sont relativement proches de celles précédemment mesurées par biodistribution *ex vivo* dans le même modèle de CPNPC H1975 (Truillet *et al.*, 2018)(Tableau 14).

Tableau 14. Comparaison de l'accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 dans les tissus sains quantifiée par analyse des images TEP/TDM ou par biodistribution *ex vivo*. Les valeurs de concentration en activité du ^{89}Zr -IgG C4 dans les organes sains, obtenues par l'analyse des images TEP/TDM (cette étude) ou par comptage *ex vivo* (Truillet *et al.*, 2018), 48 h après son injection dans les souris portant les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺), ont été comparées.

Organe	Accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 - 48 h post-injection	
	Analyse images TEP/TDM (% ID/cm ³)	Biodistribution <i>ex vivo</i> (% ID/g)
Foie	6,18 ± 0,35	8,2 ± 0,6
Reins	2,96 ± 0,46	4,3 ± 0,7
Rate	4,83 ± 0,27	6,5 ± 1,0
Muscle	0,59 ± 0,10	0,5 ± 0,1

Abréviations : TDM, tomодensitométrie ; TEP, tomographie par émission de positons ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; % ID/g, pourcentage de dose injectée par gramme de tissu ; ^{89}Zr , zirconium-89.

4.6.4. Accumulation des radioligands C4 dans les os

Le signal radioactif dans les os des souris visible sur les images TEP/TDM (par ex. au niveau de la colonne vertébrale sur la Figure 35) est dû à la dissociation des complexes ^{89}Zr -DFO *in vivo*, en raison du métabolisme rapide des souris et de l'activité des protéases. Le $^{89}\text{Zr}^{4+}$ ainsi libéré présente une forte affinité pour le phosphate des os et s'accumule alors de manière non-spécifique dans ceux-ci (Abou, Ku and Smith-Jones, 2011). Des chélateurs alternatifs au DFO, comme le DFO*, ont été développés afin d'améliorer la stabilité *in vivo* des complexes ^{89}Zr -DFO (Raavé *et al.*, 2019). Néanmoins, contrairement aux études TEP précliniques sur les souris, cette accumulation de $^{89}\text{Zr}^{4+}$ libre dans les os ne semble pas se retrouver dans les études TEP cliniques. En effet, dans une analyse rétrospective comparant la biodistribution de 4 anticorps radiomarqués au ^{89}Zr chez des patients souffrant de cancer, Bensch *et al.* ont souligné une faible accumulation des radioligands dans les tissus osseux compacts, comparable à celle dans les muscles (~ 1 % ID/kg à 4 jours post-injection) (Bensch, Smeenk, *et al.*, 2018). De même, ils ont observé dans une autre étude une accumulation peu élevée et stable de l'anticorps anti-PD-L1 ^{89}Zr -atezolizumab dans les os des patients (Bensch, van der Veen, *et al.*, 2018).

4.6.5. Impact de l'expression endogène de PD-L1 dans les tissus sains sur la biodistribution des radioligands anti-PD-L1

Compte tenu de son rôle physiologique dans la régulation de la réponse immunitaire, la protéine PD-L1 est exprimée par de nombreux tissus sains humains et murins. Des populations de cellules immunitaires PD-L1⁺ (par ex. lymphocytes T, macrophages, cellules dendritiques) sont notamment présentes dans les organes lymphoïdes primaires (par ex. thymus) et secondaires (par ex. rate, ganglions lymphatiques) (Sun, Mezzadra and Schumacher, 2018). PD-L1 a aussi été identifié comme un marqueur des tissus adipeux bruns (Ingram *et al.*, 2017). Par conséquent, les études TEP précliniques ayant utilisé des radioligands ciblant la protéine PD-L1 murine dans des souris immunocompétentes ont observé une accumulation spécifique importante du radioligand dans ces tissus sains mPD-L1⁺ (par ex. Hettich *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2018; Bridgwater *et al.*, 2020; Christensen *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020, voir aussi la Figure 8 avec le nanobody ^{18}F -B3 de Ingram *et al.*, 2017). De même, l'anticorps ^{89}Zr -atezolizumab et l'adnectine ^{18}F -BMS-986192, utilisés dans les premières études TEP cliniques de PD-L1, ont montré un fort signal dans les tissus lymphoïdes hPD-L1⁺ des patients (rate, ganglions lymphatiques, amygdales, moelle osseuse), et également au niveau des sites d'inflammation qui concentrent des cellules immunitaires hPD-L1⁺ (Bensch, Smeenk, *et al.*, 2018; Niemeijer *et al.*, 2018).

Dans le cadre de cette thèse, la biodistribution des radioligands C4 a été étudiée dans des souris nues immunodéficientes. Ces souris ne produisent pas de lymphocytes T, mais conservent cependant les autres populations immunitaires mPD-L1⁺ (par ex. lymphocytes B, macrophages, cellules dendritiques). Étonnamment, même s'ils reconnaissent à la fois la protéine PD-L1 humaine et murine, les radioligands C4 se sont faiblement accumulés dans les tissus sains mPD-L1⁺ des souris (par ex. rate, ganglions lymphatiques, tissus adipeux bruns). Par exemple, la concentration en activité du ^{89}Zr -IgG C4 dans la rate à 48 h post-injection était seulement de 4,8 % ID/cm³ dans cette étude et de 6,5 % ID/g dans l'étude de Truillet *et al.* (Truillet *et al.*, 2018) (Tableau 14). En opposition, l'accumulation dans la rate du ^{89}Zr -atezolizumab (anti-h/mPD-L1) était de 15,5 % ID/g à 48 h post-injection dans le même modèle préclinique de CPNPC H1975 (Moroz *et al.*, 2018). De même, l'accumulation dans la rate de l'IgG ^{89}Zr -6E11 (anti-h/mPD-L1) était de 14,4 % ID/g à 144 h post-injection dans le modèle préclinique de cancer du poumon

humain HCC827 (Christensen *et al.*, 2020). De plus, les expériences de blocking réalisées avec les 3 radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC H1975 ont montré que leur accumulation dans la rate ne semblait pas spécifique à PD-L1 (Figure 36). En effet, la co-injection d'une dose bloquante de ligand froid n'a eu aucune influence sur l'accumulation des radioligands dans cet organe, rejoignant les résultats précédemment observés avec le ^{89}Zr -IgG C4 (Truillet *et al.*, 2018).

Par ailleurs, l'IgG C4, le minibody C4 et le scFv C4 (dérivés de l'IgG C4), radiomarqués au ^{89}Zr , ont également été utilisés pour l'imagerie TEP de PD-L1 dans des souris immunocompétentes portant des tumeurs murines sous-cutanées de mélanome (B16-F10) (Moroz *et al.*, 2018; Truillet *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2020). Ces radioligands C4 anti-PD-L1 semblent s'être bien accumulés de manière spécifique dans les tumeurs B16-F10 mPD-L1⁺. En revanche, là encore de manière étonnante, ils ont montré une faible accumulation dans les tissus sains mPD-L1⁺. Par exemple, la concentration en activité dans la rate à 48 h post-injection était seulement de 6,1 % ID/g. Aucune différence notable de biodistribution des radioligands C4 dans les tissus sains murins n'a d'ailleurs été observée entre les souris immunocompétentes portant les tumeurs B16-F10 et les souris immunodéficientes portant les tumeurs H1975. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus dans d'autres études TEP précliniques de la littérature ayant utilisé des radioligands anti-mPD-L1 dans des souris immunocompétentes (Tableau 4, Tableau 5). Par exemple, dans le même modèle préclinique B16-F10, l'accumulation du ^{89}Zr -atezolizumab était de 20,0 % ID/g dans la rate à 48 h post-injection (Moroz *et al.*, 2018). De même, l'accumulation de l'IgG ^{64}Cu -10F.9G2 dans la rate, 48 h après son injection dans des souris immunocompétentes sans tumeurs, était de ~ 25 % ID/g (Hettich *et al.*, 2016).

En résumé, les résultats de biodistribution des différents radioligands dérivés de l'IgG C4, obtenus à la fois dans des souris immunodéficientes et immunocompétentes, ont montré que ces radioligands ne semblent pas interagir spécifiquement avec la protéine PD-L1 murine exprimée dans les tissus sains des souris, mais semblent cependant se lier à la protéine PD-L1 murine exprimée par les cellules tumorales B16-F10 (Moroz *et al.*, 2018; Truillet *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2020, et les résultats de notre étude). La raison à l'origine de cette différence d'interaction reste à élucider. L'affinité de l'IgG C4 pour la protéine PD-L1 murine recombinante a été mesurée comme relativement faible par interférométrie bio-couche, avec une valeur de $K_D = 60$ nM (Truillet *et al.*, 2018). A titre de comparaison, les valeurs de constante d'affinité pour la protéine PD-L1 murine calculées pour l'atezolizumab, l'IgG 6E11 et l'IgG 10F.9G2 étaient de $K_D = 0,13$ nM, $K_D = 0,23$ nM et $K_D = 0,32$ nM, respectivement (Lesniak *et al.*, 2016; Bridgwater *et al.*, 2020; Christensen *et al.*, 2020). Il serait intéressant d'étudier l'éventuelle différence d'affinité de l'IgG C4 pour la protéine PD-L1 murine exprimée soit à la surface de cellules immunitaires (par ex. lymphocytes T), soit à la surface de cellules tumorales (par ex. B16-F10).

Conclusion

Les 3 radioligands C4 anti-PD-L1 – ^{89}Zr -IgG C4, ^{89}Zr -IgG C4 mutant et ^{89}Zr -Fab C4 – ont été capables de détecter efficacement et spécifiquement l'expression de PD-L1 dans les xéngreffes humaines de CPNPC H1975. L'utilisation du fragment Fab dérivé de l'IgG C4, ou du double mutant IgG C4 (H310A/H435Q) privé d'interaction avec le mFcRn, a effectivement permis d'obtenir une PK plus rapide *in vivo* en comparaison de l'anticorps parental. Les images TEP avec le meilleur contraste tumeur PD-L1⁺/bruit ont ainsi été obtenues à des temps plus courts post-injection avec le ^{89}Zr -Fab C4 et le ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q). Par ailleurs, les 3 radioligands C4 ont montré des profils de biodistribution bien différents dans les organes sains,

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP dans des modèles de CPNPC humains

avec une élimination principale des 2 ^{89}Zr -IgGs C4 via le foie tandis que le signal du fragment ^{89}Zr -Fab C4 s'est essentiellement accumulé dans les reins. La rétention plus importante de l'activité du ^{89}Zr -IgG C4 mutant dans le foie en comparaison du ^{89}Zr -IgG WT a souligné l'influence du mFcRn sur la biodistribution des IgGs chez les souris. Le foie est ainsi apparu comme un site majeur de leur catabolisme en l'absence de protection par le mFcRn.

Il serait maintenant intéressant d'évaluer la capacité des radioligands C4 à distinguer différents niveaux d'expression tumorale de PD-L1 *in vivo*. Cela pourrait par exemple être réalisé en étudiant la biodistribution des radioligands dans le modèle préclinique de CPNPC CAL-12T, qui exprime PD-L1 plus fortement que le modèle H1975 (du moins *in vitro* d'après l'analyse WB, Figure 12). En plus des études TEP sur des modèles de tumeurs implantées dans des souris immunodéficientes/immunocompétentes, l'utilisation de souris humanisées génétiquement modifiées pour exprimer la protéine PD-L1 humaine serait particulièrement pertinente pour la translation clinique des radioligands C4. Ces souris possèdent un système immunitaire complet fonctionnel, mais exprimant la protéine PD-L1 humaine au lieu de la protéine PD-L1 murine (De La Rochere *et al.*, 2018). L'influence de l'expression de hPD-L1 dans les tissus sains sur la PK et le profil de biodistribution des radioligands C4 pourrait alors être évaluée. Un tel modèle de souris humanisées, exprimant à la fois les protéines PD-1 et PD-L1 humaines, a été utilisé dans une récente étude (Kelly *et al.*, 2021). Les souris humanisées ont été implantées avec des tumeurs murines de cancer du côlon, génétiquement modifiées pour être hPD-L1⁺. L'imagerie TEP des souris avec l'IgG anti-hPD-L1 ^{89}Zr -REGN3504 a permis de mettre en évidence l'impact de l'expression de hPD-L1 dans les tissus normaux sur l'accumulation tumorale du radioligand. La dose d'IgG REGN3504 administrée (chaud + froid) a dû être optimisée afin de minimiser l'accumulation spécifique du radioligand dans les organes sains riches en PD-L1 (par ex. la rate), et permettre ainsi une visualisation adéquate des tumeurs hPD-L1⁺. En augmentant la dose totale de REGN3504, les sites de fixation hPD-L1 dans la rate ont pu être saturés, améliorant alors l'exposition systémique du ^{89}Zr -REGN3504 et son accumulation dans les tumeurs hPD-L1⁺. Le même principe d'optimisation de dose devrait s'appliquer pour la translation clinique des radioligands anti-hPD-L1 comme les radioligands C4. L'activité spécifique du radiopharmaceutique administré devrait être choisie de manière à permettre une visualisation correcte des lésions tumorale hPD-L1⁺, sans toutefois entraîner une réponse pharmacologique non désirée pour un radiopharmaceutique à visée diagnostique.

Références

- Abou, D.S., Ku, T. and Smith-Jones, P.M. (2011) 'In vivo biodistribution and accumulation of ^{89}Zr in mice', *Nuclear Medicine and Biology*, 38(5), pp. 675–681. doi:10.1016/j.nucmedbio.2010.12.011.
- 'Attune™ NxT Flow Cytometer Basic Training.' (2018) *Thermo Fischer Scientific* [Preprint].
- Behr, T.M. *et al.* (1995) 'Reduction of the Renal Uptake of Radiolabeled Monoclonal Antibody Fragments by Cationic Amino Acids and Their Derivatives', *Cancer Research*, 55, pp. 3825–3834.
- Bensch, F., van der Veen, E.L., *et al.* (2018) ' ^{89}Zr -atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer', *Nature Medicine*, 24(12), pp. 1852–1858. doi:10.1038/s41591-018-0255-8.
- Bensch, F., Smeenk, M.M., *et al.* (2018) 'Comparative biodistribution analysis across four different ^{89}Zr -monoclonal antibody tracers—The first step towards an imaging warehouse', *Theranostics*, 8(16), pp. 4295–4304. doi:10.7150/thno.26370.
- Bouleau, A., Lebon, V. and Truillet, C. (2021) 'PET imaging of immune checkpoint proteins in oncology', *Pharmacology & Therapeutics*, 222, p. 107786. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107786.
- Bridgwater, C. *et al.* (2020) ' ^{89}Zr -Labeled Anti-PD-L1 Antibody Fragment for Evaluating *In Vivo* PD-L1 Levels in Melanoma Mouse Model', *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, p. cbr.2019.3056. doi:10.1089/cbr.2019.3056.
- Bridoux, J. *et al.* (2020) 'Anti-Human PD-L1 Nanobody for Immuno-PET Imaging: Validation of a Conjugation Strategy for Clinical Translation', *Biomolecules*, 10(10), p. 1388. doi:10.3390/biom10101388.
- Buckle, T. and Van Leeuwen, F.W.B. (2010) 'Validation of intratracheal instillation of lung tumour cells in mice using single photon emission computed tomography/computed tomography imaging', *Laboratory Animals*, 44(1), pp. 40–45. doi:10.1258/la.2009.009030.
- Burvenich, I.J.G. *et al.* (2016) 'Cross-species analysis of Fc engineered anti-Lewis-Y human IgG1 variants in human neonatal receptor transgenic mice reveal importance of S254 and Y436 in binding human neonatal Fc receptor', *mAbs*, 8(4), pp. 775–786. doi:10.1080/19420862.2016.1156285.
- Chatterjee, S. *et al.* (2017) 'Rapid PD-L1 detection in tumors with PET using a highly specific peptide', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(1), pp. 258–263. doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.156.
- Chen, N. *et al.* (2014) 'The effect of the neonatal Fc receptor on human IgG biodistribution in mice', *mAbs*, 6(2), pp. 502–508. doi:10.4161/mabs.27765.
- Christensen, C. *et al.* (2020) 'Quantitative PET imaging of PD-L1 expression in xenograft and syngeneic tumour models using a site-specifically labelled PD-L1 antibody', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 47(5), pp. 1302–1313. doi:10.1007/s00259-019-04646-4.
- De La Rochere, P. *et al.* (2018) 'Humanized Mice for the Study of Immuno-Oncology', *Trends in Immunology*, 39(9), pp. 748–763. doi:10.1016/j.it.2018.07.001.
- De Silva, R.A. *et al.* (2018) 'Peptide-Based ^{68}Ga -PET Radiotracer for Imaging PD-L1 Expression in Cancer', *Molecular Pharmaceutics*, 15(9), pp. 3946–3952. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00399.
- De Vos, J. *et al.* (2013) 'Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical *in vivo* molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target', *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13(8), pp. 1149–1160. doi:10.1517/14712598.2013.800478.

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP
dans des modèles de CPNPC humains

- Dilworth, J.R. and Pascu, S.I. (2018) 'The chemistry of PET imaging with zirconium-89', *Chemical Society Reviews*, 47(8), pp. 2554–2571. doi:10.1039/C7CS00014F.
- Donnelly, D.J. *et al.* (2018) 'Synthesis and Biologic Evaluation of a Novel ¹⁸F-Labeled Adnectin as a PET Radioligand for Imaging PD-L1 Expression', *Journal of Nuclear Medicine*, 59(3), pp. 529–535. doi:10.2967/jnumed.117.199596.
- Ehlerding, E.B. *et al.* (2019) 'Noninvasive Imaging and Quantification of Radiotherapy-Induced PD-L1 Upregulation with ⁸⁹Zr-Df-Atezolizumab', *Bioconjugate Chemistry*, 30(5), pp. 1434–1441. doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00178.
- Fluorescence Spectra Viewer* (no date). Available at: <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer> (Accessed: 17 September 2021).
- Giesen, D. *et al.* (2020) 'Probody therapeutic design of 89Zr-CX-072 promotes accumulation in PD-L1 expressing tumors compared to normal murine lymphoid tissue', *Clinical Cancer Research*, p. clincanres.3137.2019. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-3137.
- Girgis, M.D. *et al.* (2011) 'Targeting CEA in Pancreas Cancer Xenografts with a Mutated scFv-Fc Antibody Fragment', *EJNMMI Research*, 1(1), p. 24. doi:10.1186/2191-219X-1-24.
- González Trotter, D.E. *et al.* (2017) 'In Vivo Imaging of the Programmed Death Ligand 1 by ¹⁸F PET', *Journal of Nuclear Medicine*, 58(11), pp. 1852–1857. doi:10.2967/jnumed.117.191718.
- Hettich, M. *et al.* (2016) 'High-Resolution PET Imaging with Therapeutic Antibody-based PD-1/PD-L1 Checkpoint Tracers', *Theranostics*, 6(10), pp. 1629–1640. doi:10.7150/thno.15253.
- Hornick, J.L. *et al.* (2000) 'Single Amino Acid Substitution in the Fc Region of Chimeric TNT-3 Antibody Accelerates Clearance and Improves Immunoscintigraphy of Solid Tumors', *Journal of Nuclear Medicine*, 41, pp. 355–362.
- Huisman, M. *et al.* (2020) 'Quantification of PD-L1 expression with [¹⁸F]BMS-986192 PET/CT in patients with advanced stage non-small-cell lung cancer', *Journal of Nuclear Medicine*, p. jnumed.119.240895. doi:10.2967/jnumed.119.240895.
- Ingram, J.R. *et al.* (2017) 'PD-L1 is an activation-independent marker of brown adipocytes', *Nature Communications*, 8(1), p. 647. doi:10.1038/s41467-017-00799-8.
- Jagoda, E.M. *et al.* (2019) 'Immuno-PET Imaging of the Programmed Cell Death-1 Ligand (PD-L1) Using a Zirconium-89 Labeled Therapeutic Antibody, Avelumab', *Molecular Imaging*, 18, p. 153601211982998. doi:10.1177/1536012119829986.
- Kellar, A., Egan, C. and Morris, D. (2015) 'Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications', *BioMed Research International*, 2015, pp. 1–17. doi:10.1155/2015/621324.
- Kelly, M.P. *et al.* (2021) 'Preclinical PET imaging with the novel human antibody ⁸⁹Zr-DFO-REGN3504 sensitively detects PD-L1 expression in tumors and normal tissues', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(1), p. e002025. doi:10.1136/jitc-2020-002025.
- Kenanova, V. *et al.* (2005) 'Tailoring the Pharmacokinetics and Positron Emission Tomography Imaging Properties of Anti-Carcinoembryonic Antigen Single-Chain Fv-Fc Antibody Fragments', *Cancer Research*, 65(2), pp. 622–631.

- Kenanova, V. *et al.* (2007) ‘Radioiodinated versus Radiometal-Labeled Anti-Carcinoembryonic Antigen Single-Chain Fv-Fc Antibody Fragments: Optimal Pharmacokinetics for Therapy’, *Cancer Research*, 67(2), pp. 718–726. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0454.
- Kikuchi, M. *et al.* (2017) ‘Preclinical immunoPET/CT imaging using Zr-89-labeled anti-PD-L1 monoclonal antibody for assessing radiation-induced PD-L1 upregulation in head and neck cancer and melanoma’, *OncoImmunology*, p. e1329071. doi:10.1080/2162402X.2017.1329071.
- Kim, J.-K. *et al.* (1999) ‘Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor, FcRn’, *Eur. J. Immunol.*, 29, pp. 2819–2825.
- Kumar, D. *et al.* (2019) ‘Peptide-based PET quantifies target engagement of PD-L1 therapeutics’, *Journal of Clinical Investigation*, 129(2), pp. 616–630. doi:10.1172/JCI122216.
- Lesniak, W.G. *et al.* (2016) ‘PD-L1 Detection in Tumors Using [⁶⁴ Cu]Atezolizumab with PET’, *Bioconjugate Chemistry*, 27(9), pp. 2103–2110. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00348.
- Lesniak, W.G. *et al.* (2019) ‘Development of [¹⁸ F]FPy-WL12 as a PD-L1 Specific PET Imaging Peptide’, *Molecular Imaging*, 18, p. 153601211985218. doi:10.1177/1536012119852189.
- Li, D. *et al.* (2018) ‘Immuno-PET Imaging of ⁸⁹ Zr Labeled Anti-PD-L1 Domain Antibody’, *Molecular Pharmaceutics*, 15(4), pp. 1674–1681. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00062.
- Li, M. *et al.* (2020) ‘In vivo characterization of PD-L1 expression in breast cancer by immuno-PET with ⁸⁹Zr-labeled avelumab’, *American Journal of Translational Research*, 12(5), pp. 1862–1872.
- Lipovsek, D. (2011) ‘Adnectins: engineered target-binding protein therapeutics’, *Protein Engineering Design and Selection*, 24(1–2), pp. 3–9. doi:10.1093/protein/gzq097.
- Liu, H. *et al.* (2019) ‘Discovery of low-molecular weight anti-PD-L1 peptides for cancer immunotherapy’, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), p. 270. doi:10.1186/s40425-019-0705-y.
- Lv, G. *et al.* (2020) ‘PET Imaging of Tumor PD-L1 Expression with a Highly Specific Nonblocking Single-Domain Antibody’, *Journal of Nuclear Medicine*, 61(1), pp. 117–122. doi:10.2967/jnumed.119.226712.
- Mathew, J., Sankar, P. and Varacallo, M. (2021) *Physiology, Blood Plasma*. StatPearls Publishing. Treasure Island (FL).
- Maute, R.L. *et al.* (2015) ‘Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), pp. E6506–E6514. doi:10.1073/pnas.1519623112.
- Mayer, A.T. *et al.* (2017) ‘Practical Immuno-PET Radiotracer Design Considerations for Human Immune Checkpoint Imaging’, *Journal of Nuclear Medicine*, 58(4), pp. 538–546. doi:10.2967/jnumed.116.177659.
- Moroz, A. *et al.* (2018) ‘A Preclinical Assessment of ⁸⁹ Zr-atezolizumab Identifies a Requirement for Carrier Added Formulations Not Observed with ⁸⁹ Zr-C4’, *Bioconjugate Chemistry*, 29(10), pp. 3476–3482. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00632.
- Natarajan, A. *et al.* (2019) ‘A Novel Engineered Small Protein for Positron Emission Tomography Imaging of Human Programmed Death Ligand-1: Validation in Mouse Models and Human Cancer Tissues’, *Clinical Cancer Research*, 25(6), pp. 1774–1785. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1871.
- Niemeijer, A.N. *et al.* (2018) ‘Whole body PD-1 and PD-L1 positron emission tomography in patients with non-small-cell lung cancer’, *Nature Communications*, 9(1), p. 4664. doi:10.1038/s41467-018-07131-y.

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP
dans des modèles de CPNPC humains

- Olafsen, T. *et al.* (2009) ‘Recombinant Anti-CD20 Antibody Fragments for Small-Animal PET Imaging of B-Cell Lymphomas’, *Journal of Nuclear Medicine*, 50(9), pp. 1500–1508. doi:10.2967/jnumed.108.060426.
- Passiglia, F. *et al.* (2016) ‘PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis’, *Oncotarget*, 7(15), pp. 19738–19747. doi:10.18632/oncotarget.7582.
- Pimm, M.V. and Gribben, S.J. (1994) ‘Prevention of renal tubule re-absorption of radiometal (indium-111) labelled Fab fragment of a monoclonal antibody in mice by systemic administration of lysine’, *European Journal of Nuclear Medicine*, 21(7), pp. 663–665. doi:10.1007/BF00285590.
- Pyzik, M. *et al.* (2019) ‘The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer?’, *Frontiers in Immunology*, 10, p. 1540. doi:10.3389/fimmu.2019.01540.
- Qin, S. *et al.* (2021) ‘A preclinical study: correlation between PD-L1 PET imaging and the prediction of therapy efficacy of MC38 tumor with ⁶⁸ Ga-labeled PD-L1 targeted nanobody’, *Aging* [Preprint]. doi:10.18632/aging.202981.
- Raavé, R. *et al.* (2019) ‘Direct comparison of the in vitro and in vivo stability of DFO, DFO* and DFOcyclo* for 89Zr-immunoPET’, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 46(9), pp. 1966–1977. doi:10.1007/s00259-019-04343-2.
- Reichard, A. and Asosingh, K. (2019) ‘Best Practices for Preparing a Single Cell Suspension from Solid Tissues for Flow Cytometry’, *Cytometry Part A*, 95(2), pp. 219–226. doi:10.1002/cyto.a.23690.
- Ren, J. *et al.* (2021) ‘PET imaging facilitates antibody screening for synergistic radioimmunotherapy with a ¹⁷⁷ Lu-labeled αPD-L1 antibody’, *Theranostics*, 11(1), pp. 304–315. doi:10.7150/thno.45540.
- Rolleman, E.J. *et al.* (2003) ‘Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine’, 30(1), p. 7.
- Roopenian, D.C. and Akilesh, S. (2007) ‘FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age’, *Nature Reviews Immunology*, 7(9), pp. 715–725. doi:10.1038/nri2155.
- Rubins, D.J. *et al.* (2021) ‘In Vivo Evaluation and Dosimetry Estimate for a High Affinity Affibody PET Tracer Targeting PD-L1’, *Molecular Imaging and Biology*, 23(2), pp. 241–249. doi:10.1007/s11307-020-01544-2.
- Schroeder, H.W. and Cavacini, L. (2010) ‘Structure and function of immunoglobulins’, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), pp. S41–S52. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- Singh Jaggi, J. *et al.* (2007) ‘Improved tumor imaging and therapy via i.v. IgG-mediated time-sequential modulation of neonatal Fc receptor’, *Journal of Clinical Investigation*, 117(9), pp. 2422–2430. doi:10.1172/JCI32226.
- Stutvoet, T.S. *et al.* (2020) ‘Molecular imaging of PD-L1 expression and dynamics with the adnectin-based PET tracer ¹⁸ F-BMS-986192’, *Journal of Nuclear Medicine*, p. jnumed.119.241364. doi:10.2967/jnumed.119.241364.
- Sun, C., Mezzadra, R. and Schumacher, T.N. (2018) ‘Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint’, *Immunity*, 48(3), pp. 434–452. doi:10.1016/j.immuni.2018.03.014.
- Thurber, G.M., Schmidt, M.M. and Wittrup, K.D. (2008) ‘Antibody tumor penetration: Transport opposed by systemic and antigen-mediated clearance’, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(12), pp. 1421–1434. doi:10.1016/j.addr.2008.04.012.

- Tobias, R. *et al.* (2021) ‘Biomolecular Binding Kinetics Assays on the Octet® Platform.’, *Sartorius* [Preprint].
- Truillet, C. *et al.* (2018) ‘Imaging PD-L1 Expression with ImmunoPET’, *Bioconjugate Chemistry*, 29(1), pp. 96–103. doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00631.
- Vegt, E. *et al.* (2010) ‘Renal Toxicity of Radiolabeled Peptides and Antibody Fragments: Mechanisms, Impact on Radionuclide Therapy, and Strategies for Prevention’, *Journal of Nuclear Medicine*, 51(7), pp. 1049–1058. doi:10.2967/jnumed.110.075101.
- Vento, J. *et al.* (2019) ‘PD-L1 detection using 89Zr-atezolizumab immuno-PET in renal cell carcinoma tumorgrafts from a patient with favorable nivolumab response’, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), p. 144. doi:10.1186/s40425-019-0607-z.
- Vivier, D. *et al.* (2019) ‘The Impact of FcγRI Binding on Immuno-PET’, *Journal of Nuclear Medicine*, 60(8), pp. 1174–1182. doi:10.2967/jnumed.118.223636.
- Vosjan, M.J.W.D. *et al.* (2010) ‘Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine’, *Nature Protocols*, 5(4), pp. 739–743. doi:10.1038/nprot.2010.13.
- van de Watering, F.C.J. *et al.* (2014) ‘Zirconium-89 Labeled Antibodies: A New Tool for Molecular Imaging in Cancer Patients’, *BioMed Research International*, 2014, pp. 1–13. doi:10.1155/2014/203601.
- Wei, J. *et al.* (2020) ‘An Analysis of Isoclonal Antibody Formats Suggests a Role for Measuring PD-L1 with Low Molecular Weight PET Radiotracers’, *Molecular Imaging and Biology*, 22(6), pp. 1553–1561. doi:10.1007/s11307-020-01527-3.
- Wen, X. *et al.* (2020) ‘Immuno-SPECT/PET imaging with radioiodinated anti-PD-L1 antibody to evaluate PD-L1 expression in immune-competent murine models and PDX model of lung adenocarcinoma’, *Nuclear Medicine and Biology*, 86–87, pp. 44–51. doi:10.1016/j.nucmedbio.2020.05.006.
- Xenaki, K.T., Oliveira, S. and van Bergen en Henegouwen, P.M.P. (2017) ‘Antibody or Antibody Fragments: Implications for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Solid Tumors’, *Frontiers in Immunology*, 8, p. 1287. doi:10.3389/fimmu.2017.01287.
- Xu, M. *et al.* (2018) ‘Preclinical Study of a Fully Human Anti-PD-L1 Antibody as a Theranostic Agent for Cancer Immunotherapy’, *Molecular Pharmaceutics*, 15(10), pp. 4426–4433. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00371.
- Yip, V. *et al.* (2014) ‘Quantitative cumulative biodistribution of antibodies in mice: Effect of modulating binding affinity to the neonatal Fc receptor’, *mAbs*, 6(3), pp. 689–696. doi:10.4161/mabs.28254.
- Zhao, J. *et al.* (2020) ‘Concurrent Injection of Unlabeled Antibodies Allows Positron Emission Tomography Imaging of Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in an Orthotopic Pancreatic Tumor Model’, *ACS Omega*, 5(15), pp. 8474–8482. doi:10.1021/acsomega.9b03731.

I. Etude de la PK et de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1 par imagerie TEP
dans des modèles de CPNPC humains

II. Etude dosimétrique des radioligands C4 utilisés pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1

Introduction

Le corps humain est exposé en permanence à de faibles doses de radioactivité d'origine naturelle ou artificielle (IRSN, 2021) (Figure 41). Les examens de diagnostic médical (par ex. radiographie, scanographie, TEP) sont la principale source de radioactivité artificielle. Lorsque les rayonnements ionisants pénètrent l'organisme, ils interagissent avec la matière et lui transfèrent de l'énergie. Ce transfert d'énergie peut être à l'origine de divers dommages biologiques, survenant plus ou moins longtemps après l'irradiation.

La dosimétrie consiste à déterminer et à quantifier la distribution spatiale et temporelle des doses d'énergie déposées par les rayonnements ionisants dans les différents tissus de l'organisme (Stabin, 2008). La dosimétrie interne concerne plus précisément l'estimation des doses reçues lors d'une irradiation interne au corps humain. La dosimétrie interne se révèle essentielle en médecine nucléaire lors de l'administration d'un radiopharmaceutique à usage diagnostic ou thérapeutique. En effet, une estimation fiable des doses délivrées aux tissus permet d'administrer la dose de radiopharmaceutique optimale pour l'application visée, tout en garantissant la meilleure radioprotection possible au patient.

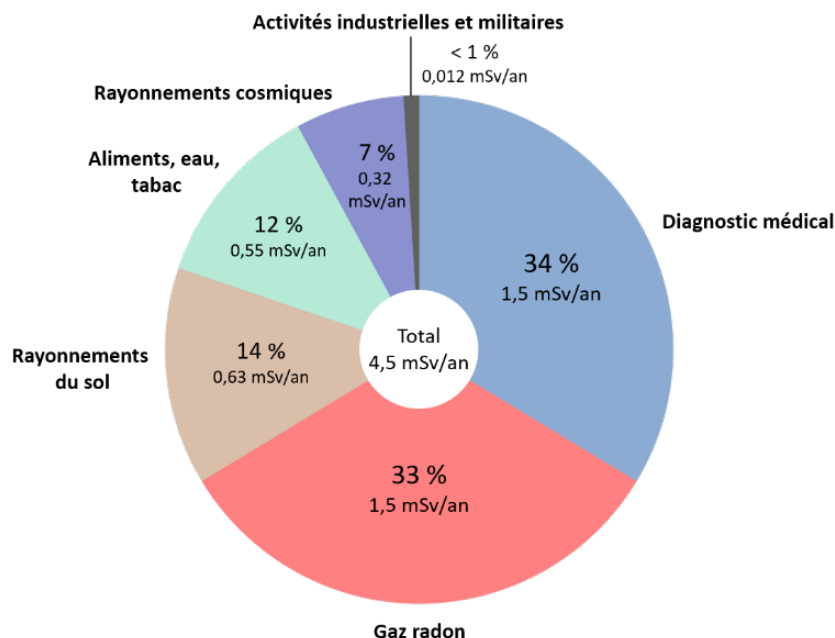


Figure 41. Exposition moyenne d'un individu en France métropolitaine aux diverses sources de radioactivité naturelles et artificielles. Pour chaque source, la contribution à l'exposition totale (%) et la valeur moyenne de dose efficace reçue par an (mSv/an) sont indiquées (IRSN, 2021).

Comme présenté dans le Chapitre I, les ligands C4 anti-PD-L1 – IgG C4, IgG C4 (H310A/H310Q) et Fab C4 – ont été radiomarqués au ^{89}Zr pour détecter par imagerie TEP l'expression de PD-L1 dans des modèles précliniques de CPNPC humain. Les 3 radioligands C4 ont montré une PK et un profil de biodistribution *in vivo* bien distincts. Notamment, le ^{89}Zr -IgG C4 mutant et le fragment ^{89}Zr -Fab C4 ont été rapidement éliminés du sang par rapport au ^{89}Zr -IgG C4 WT. Cependant, le ^{89}Zr -IgG C4 mutant a été significativement retenu dans le foie, tandis que le ^{89}Zr -Fab C4 s'est accumulé de manière importante dans les reins. Une analyse dosimétrique s'est donc révélée intéressante afin d'estimer les doses absorbées par les tissus pour les 3 radioligands C4, et de pouvoir ainsi évaluer les potentiels risques de radiotoxicité associés à leur utilisation clinique. Les doses absorbées par les organes murins ont été calculées à partir de la biodistribution des radioligands C4 dans les souris portant les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺) déterminée par imagerie TEP/TDM longitudinale (Chapitre 1, Annexe 2). Ces données de biodistribution murines ont également servi à extrapoler les doses absorbées par les organes humains.

La partie 1 de ce chapitre introduit quelques définitions et notions essentielles relatives à la dosimétrie. La démarche et les équations permettant le calcul de dose interne sont ensuite exposées dans la partie 2. Les parties 3 et 4 sont quant à elles dédiées à la présentation des résultats des analyses dosimétriques murine et humaine effectuées.

1. Concepts et définitions de base

1.1. Définitions de la dose absorbée, de la dose équivalente et de la dose efficace

La dose absorbée $D(r_t)$ dans un tissu cible r_t correspond à l'énergie moyenne déposée par une radiation émise d'un tissu source r_s par unité de masse du tissu cible (Stabin, 2008 ; Bolch *et al.*, 2009) (Figure 42). L'unité standard de la dose absorbée dans le système international d'unités (SI) est le gray (Gy), avec $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1}$. L'unité rad (acronyme de « radiation absorbed dose ») est également encore employée, avec $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$.

La dose équivalente est une quantité de radioprotection définie dans la Publication 103 de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) (ICRP, 2007). La dose équivalente permet de prendre en compte la capacité plus ou moins importante des différents types de radiation à provoquer des dommages biologiques dans le tissu cible (Figure 42). L'unité standard (SI) de la dose équivalente est le sievert (Sv), avec $1 \text{ Sv} = 1 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1}$. L'unité rem est également utilisée, avec $1 \text{ Sv} = 100 \text{ rem}$. La dose équivalente $H(r_T, T_D)$ reçue par le tissu cible r_T pendant la période d'irradiation T_D s'exprime par :

$$H(r_T, T_D) = \sum_R w_R \times D_R(r_T, T_D) \quad (1)$$

Avec :

- $D_R(r_T, T_D)$ dose moyenne (Gy) déposée dans le tissu cible r_T par la radiation de type R pendant la période d'irradiation T_D .

- w_R facteur de pondération pour la radiation de type R (sans dimension). Les valeurs de w_R actuellement recommandées par la CIPR sont de 1 pour les photons, les électrons et les positons (la valeur de dose équivalente est ainsi égale à celle de dose absorbée pour ces particules), et de 20 pour les particules α (ICRP, 2007).

La dose efficace est une autre quantité de radioprotection, également définie dans la Publication 103 de la CIPR (ICRP, 2007). La dose efficace permet d'évaluer le risque d'apparition de dommages biologiques aléatoires induits par l'irradiation au niveau du corps entier, en prenant en compte la radiosensibilité plus ou moins importante des différents tissus de l'organisme (Figure 42). L'unité standard (SI) de la dose efficace est aussi le sievert (Sv). La dose efficace $E(T_D)$ d'un individu de référence (homme ou femme) pendant la période d'irradiation T_D s'exprime par :

$$E(T_D) = \sum_T w_T \left(\frac{H(r_T, T_D)^{m\grave{a}le} + H(r_T, T_D)^{femelle}}{2} \right) \quad (2)$$

Avec :

- $H(r_T, T_D)^{m\grave{a}le}$ et $H(r_T, T_D)^{femelle}$ doses équivalentes du tissu cible r_T pendant la période d'irradiation T_D pour les individus de référence mâle et femelle. Ces individus de référence sont définis pour plusieurs tranches d'âge dans la publication 89 de la CIPR (ICRP, 2002). Par exemple, les individus de référence mâle et femelle adultes (20-50 ans) mesurent 176 cm et 163 cm et pèsent 73 kg et 60 kg, respectivement.
- w_T facteur de pondération représentant la contribution individuelle de chaque tissu au risque d'apparition globale d'effets biologiques aléatoires après l'irradiation. Les valeurs de w_T spécifiées par la CIPR pour les tissus considérés comme radiosensibles sont indiquées dans le Tableau 15 (ICRP, 2007).

Tableau 15. Valeurs du facteur de pondération tissulaire w_T recommandées par la CIPR pour le calcul de dose efficace. Il s'agit de valeurs moyennes pour un individu humain, valables pour les 2 sexes et tous les âges (ICRP, 2007).

Tissu	w_T	$\sum_t w_T$
Moelle osseuse active, colon, poumon, estomac, reste des tissus ^a	0,12	0,72
Gonades (ovaires ou testicules)	0.08	0.08
Vessie, œsophage, foie, thyroïde	0.04	0.16
Endoste (enveloppe interne des os), cerveau, glandes salivaires, peau	0.01	0.04
Total		1

^aLe reste des tissus (comptant pour une seule entité) comprend les glandes surrénales, les voies respiratoires supérieures, la vésicule biliaire, le cœur, les reins, les ganglions lymphatiques, les muscles squelettiques, la muqueuse buccale, le pancréas, la prostate (hommes), l'intestin grêle, la rate, le thymus, l'utérus et le col de l'utérus (femmes).

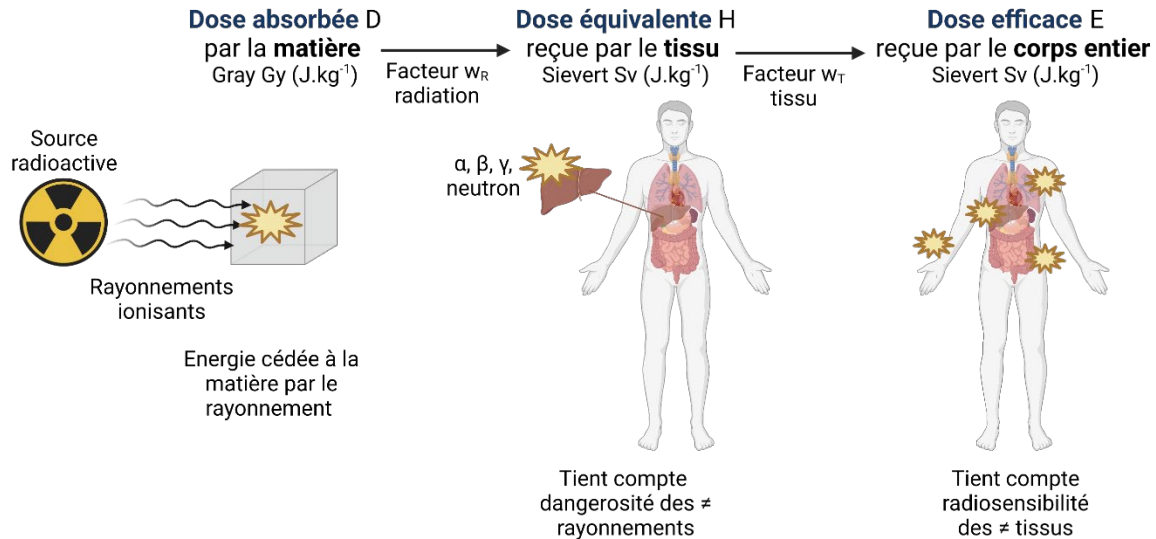


Figure 42. Relation entre la dose absorbée, la dose équivalente et la dose efficace.

1.2. Effets biologiques des rayonnements ionisants

Lors d'une irradiation, le transfert d'énergie des rayonnements ionisants aux tissus biologiques (ionisation) peut entraîner des lésions cellulaires, notamment au niveau de l'ADN nucléaire (ICRP, 2007 ; Stabin, 2008). Le rayonnement ionisant peut entraîner la rupture (radiolyse) des molécules d'ADN de manière directe, ou de manière indirecte par radiolyse des molécules d'eau présentes dans la cellule, générant des radicaux libres nocifs pour l'ADN. Les lésions engendrées se traduisent par des cassures simple brin ou double-brin, des altérations de bases nucléiques, ainsi que des pontages ADN-ADN ou ADN-protéines (ICRP, 2007 ; Stabin, 2008). Les dommages subis par l'ADN peuvent être naturellement éliminés par les mécanismes de réparation intracellulaires, maintenant ainsi la survie cellulaire normale (réparation fidèle). Cependant, si les lésions sont trop graves ou trop nombreuses, leur réparation est impossible et la cellule meurt alors par nécrose. Enfin, l'ADN endommagé peut être réparé mais de manière incorrecte (réparation fautive), avec l'introduction de mutations dans la séquence nucléotidique. L'apparition de ces mutations génétiques peut conduire à la mort programmée par apoptose des cellules anormales, ou bien à leur destruction par le système immunitaire. En revanche, si les cellules mutées ne sont pas éliminées et continuent leur division, elles pourront alors être à l'origine de cancers et d'anomalies héréditaires (ICRP, 2007 ; Stabin, 2008).

Les effets biologiques induits par une irradiation de l'organisme peuvent être classés en deux grandes catégories : les effets déterministes (ou obligatoires) et les effets aléatoires (ou stochastiques) (ICRP, 2007).

- *Les effets déterministes.* Les effets biologiques déterministes sont systématiquement déclenchés lorsque l'organisme est soumis à une forte dose de radioactivité, supérieure à un seuil donné (autour de 100 mSv). Au-delà de ce seuil, la sévérité des effets déterministes augmente avec la dose reçue. Ces effets sont généralement observés quelques heures à quelques semaines après l'irradiation et sont principalement liés à la mort cellulaire et à l'endommagement sévère des tissus. Cela se traduit par des atteintes

cliniquement détectables, comme un rougissement de la peau (érythème) et des brûlures cutanées, des nausées, vomissements et diarrhées, une alopecie, ou encore une destruction des cellules de la moelle osseuse entraînant une chute du taux de lymphocytes mesuré dans le sang.

- *Les effets aléatoires.* Contrairement aux effets déterministes, les effets biologiques aléatoires peuvent apparaître quelle que soit la dose de radioactivité reçue avec la même gravité (pas de notion de seuil), mais leur probabilité d'apparition augmente avec la valeur de la dose. Ces effets aléatoires surviennent généralement plusieurs années après l'irradiation et sont dus aux mutations génétiques engendrées par les rayonnements ionisants. Ils incluent l'émergence de cancers chez les individus irradiés (mutations des cellules somatiques), ou bien la transmission d'anomalies héréditaires à leur descendance (mutations des cellules germinales).

La sévérité des dommages biologiques induits par les rayonnements ionisants dépend de nombreux facteurs, comme du type de rayonnement, du débit de dose reçue, de la durée de l'irradiation ou de la radiosensibilité du tissu. Les cellules peu différenciées et à vitesse de prolifération rapide, comme les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse ou les spermatozoïdes, sont particulièrement radiosensibles (Stabin, 2008).

Au vu des risques biologiques associés à une exposition excessive aux rayonnements ionisants, des règles de radioprotection ont été instaurées par les autorités. Ainsi, l'Union Européenne a adopté en 2013 la Directive 2013/59/EURATOM, établissant les normes de base relatives à la radioprotection de la population et des travailleurs (Directive 2013/59/EURATOM, 2013) (Tableau 16). Cette directive a été transposée dans le droit français, au sein du Code du travail, du Code de la santé publique et du Code de l'environnement. Les travailleurs exposés aux rayonnements ionisants sont classés par l'employeur en deux catégories, selon l'article R. 4451-57 du Code du travail. Les travailleurs de catégorie A sont susceptibles de recevoir, sur 12 mois consécutifs, une dose efficace supérieure à 6 mSv, et/ou une dose équivalente supérieure à 150 mSv pour la peau et/ou les extrémités. Les travailleurs de catégorie B sont susceptibles de recevoir, sur 12 mois consécutifs, une dose efficace supérieure à 1 mSv, et/ou une dose équivalente supérieure à 15 mSv pour le cristallin et/ou à 50 mSv pour la peau et/ou les extrémités. Les contraintes de dose réglementaires ne concernent pas les patients exposés aux rayonnements ionisants dans le cadre d'actes de médecine nucléaire à visées diagnostique ou thérapeutique. Elles s'appliquent en revanche aux personnes participant au soutien et au réconfort des patients, ainsi qu'aux volontaires participant à des études médicales.

Tableau 16. Limites de dose annuelles pour le public et les travailleurs fixées par l'Union Européenne dans le cadre de la Directive 2013/59/EURATOM.

	Corps entier (dose efficace)	Extrémités Mains, pieds, avant-bras, chevilles (dose équivalente)	Peau (dose équivalente sur toute surface de 1 cm ²)	Cristallin (dose équivalente)
Public	1 mSv	/	50 mSv	15 mSv
Travailleurs	20 mSv (en moyenne sur 5 ans)	500 mSv	500 mSv	20 mSv (en moyenne sur 5 ans), < 50 mSv par an

1.3. Intérêt de la dosimétrie interne en médecine nucléaire

L'absence de limite réglementaire pour les doses reçues en médecine nucléaire se justifie par un rapport bénéfice/risque positif sur la santé et la survie du patient (ICRP, 2007). Néanmoins, une attention particulière doit être accordée à la justification de la procédure médicale et à son optimisation, afin de fournir la meilleure radioprotection possible au patient (Directive 2013/59/EURATOM, 2013). Dans cette optique, une estimation fiable des doses délivrées aux tissus après injection du radiopharmaceutique se révèle essentielle. Pour les examens de médecine nucléaire à visée diagnostique, l'analyse de dosimétrie interne permet d'évaluer le risque d'apparition d'effets biologiques aléatoires chez les patients irradiés (dose efficace). Dans le cadre de la radiothérapie interne vectorisée, qui repose sur l'injection d'un ligand ciblant les cellules tumorales radiomarqué avec un émetteur β^- ou α , l'objectif est de délivrer la dose maximale aux tumeurs cibles tout en respectant les limites de radiotoxicité dans les organes sains (Loke *et al.*, 2011). Une analyse dosimétrique réalisée avant le traitement permet d'optimiser sa planification afin de remplir au mieux cet objectif.

Les établissements français effectuant des examens diagnostiques de médecine nucléaire relèvent obligatoirement chaque année les doses de radioactivité délivrées à des groupes de patients types, pour les actes les plus courants et/ou les plus irradiants. Ces valeurs de doses sont ensuite comparées aux niveaux de référence diagnostique (NRD) fixés par l'Autorité de Sécurité Nucléaire (ASN). En cas de valeurs supérieures aux NRD en vigueur, la démarche d'optimisation de la radioprotection des patients doit être renforcée. La Publication 106 de la CIPR fournit également des valeurs de dose injectée, de dose absorbée aux organes et de dose efficace, estimées à partir de modèles biocinétiques, pour la plupart des radiopharmaceutiques utilisés dans les procédures diagnostiques courantes (ICRP, 2008).

En amont de la dosimétrie clinique, la dosimétrie interne préclinique reste une étape nécessaire dans l'évaluation de nouveaux radiopharmaceutiques, notamment avec le développement actuel croissant d'agents théranostiques pour des applications à la fois de diagnostic et de radiothérapie. Les études dosimétriques dans des modèles animaux fournissent une première caractérisation des doses absorbées dans les organes, et de la relation entre ces doses et les effets biologiques observés. Ces données permettent ensuite d'estimer par extrapolation les doses attendues chez l'homme, afin de prédire au mieux la radiotoxicité et/ou l'efficacité thérapeutique du radiopharmaceutique avant les premières phases cliniques (Stabin, 2008).

2. Calcul de dose interne

2.1. Equations pour le calcul de dose absorbée

Les équations permettant de calculer les doses absorbées par les tissus suite à une irradiation interne de l'organisme sont présentées selon le formalisme défini par le comité du MIRd (« Medical Internal Radiation Dose ») de la Société de Médecine Nucléaire et d'Imagerie Moléculaire (SNMMI). Le Tableau 17 regroupe les différents paramètres et quantités utilisés dans le Pamphlet 21 du MIRd pour le calcul de dose (Bolch *et al.*, 2009).

Les équations présentées ci-après reposent sur les hypothèses suivantes :

- ✓ Chaque tissu possède une composition chimique et une densité homogènes.
- ✓ La radioactivité est distribuée de manière uniforme au sein de chaque tissu source.
- ✓ La radioactivité est déposée de manière uniforme au sein de chaque tissu cible, de sorte que la dose absorbée moyenne donne une représentation fidèle de la dose absorbée par le tissu cible.

Tableau 17. Paramètres et quantités utilisés pour le calcul de dose interne selon le formalisme défini dans le Pamphlet 21 du MIRL.

Quantité ou paramètre	Symbole	Unité
Tissu (région) source	r_S	
Tissu (région) cible	r_T	
Masse du tissu cible	$M(r_T, t)$	kg
Période d'irradiation	T_D	s
Débit de dose absorbée dans le tissu cible	$\dot{D}(r_T, t)$	Gy.s ⁻¹
Dose absorbée dans le tissu cible	$D(r_T, T_D)$	Gy
Dose équivalente dans le tissu cible	$H(r_T, T_D)$	Sv
Facteur de pondération pour la radiation de type R	w_R	Sans unité
Dose efficace	$E(T_D)$	Sv
Facteur de pondération tissulaire	w_T	Sans unité
Activité administrée	A_0	Bq
Activité dans le tissu source	$A(r_S, t)$	Bq
Activité cumulée dans le tissu source	$\tilde{A}(r_S, T_D)$	Bq.s
Coefficient d'activité intégré en fonction du temps (temps de résidence)	$\tilde{a}(r_S, T_D)$	s
Nombre de i ^{ème} transitions nucléaires par désintégration	Y_i	Bq ⁻¹ .s ⁻¹
Energie moyenne de la i ^{ème} transition nucléaire	E_i	J
Energie moyenne de la i ^{ème} transition par désintégration	Δ_i	J.Bq ⁻¹ .s ⁻¹
Fraction absorbée	$\phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)$	Sans unité
Fraction absorbée spécifique	$\Phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)$	kg ⁻¹
Débit de dose dans le tissu cible par unité d'activité dans le tissu source (facteur S)	$S(r_T \leftarrow r_S, t)$	Gy.Bq ⁻¹ .s ⁻¹

Le débit de dose absorbée moyen $\dot{D}(r_T, t)$ (Gy.s⁻¹) dans le tissu cible d'une radiation émise par un radioligand présent dans le tissu source à l'instant t est donné par :

$$\dot{D}(r_T, t) = \frac{A(r_S, t) \times \sum_i Y_i E_i \phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)}{M(r_T, t)} = A(r_S, t) \times \sum_i \Delta_i \Phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t) \quad (3)$$

$$\Phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t) = \frac{\phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)}{M(r_T, t)}$$

Avec :

- $A(r_S, t)$ activité du radioligand dans le tissu source à l'instant t (Bq).
- Y_i nombre de $i^{\text{ème}}$ transitions nucléaires par désintégration ($\text{Bq}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).
- E_i énergie moyenne de la $i^{\text{ème}}$ transition nucléaire (J).
- $\Delta_i = Y_i \times E_i$ énergie moyenne de la $i^{\text{ème}}$ transition par désintégration ($\text{J} \cdot \text{Bq}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).
- $\phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)$ fraction absorbée (sans dimension).
- $M(r_T, t)$ masse du tissu cible (kg).
- $\Phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)$ fraction absorbée spécifique (kg^{-1}).

La fraction absorbée $\phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)$ correspond à la fraction de l'énergie E_i de la radiation émise du tissu source qui est effectivement absorbée par le tissu cible. Cette fraction absorbée dépend du type et de l'énergie de la radiation émise par le tissu source, ainsi que de la géométrie des tissus source et cible (forme, taille, masse) et de la distance et du type de matériaux les séparant.

Le facteur $S(r_T \leftarrow r_S, t)$ ($\text{Gy} \cdot \text{Bq}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) est défini comme le débit de dose dans le tissu cible à l'instant t par unité d'activité dans le tissu source :

$$S(r_T \leftarrow r_S, t) = \sum_i \Delta_i \frac{\phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)}{M(r_T, t)} = \sum_i \Delta_i \Phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t) \quad (4)$$

A partir de la définition du facteur S, l'équation (3) du débit de dose absorbée moyen $\dot{D}(r_T, t)$ devient :

$$\dot{D}(r_T, t) = A(r_S, t) \times S(r_T \leftarrow r_S, t) \quad (5)$$

Lorsque plusieurs tissus sources sont présents, le débit de dose absorbée moyen total dans le tissu cible s'obtient en sommant les contributions individuelles de chacun de ces tissus sources :

$$\dot{D}(r_T, t) = \sum_{r_s} A(r_S, t) \times S(r_T \leftarrow r_S, t) \quad (6)$$

Pour obtenir la dose absorbée moyenne totale $D(r_T)$ dans le tissu cible, il est nécessaire d'intégrer l'équation (6) donnant le débit de dose absorbée moyen total en fonction du temps. Comme indiqué dans l'équation (4), la valeur du facteur S est susceptible de varier dans le temps, par exemple dans le cas où la dose absorbée est calculée dans des régions tumorales dont la masse varie au cours de la période d'irradiation considérée. Cependant, dans la plupart des cas (et dans

le nôtre ici), les géométries des tissus sources et cibles sont considérées comme constantes pendant la période d'irradiation étudiée, tout comme donc les valeurs des facteurs S . La dose absorbée moyenne $D(r_T, T_D)$ (Gy) dans le tissu cible des radiations émises par les tissus sources, cumulée sur la période d'irradiation T_D , peut alors s'écrire :

$$D(r_T, T_D) = \int_0^{T_D} \dot{D}(r_T, t) dt = \sum_{r_S} \int_0^{T_D} A(r_S, t) dt \times S(r_T \leftarrow r_S)$$

Soit :

$$D(r_T, T_D) = \sum_{r_S} \tilde{A}(r_S, T_D) \times S(r_T \leftarrow r_S) \quad (7)$$

Avec $\tilde{A}(r_S, T_D) = \int_0^{T_D} A(r_S, t) dt$ activité cumulée (ou nombre total de désintégrations, Bq.s) dans le tissu source sur la période d'irradiation T_D .

En se basant sur l'équation (7), afin de déterminer la dose absorbée moyenne $D(r_T, T_D)$ dans chaque organe cible, il est donc nécessaire de calculer d'une part l'activité cumulée $\tilde{A}(r_S, T_D)$ dans chacun des organes sources, et de calculer d'autre part les valeurs des facteurs $S(r_T \leftarrow r_S)$ pour chaque couple organe cible/organe source.

2.2. Détermination de l'activité cumulée dans les organes sources

Suite à son administration au patient ou à l'animal, l'activité $A(r_S, t)$ du radioligand dans les tissus sources d'intérêt peut être estimée au cours du temps de diverses manières (Stabin, 2008) :

- La biodistribution du radioligand peut être déterminée indirectement, en mesurant l'activité d'échantillons de sang ou d'urine collectés à différents instants et en appliquant ensuite un modèle biocinétique. Dans le cadre des études précliniques, la méthode traditionnelle consiste à sacrifier un groupe d'animaux à différents temps post-injection, et à compter l'activité du radioligand dans les organes prélevés avec un compteur à rayons gamma.
- Une autre stratégie, applicable en clinique et en préclinique, consiste à effectuer des imageries TEP longitudinales et à quantifier l'activité du radioligand dans les tissus à partir des images. Contrairement à la méthode conventionnelle de comptage *ex vivo*, cette méthode d'imagerie longitudinale est à favoriser pour les études précliniques car elle permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires, et s'inscrit ainsi dans la démarche éthique des 3 R (Réduire, Raffiner, Remplacer) appliquée à l'expérimentation animale.

Une fois déterminée à différents instants après administration, l'activité $A(r_S, t)$ du radioligand dans chaque organe source peut être tracée en fonction du temps pour générer une courbe TAC (« time-activity curve »). L'activité cumulée $\tilde{A}(r_S, T_D)$ dans l'organe source est alors obtenue par intégration de la courbe TAC sur la période d'irradiation T_D . Pour les examens diagnostiques de médecine nucléaire, la période d'irradiation est communément choisie depuis l'instant d'administration du radiopharmaceutique jusqu'à l'infini. Les valeurs d'activité du

radiopharmaceutique dans chaque organe source sont donc extrapolées (jusqu'à l'infini) après le dernier point de mesure expérimental. Les courbes TACs sont souvent ajustées à une fonction (généralement multi-exponentielle) modélisant la PK du radiopharmaceutique. Des modèles biocinétiques standards, estimant la distribution et le métabolisme de la plupart des radiopharmaceutiques utilisés pour le diagnostic médical, sont indiqués dans la Publication 106 de la CIPR (ICRP, 2008).

2.3. Calcul des facteurs S

Le calcul des facteurs S commence par la définition d'un modèle numérique, appelé fantôme, représentant le plus précisément possible l'anatomie du corps humain ou de l'animal (Stabin, 2008). Le transport et l'absorption des rayonnements émis par les organes sources à travers les différents tissus de l'organisme sont ensuite simulés sur le fantôme numérique, pour dériver une valeur de facteur S pour chaque couple organe source/organe cible. La méthode Monte Carlo de simulation du transport des particules dans la matière, implémentée dans plusieurs codes de calcul (par ex. Geant, MCNPX, Penelope), est couramment utilisée.

Les fantômes numériques décrivant l'anatomie humaine (fantômes anthropomorphiques) ou l'anatomie des animaux utilisés en recherche (par ex. souris, rat) ont fortement évolué au cours des décennies, grâce aux progrès réalisés en imagerie médicale et à l'augmentation de la puissance de calcul des ordinateurs. Ainsi, plusieurs générations de fantômes numériques se sont succédées, partant de la modélisation des organismes par de simples formes géométriques à des représentations de plus en plus réalistes et personnalisées.

- *Les fantômes de première génération.* Les premiers fantômes numériques représentent les organes sous la forme d'une combinaison de formes géométriques simples, définies par des équations mathématiques. Même si peu réalistes anatomiquement, ces fantômes mathématiques ont l'avantage d'être flexibles, la géométrie des organes pouvant être facilement ajustée en modifiant les paramètres des équations. Les 6 fantômes hermaphrodites de Cristy et Eckerman représentent par exemple un individu adulte et des enfants d'âges variés (Cristy and Eckerman, 1987) (Figure 43). Des fantômes mathématiques de souris et de rats ont également été créés. Par exemple, Hui *et al.* ont développé un fantôme de souris, comportant 13 organes et une tumeur sous-cutanée sous la forme d'ellipses et de cylindres (Hui *et al.*, 1994).
- *Les fantômes de seconde génération.* Avec le développement des techniques d'imagerie médicale, les fantômes mathématiques ont été remplacés par les fantômes « voxelisés », offrant une représentation anatomique bien plus réaliste. Ces fantômes sont créés à partir de la segmentation des organes sur des images anatomiques en 3D obtenues par TDM ou par imagerie par résonance magnétique (IRM). Les fantômes voxelisés d'un homme et d'une femme adultes de référence, produits à partir d'images TDM haute résolution, ont été adoptés dans la Publication 110 de la CIPR (ICRP, 2009) (Figure 43). Pour la dosimétrie préclinique, on peut citer comme exemple les fantômes voxelisés de rats et de souris implémentés dans le logiciel de calcul de dose « Rodent Dose Evaluation Software » (RODES), créés à partir d'images IRM des rongeurs (Locatelli *et al.*, 2017) (Figure 44).

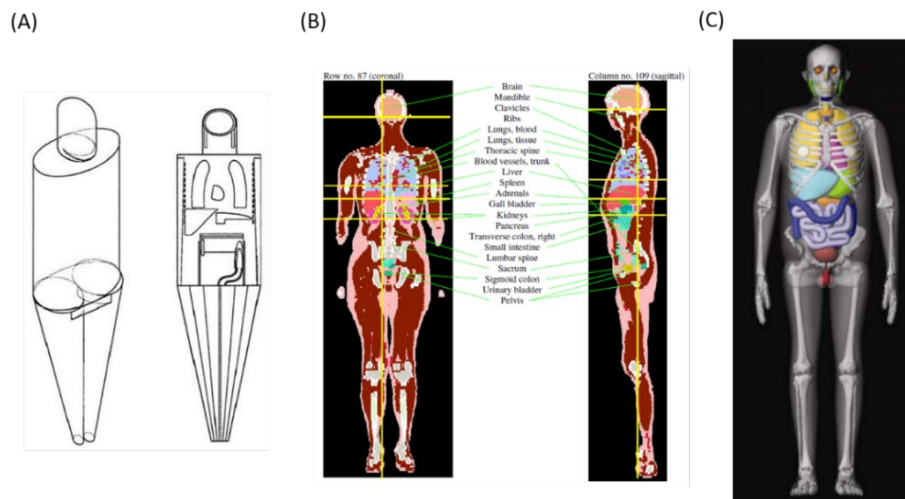


Figure 43. Exemples de fantômes numériques anthropomorphiques. (A) Vue extérieure d'un des fantômes mathématiques de Cristy et Eckerman (Stabin and Siegel, 2018). (B) Coupes coronales et sagittales du fantôme voxelisé de l'homme adulte de référence (Publication 89 de la CIPR) adopté dans la Publication 110 de la CIPR (ICRP, 2009). (C) Vue frontale en 3D du fantôme hybride NURBS/PM de l'homme adulte de référence (Publication 89 de la CIPR) développé à l'Université de Floride (Lee *et al.*, 2010).

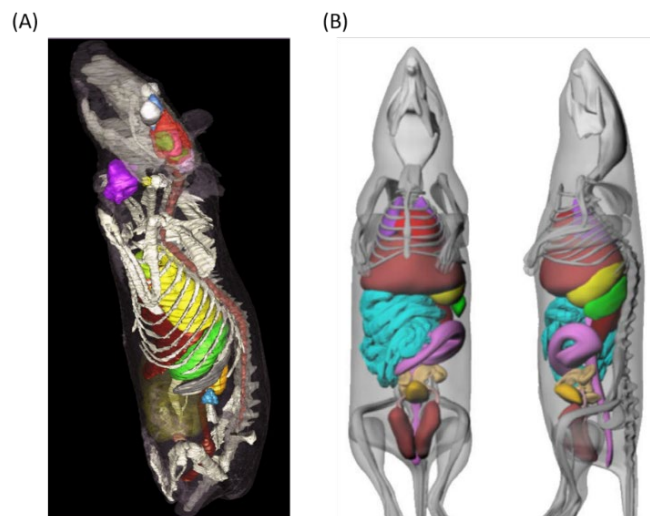


Figure 44. Exemples de fantômes numériques de rongeurs. (A) Vue latérale en 3D du fantôme voxelisé de rate femelle âgée implémenté dans le logiciel de dosimétrie murine RODES (Locatelli, 2012). (B) Vues antérieure et latérale en 3D du fantôme hybride de souris MOBY (Segars, 2004).

- *Les fantômes de troisième génération.* À partir des années 2000, les fantômes hybrides ont fait leur apparition. Une fois les organes segmentés à partir d'images médicales, leur surface est modélisée en 3D à l'aide de fonctions mathématiques B-splines rationnelles non uniformes (NURBS pour « non-uniform rational B-splines ») et d'un maillage polygonal (PM pour « polygon mesh »). Chaque surface hybride NURBS/PM est définie par un ensemble de points de contrôle pouvant être manipulés pour induire des déformations et des changements d'échelle locaux. Un format voxelisé du fantôme est

ensuite généré. Les fantômes hybrides combinent ainsi la flexibilité des fantômes mathématiques tout en conservant le réalisme anatomique des fantômes voxelisés. Des chercheurs de l'Université de Floride ont par exemple développé des fantômes hybrides NURBS/PM représentant les individus adultes et enfants de référence de la Publication 89 de la CIPR (ICRP, 2002 ; Lee *et al.*, 2010) (Figure 43). Des fantômes hybrides de rongeurs, comme le fantôme de souris MOBY ou le fantôme de rat ROBY, ont également été créés (Segars, 2004 ; Keenan *et al.*, 2010) (Figure 44).

Des tableaux de valeurs des facteurs S, calculées à partir de fantômes humains pour différents radionucléides et organes sources/cibles sélectionnés, sont par exemple accessibles dans le Pamphlet n°11 du MIRD (Snyder *et al.*, 1975). Des tableaux de valeurs des fractions absorbées spécifiques, déterminées sur des fantômes humains et murins, sont également disponibles sur le site Internet du comité RADAR (« Radiation Dose Assessment Ressource ») (RADAR Phantoms).

Dans le cadre de cette thèse, l'analyse dosimétrique des radioligands C4 utilisés pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1 a tout d'abord débuté par l'estimation des doses absorbées par les organes des souris injectées avec ces radioligands.

3. Dosimétrie murine des radioligands C4

3.1. Présentation du calcul de dose avec le logiciel RODES

L'analyse dosimétrique murine des radioligands C4 a été effectuée à l'aide du logiciel RODES (Locatelli *et al.*, 2017) (Annexe 1). Une librairie de fantômes numériques voxelisés de souris et de rats d'âge et de sexe différents est disponible dans le logiciel. Cela permet de choisir pour le calcul de dose le modèle anatomique le plus proche des animaux utilisés pour l'expérience.

Les données suivantes sont déjà implémentées dans le logiciel RODES :

- *Les fractions absorbées par les organes cibles.* Pour chaque fantôme voxelisé, le transport des rayonnements émis par les organes sources a été simulé à l'aide du code de calcul Monte Carlo MCNPX. Ces simulations ont permis de calculer les fractions absorbées ϕ par les différents organes cibles.
- *La masse des organes.* En l'absence de données disponibles sur la densité des tissus murins, les valeurs de densité des tissus humains correspondants, indiquées dans la Publication 110 de la CIPR, ont été utilisées (ICRP, 2009). La masse de chaque organe a été calculée en multipliant la valeur de densité attribuée par le volume de l'organe, défini dans le fantôme numérique choisi.
- *Le spectre d'émission du radionucléide utilisé.* Les informations concernant le type, l'énergie E_i , et le nombre de particules Y_i émises par désintégration du radionucléide utilisé ont été extraites de la Publication 107 de la CIPR (ICRP, 2008).

Pour chaque couple organe source/organe cible considéré, la combinaison de la valeur de fraction absorbée avec la masse de l'organe cible et avec les propriétés d'émission du radionucléide permet le calcul du facteur S selon l'équation présentée précédemment :

$$S(r_T \leftarrow r_S) = \sum_i Y_i \times E_i \times \frac{\phi(r_T \leftarrow r_S, E_i)}{M(r_T)} \quad (4)$$

Pour calculer la dose absorbée par l'organe cible selon l'équation rappelée ci-dessous, il reste alors à l'utilisateur à indiquer au logiciel l'activité cumulée $\tilde{A}(r_s, T_D)$ du radioligand dans chacun des organes sources.

$$D(r_T, T_D) = \sum_{r_s} \tilde{A}(r_s, T_D) \times S(r_T \leftarrow r_s) \quad (7)$$

3.2. Calcul des activités cumulées dans les organes sources

Le calcul de l'activité cumulée des radioligands C4 dans les organes sources murins a été effectué à partir des données biocinétiques obtenues lors des expériences d'imagerie TEP/TDM longitudinale dans le modèle préclinique de CPNPC humain H1975 (PD-L1⁺) (Tableau 18).

Tableau 18. Expériences d'imagerie TEP/TDM longitudinale réalisées avec les radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC humain H1975. Les souris nues femelles portant les xénogreffes humaines sous-cutanées de CPNPC H1975 (PD-L1⁺) ont été injectées avec les 3 ligands C4 radiomarqués au ⁸⁹Zr. Des examens TEP/TDM ont ensuite été réalisés à différents temps post-injection. Pour chaque expérience, les activités mentionnées ont été corrigées par rapport au temps d'injection pour tenir compte de la décroissance radioactive. Les données sont présentées comme la valeur moyenne \pm l'écart-type.

Ligand C4 radiomarqué au ⁸⁹ Zr	Activité spécifique (MBq/nmol)	Activité injectée (MBq)	Quantité injectée (nmol)	Nombre de souris	Acquisitions TEP/TDM
IgG C4	11,6	4,3 \pm 0,4	0,36 \pm 0,03	5	+ 1 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 7 jours post-injection
IgG C4 (H310A/H435Q)	6,2	4,2 \pm 0,2	0,66 \pm 0,03	6	
Fab C4	7,5	4,0 \pm 0,3	0,54 \pm 0,03	6	+ 1 h, 4 h, 24 h, 48 h et 72 h post-injection

Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; TDM, tomodensitométrie ; TEP, tomographie par émission de positons ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

La première étape a consisté à segmenter les organes sources sur chaque image TEP à l'aide du logiciel PMOD (Annexe 1). Les organes sélectionnés comme sources étaient les principaux organes dans lesquels une accumulation des radioligands C4 a été observée : le cœur, le foie, les reins, la rate, la tumeur H1975 et la vessie. Le « reste du corps » (le corps entier moins

les autres organes sources) a également été considéré comme un organe source. Les techniques de segmentation et les VOIs dessinés dans les organes sources sont présentés dans la Figure 45. La segmentation de la majorité des organes a été simplifiée en considérant une répartition homogène du radioligand dans l'organe, et en dessinant alors un VOI sphérique dans une zone représentative. D'autres organes ont été délimités de manière semi-automatique à l'aide du logiciel, en réajustant ensuite manuellement les VOIs ainsi créés.

Organe source	VOI créé pour les $^{89}\text{Zr-IgGs C4}$	VOI créé pour le $^{89}\text{Zr-Fab}$
Corps entier	Isocontour + segmentation manuelle	Isocontour + segmentation manuelle
Cœur	Sphère 8 mm ³	Sphère 8 mm ³
Rein gauche	Sphère 8 mm ³	Isocontour
Rein droit	Sphère 8 mm ³	Isocontour
Foie	Sphère 8 mm ³	Sphère 8 mm ³
Rate	Isocontour	/
Vessie	Sphère 8 mm ³	Sphère 8 mm ³
Tumeur H1975	Isocontour	Isocontour

Figure 45. Segmentation des organes sources et du corps entier sur les images TEP obtenues avec les radioligands C4. Les VOIs dessinés à l'aide du logiciel PMOD pour segmenter les différents organes sources et le corps entier sont visualisés en 3D sur les 2 images représentatives de souris, injectées avec le $^{89}\text{Zr-IgG C4}$ et le $^{89}\text{Zr-Fab C4}$. Les mêmes VOIs ont été dessinés pour les anticorps $^{89}\text{Zr-IgG C4}$ et $^{89}\text{Zr-IgG C4}$ (H310A/H435Q). En raison du fort signal présent dans les reins, il n'a pas été possible de visualiser correctement et donc de segmenter la rate sur les images TEP obtenues avec le $^{89}\text{Zr-Fab C4}$. Abréviations : VOI, volume d'intérêt ; ^{89}Zr , zirconium-89.

Tableau 19. Masse et volume des organes sources et du corps entier définis pour le fantôme RODES souris femelle adulte.

Organe	Masse (g)	Volume (cm ³)
Corps entier	20	18,87
Cœur	0,17	0,16
Foie	1,2	1,14
Rate	0,06	0,06
Rein gauche	0,15	0,16
Rein droit	0,17	0,14
Reins	0,32	0,30
Vessie	0,018	0,02

Une fois les organes sources segmentés sur chaque image TEP, la concentration moyenne en activité (Bq/cm³) dans chacun d'eux a été calculée par le logiciel PMOD, puis multipliée par le volume de l'organe source (cm³) pour obtenir l'activité moyenne (Bq) dans l'organe source. Pour le volume des différents organes sources, les valeurs indiquées dans le fantôme RODES souris femelle adulte ont été utilisées (Tableau 19). Pour chaque organe source, l'activité moyenne a été tracée en fonction du temps pour obtenir la courbe TAC (pour « time-activity curve ») (Figure 46).

L'aire sous la courbe TAC de chaque organe source a été calculée à l'aide du logiciel R, afin d'obtenir l'activité cumulée \tilde{A} (Bq.s). Une intégration numérique par la méthode des trapèzes a été effectuée sur l'intervalle de données expérimentales. A partir du dernier point expérimental, les courbes TACs ont été extrapolées à l'infini, en prenant seulement en compte la décroissance radioactive du ⁸⁹Zr :

$$A(t \geq t_{fin_exp}) = A_1 \times e^{-\frac{\ln(2)}{t_{1/2}} \times t} \quad (9)$$

Avec $A_1 = A(t_{fin_exp})$ à $t = t_{fin_exp}$ soit :

$$A_1 = \frac{A(t_{fin_exp})}{e^{-\frac{\ln(2)}{t_{1/2}} \times t_{fin_exp}}}$$

Avec :

- t_{fin_exp} dernier temps d'acquisition TEP/TDM.
- $A(t_{fin_exp})$ activité dans l'organe source mesurée au dernier temps d'acquisition.
- $t_{1/2}$ période du ⁸⁹Zr, $t_{1/2} = 3,3$ jours = 78,4 h.

Cette approche conservatrice couramment utilisée considère ainsi qu'après la dernière mesure expérimentale, la diminution de l'activité associée au radioligand dans l'organe est seulement liée à la décroissance radioactive du radionucléide, sans prendre en compte l'élimination biologique du radioligand. L'activité cumulée \tilde{A} « réelle » dans chaque organe source sera donc toujours inférieure ou égale à cette activité cumulée estimée. La courbe de décroissance exponentielle a ensuite été intégrée de manière analytique :

$$AUC (t_{fin_exp} \rightarrow +\infty) = \int_{t_{fin_exp}}^{+\infty} A_1 \times e^{-\frac{\ln(2)}{t_{1/2}} \times t} dt = \frac{A_1}{\ln(2)} \times t_{1/2} \times e^{-\frac{\ln(2)}{t_{1/2}} \times t_{fin_exp}} \quad (10)$$

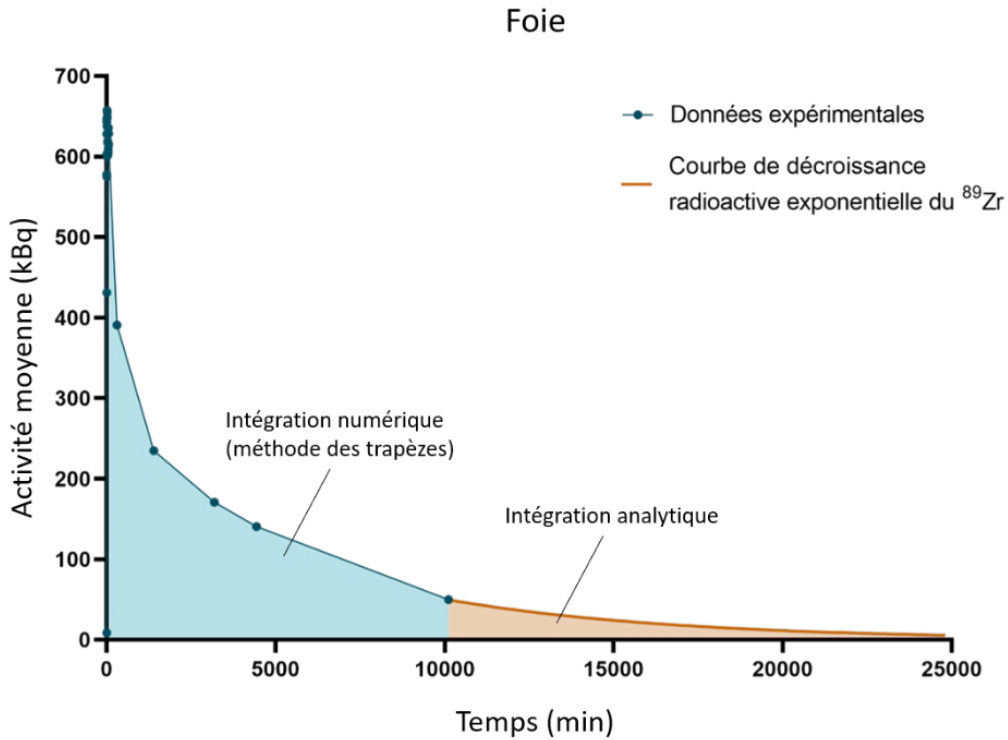


Figure 46. Intégration de la courbe TAC de chaque organe source. Exemple de courbe TAC de l'organe source foie obtenue pour une des souris injectées avec le ^{89}Zr -IgG C4. L'aire sous la courbe a été calculée par intégration numérique sur l'intervalle de données expérimentales puis par intégration analytique de la courbe de décroissance radioactive du ^{89}Zr , extrapolée jusqu'à l'infini à partir du dernier point expérimental. Abréviations : TAC, « time-activity curve » ; ^{89}Zr , zirconium-89.

L'aire totale sous chaque courbe TAC a finalement été calculée en faisant la somme de l'aire obtenue par intégration numérique sur l'intervalle de mesures expérimentales et de l'aire obtenue par intégration analytique après le dernier temps d'acquisition TEP/TDM (Figure 46) :

$$AUC_{tot} = AUC(t_0 \rightarrow t_{fin_exp}) + AUC(t_{fin_exp} \rightarrow +\infty) \quad (11)$$

Avec t_0 temps du premier point de mesure expérimental.

La valeur de l'aire totale AUC_{tot} ainsi calculée correspond à l'activité cumulée $\tilde{A}(r_S, \infty)$ du radioligand C4 dans l'organe source r_S , du premier point de mesure expérimental jusqu'à l'infini. Pour chaque animal, ce sont ces valeurs d'activité cumulée dans chacun des organes sources qui ont été saisies dans le logiciel RODES afin de procéder au calcul de dose.

3.3. Calcul des doses absorbées par les organes cibles

Le calcul de dose avec le logiciel RODES a été effectué pour chaque animal individuel. Différents paramètres d'entrée ont été spécifiés :

- ✓ *Le radionucléide ^{89}Zr .*
- ✓ *Le fantôme de souris femelle adulte.*
- ✓ *L'organe cible.* Un inconvénient du programme RODES est que le calcul de dose ne peut se faire que sur un organe cible à la fois. Les organes cibles sélectionnés étaient les organes dans lesquels une accumulation de radioactivité a été observée sur les images TEP (par ex. foie) ainsi que les tissus situés à proximité de ceux-ci (par ex. poumons). Les organes particulièrement radiosensibles (par ex. moelle osseuse, ovaires) ont également été choisis.
- ✓ *Les valeurs d'activité cumulée $\tilde{A}(r_S, \infty)$ (Bq.s) dans les organes sources précédemment calculées.* La vessie n'a finalement pas été retenue en raison de la trop grande variabilité d'activité dans cet organe entre les différents animaux pour un même examen TEP, et pour un même animal entre les examens TEP longitudinaux (en fonction de si la souris a uriné avant, pendant ou après l'examen). Les organes sources tumeur sous-cutanée et « reste du corps » ne sont pas définis sur les fantômes RODES et n'ont donc pas non plus été pris en compte. Cependant, la concentration en activité dans ces 2 organes sources était bien plus faible que celle dans les autres organes sources considérés, et leur omission pour le calcul de dose n'a eu donc qu'une conséquence limitée.

Le logiciel RODES a alors renvoyé la valeur de dose absorbée totale (Gy) dans l'organe cible sélectionné. Pour chaque animal, les valeurs de dose ainsi obtenues dans chacun des organes cibles ont été divisées par l'activité injectée du radioligand C4 (MBq). Les résultats de dose absorbée (Gy/MBq) par les organes cibles pour les 3 radioligands C4 sont donnés dans le Tableau 20.

Tableau 20. Doses absorbées par les organes cibles murins pour les radioligands C4. Les données sont présentées comme la valeur moyenne \pm l'écart-type. Les organes cibles avec les estimations de dose absorbée les plus élevées sont indiqués en gras.

Organe	Dose absorbée (Gy/MBq)		
	⁸⁹ Zr-IgG C4 N = 5 souris	⁸⁹ Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) N = 6 souris	⁸⁹ Zr-Fab C4 N = 6 souris
Thyroïde	0,004 \pm 0,0002	0,01 \pm 0,0003	0,003 \pm 0,0003
Cœur	1,13 \pm 0,10	1,22 \pm 0,04	0,34 \pm 0,07
Poumons	0,18 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02
Foie	0,41 \pm 0,01	0,73 \pm 0,04	0,12 \pm 0,01
Esophage	0,16 \pm 0,002	0,26 \pm 0,013	0,05 \pm 0,007
Estomac	0,05 \pm 0,001	0,08 \pm 0,004	0,05 \pm 0,01
Intestins	0,01 \pm 0,001	0,02 \pm 0,001	0,02 \pm 0,004
Colon	0,018 \pm 0,0004	0,03 \pm 0,002	0,05 \pm 0,008
Rate	0,24 \pm 0,02	0,18 \pm 0,01	0,10 \pm 0,02
Reins	0,22 \pm 0,02	0,37 \pm 0,03	1,97 \pm 0,29
Moelle osseuse	0,01 \pm 0,0004	0,02 \pm 0,001	0,02 \pm 0,002
Squelette	0,01 \pm 0,0003	0,02 \pm 0,001	0,01 \pm 0,001
Ovaires	0,01 \pm 0,001	0,03 \pm 0,001	0,09 \pm 0,01
Corps entier	0,06 \pm 0,001	0,09 \pm 0,004	0,07 \pm 0,01

Abréviation : ⁸⁹Zr, zirconium-89.

En accord avec le profil de biodistribution *in vivo* des radioligands C4 dans les souris, les reins ont présenté la dose absorbée maximale pour le ⁸⁹Zr-Fab C4, avec une valeur de $\sim 7,9$ Gy pour une activité injectée moyenne de 4 MBq. Pour le ⁸⁹Zr-IgG C4 et le ⁸⁹Zr-IgG C4 mutant, la dose absorbée la plus importante s'est retrouvée dans le cœur, suivi par le foie. Pour des activités injectées moyennes de 4,1-4,4 MBq, les doses dans le cœur étaient de ~ 5 Gy pour les 2 anticorps radiomarqués, et les doses dans le foie égales à $\sim 1,8$ Gy pour le ⁸⁹Zr-IgG C4 et $\sim 3,0$ Gy pour le ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q). En l'absence d'autres études dosimétriques murines avec des anticorps/fragments d'anticorps radiomarqués au ⁸⁹Zr trouvées dans la littérature, il apparaît difficile de comparer et discuter ces résultats, par exemple en termes de radiotoxicité au niveau des organes les plus exposés. Une analyse de la toxicité aiguë induite dans les tissus murins suite à l'administration des radioligands C4 n'a pas été effectuée dans le cadre de cette thèse. Cette radiotoxicité pourrait être évaluée par pesée et examen histologique des organes (par ex. foie, reins, rate) après sacrifice des animaux. Elle pourrait également être mesurée indirectement par analyse biochimique sanguine. Par exemple, des taux sanguins élevés des enzymes phosphatase alcaline et alanine aminotransférase peuvent traduire un dysfonctionnement du foie, tandis que des taux élevés de créatinine suggèrent un endommagement des reins (Nedrow *et al.*, 2017). Quoi qu'il en soit, les animaux n'ont pas présenté de signes cliniques anormaux (par ex. perte de poids significative, manifestations de douleur, difficultés respiratoires) sur la durée des expériences d'imagerie (jusqu'à 7 jours). Aucune anomalie macroscopique (par ex. ascites) n'a non plus été observée lors de la nécropsie des souris juste après la dernière session d'imagerie.

Une limite de cette analyse dosimétrique murine provient de la différence entre l'anatomie du fantôme RODES de souris femelle adulte utilisé pour le calcul de dose et l'anatomie réelle des souris utilisées pour les expériences d'imagerie TEP/TDM avec les radioligands C4. Les masses

des organes des souris nudes femelles ayant été imagées avec les radioligands C4 ont été obtenues après dissection et pesée *ex vivo* des organes, et sont indiquées dans le Tableau 21. Les valeurs de masse correspondantes dans le fantôme RODES sont indiquées pour comparaison. Ces données montrent que les masses attribuées à chaque organe peuvent varier significativement entre le fantôme numérique choisi et les animaux utilisés expérimentalement. Or, la masse des organes influe sur les valeurs des facteurs S calculées, et ces différences peuvent donc avoir un impact notable sur l'estimation des doses absorbées (Hindorf, Ljungberg and Strand, 2004).

Tableau 21. Comparaison entre les masses des organes des souris utilisées expérimentalement et les masses des organes du fantôme RODES de souris femelle adulte. Les masses des organes des souris imagées avec les radioligands C4 sont présentées comme la valeur moyenne \pm l'écart-type. Pour les masses des organes du fantôme RODES, le pourcentage de variation par rapport à la masse de l'organe correspondant mesurée expérimentalement est indiqué.

Masse des organes (g)		
	Données expérimentales N = 10 souris nudes femelles	Fantôme RODES souris femelle adulte
Cerveau	0,49 \pm 0,21	0,20 (- 59 %)
Cœur	0,17 \pm 0,05	0,17 (0 %)
Poumons	0,23 \pm 0,08	0,13 (- 43 %)
Foie	1,47 \pm 0,47	1,23 (- 16 %)
Rate	0,12 \pm 0,04	0,06 (- 50 %)
Reins	0,45 \pm 0,05	0,32 (- 29 %)
Corps entier	28,4 \pm 2,4	20 (- 30 %)

Le résultat de dose absorbée obtenu pour chaque organe cible (Tableau 20) donne une estimation de la dose absorbée moyenne sur l'ensemble de l'organe. Cette estimation ne prend ainsi pas en compte l'hétérogénéité spatiale de distribution de l'activité, et donc de la dose absorbée, au sein de l'organe. Par exemple, après filtration par le glomérule rénal, le ^{89}Zr -Fab C4 est réabsorbé par les cellules tubulaires proximales, situées principalement dans le cortex rénal. La forte rétention d'activité observée dans les reins avec le fragment radiomarqué se localise ainsi essentiellement au niveau du cortex, tandis que le signal est bien plus faible dans la médullaire et le pelvis rénaux. La dose absorbée moyenne sur l'ensemble de l'organe ne permet donc pas d'interpréter correctement les doses réellement absorbées dans les différentes régions rénales, et donc de prédire de manière fiable les potentiels effets radiotoxiques. L'utilisation de fantômes discriminant plusieurs sous-régions distinctes au sein des organes permettrait une meilleure prise en compte de cette hétérogénéité de distribution de la dose. Une analyse encore plus fine consisterait à calculer la dose absorbée à l'échelle du voxel. Cette approche a par exemple été développée par Bednarz *et al.* avec la plateforme de dosimétrie murine RAPID (« Radionuclide Assessment Platform for Internal Dosimetry ») qui permet d'obtenir une image paramétrique en

3D de la dose absorbée dans les organes à l'échelle du voxel, à partir de l'image TEP/TDM de l'animal (Bednarz *et al.*, 2018).

Au-delà de l'estimation des doses absorbées dans les organes murins, le principal intérêt translationnel des analyses de dosimétrie précliniques reste d'accéder à une première estimation des doses attendues dans les organes humains après l'administration du radiopharmaceutique (ici des radioligands C4). Cette étape préliminaire, reposant sur l'extrapolation des données biocinétiques précliniques, est essentielle pour la conception des premières études cliniques qui évalueront ensuite les doses reçues par le patient et les limites de radiotoxicité de manière plus précise.

4. Dosimétrie humaine des radioligands C4

4.1. Présentation du calcul de dose avec le logiciel IDAC-Dose

L'analyse dosimétrique humaine des radioligands C4 à partir des données de biodistribution murines a été réalisée avec le logiciel « Internal Dose Assessed by Computer » (IDAC-Dose) (Andersson *et al.*, 2017) (Annexe 1). Le logiciel utilise les fantômes voxelisés de l'homme et de la femme adultes de référence définis dans la Publication 110 de la CIPR (ICRP, 2009) (Figure 43). Les valeurs de fraction absorbée spécifique Φ obtenues pour des particules de diverses énergies dans ces 2 fantômes de référence et indiquées dans la Publication 133 de la CIPR (ICRP, 2016) sont implémentées dans le logiciel. Tout comme le logiciel RODES, le logiciel IDAC-Dose utilise la base de données des spectres d'émission de divers radionucléides fournie dans la Publication 107 de la CIPR (ICRP, 2008).

Les données saisies par l'utilisateur pour le calcul de dose sont les valeurs du coefficient d'activité intégré en fonction du temps, aussi appelé temps de résidence, pour chaque organe source considéré. Ce temps de résidence $\tilde{a}(r_S, T_D)$ (Bq.s.Bq⁻¹) correspond à l'activité cumulée $\tilde{A}(r_S, T_D)$ dans le tissu source r_S sur la période d'irradiation T_D par unité d'activité administrée A_0 :

$$\tilde{a}(r_S, T_D) = \frac{\tilde{A}(r_S, T_D)}{A_0} \quad (8)$$

Une fois le radionucléide sélectionné et les temps de résidence dans les organes sources d'intérêt indiqués, le logiciel renvoie les valeurs de dose absorbée par unité d'activité administrée (mGy/MBq) dans les organes cibles. Le logiciel calcule aussi la dose efficace par unité d'activité administrée (mSv/MBq) pour un individu humain de référence, selon la définition donnée par la Publication 103 de la CIPR présentée précédemment (équation 2) (ICRP, 2007).

4.2. Calcul des temps de résidence dans les organes sources

Compte tenu de la variation importante entre les masses « réelles » des organes des souris imagées avec les radioligands C4, et les masses de ces mêmes organes dans le fantôme RODES souris femelle adulte (Tableau 21), l'activité cumulée \tilde{A} dans les organes sources des souris imagées a été recalculée pour les 3 radioligands C4. Cette fois-ci, la concentration moyenne en

activité dans chaque organe source (kBq/cm^3) a été multipliée par le volume moyen « réel » de l'organe (et non pas par le volume de l'organe dans le fantôme RODES). Ces valeurs de volume « réelles » ont été calculées à partir de la masse moyenne des organes déterminée expérimentalement (Tableau 21), et en prenant les valeurs de densité des organes humains correspondants ($1,03\text{-}1,06 \text{ g}/\text{cm}^3$) indiquées dans la Publication 110 de la CIPR (ICRP, 2009). Le volume « corps entier » moyen a été obtenu par segmentation du corps entier des souris avec le logiciel PMOD sur l'ensemble des images TEP obtenues avec les 3 radioligands C4 (Tableau 18). A cette différence près, les activités cumulées ont été calculées selon les mêmes étapes que présentées précédemment dans la partie dosimétrie murine. En plus des organes sources cœur, foie, reins et rate, l'organe source « reste du corps » a également été considéré car disponible dans le logiciel IDAC. L'activité cumulée dans le « reste du corps » a été calculée comme la différence entre l'activité cumulée dans le corps entier et les activités cumulées dans les autres organes sources. Les activités cumulées ainsi calculées ont ensuite été divisées par l'activité totale administrée, pour finalement obtenir les temps de résidence \tilde{a} ($\text{Bq}\cdot\text{h}\cdot\text{Bq}^{-1}$) pour chacun des organes sources de chaque animal.

4.3. Calcul des doses absorbées par les organes cibles

Les temps de résidence \tilde{a} calculés dans les organes sources murins ont été directement utilisés pour le calcul des doses absorbées par les organes cibles humains, en faisant l'hypothèse d'une distribution et d'une cinétique d'élimination des radioligands C4 similaires entre les organes murins et humains. Pour chaque organe cible, les valeurs de dose absorbée renvoyées par le logiciel pour les 2 fantômes adultes (mâle et femelle) ont été moyennées. Les résultats du calcul de dose sont donnés dans le Tableau 22 pour chacun des radioligands C4.

La dose absorbée maximale a été observée dans les reins pour le ^{89}Zr -Fab C4, avec une valeur estimée de $4,96 \text{ mGy}/\text{MBq}$, contre seulement $\sim 1 \text{ mGy}/\text{MBq}$ pour le ^{89}Zr -IgG C4 et le ^{89}Zr -IgG C4 mutant. Les glandes surrénales, irradiées par les reins juste en dessous, ont présenté la seconde dose absorbée la plus importante pour le fragment radiomarqué ($1,34 \text{ mGy}/\text{MBq}$). Pour le ^{89}Zr -IgG C4, les doses absorbées les plus élevées étaient dans le cœur ($1,09 \text{ mGy}/\text{MBq}$), suivi du foie ($0,92 \text{ mGy}/\text{MBq}$) et de la vésicule biliaire. En raison de sa plus forte rétention dans le foie, la dose absorbée maximale du ^{89}Zr -IgG C4 mutant s'est retrouvée dans cet organe ($1,50 \text{ mGy}/\text{MBq}$), suivi de près par le cœur ($1,25 \text{ mGy}/\text{MBq}$) et la vésicule biliaire.

Cependant, il est à souligner que les souris nues utilisées pour les expériences d'imagerie TEP/TDM avec les radioligands C4 sont immunodéficientes pour les lymphocytes T. Ces cellules immunitaires sont normalement présentes dans les organes lymphoïdes (par ex. la rate) et peuvent exprimer PD-L1. Ainsi, les valeurs de dose absorbée estimées dans les organes lymphoïdes humains sont relativement faibles (par ex. $< 0,60 \text{ mGy}/\text{MBq}$ pour la rate), et ne sont pas vraiment représentatives des doses absorbées que l'on observerait réellement en clinique avec les radioligands C4, chez un individu possédant un système immunitaire complet. Par exemple, Kelly *et al.* ont réalisé une expérience d'imagerie TEP longitudinale avec l'anticorps anti-hPD-L1 ^{89}Zr -REGN3504 dans des souris humanisées, exprimant les 2 protéines humaines PD-1 et PD-L1 (Kelly *et al.*, 2021). Les doses absorbées par les organes humains suite à l'administration du ^{89}Zr -REGN3504 ont là aussi été extrapolées à partir des données de biodistribution murine. Les organes avec les estimations de dose absorbée les plus élevées étaient la rate ($0,99 \text{ mGy}/\text{MBq}$) et le foie ($0,76 \text{ mGy}/\text{MBq}$). La dose absorbée maximale estimée dans la rate provenait de l'interaction du ^{89}Zr -REGN3504 avec les cellules immunitaires hPD-L1⁺ présentes dans cet

organe. La dose absorbée dans le foie estimée pour le ^{89}Zr -REGN3504 est proche de la valeur obtenue pour le ^{89}Zr -IgG C4.

Tableau 22. Doses absorbées par les organes cibles humains estimées à partir des données biocinétiques murines des radioligands C4. Les données sont présentées comme la valeur moyenne \pm l'écart-type. Les organes cibles avec les estimations de dose absorbée les plus élevées sont indiqués en gras.

Organe	Dose absorbée (mGy/MBq)		
	^{89}Zr -IgG C4	^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q)	^{89}Zr -Fab C4
Glandes surrénales	0,61 \pm 0,08	0,82 \pm 0,12	1,34 \pm 0,26
Cerveau	0,17 \pm 0,03	0,10 \pm 0,02	0,07 \pm 0,03
Sein	0,25 \pm 0,03	0,24 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02
Paroi colon	0,25 \pm 0,03	0,21 \pm 0,03	0,24 \pm 0,05
Endoste	0,22 \pm 0,03	0,16 \pm 0,03	0,12 \pm 0,04
Vésicule biliaire	0,74 \pm 0,06	1,14 \pm 0,09	0,59 \pm 0,19
Paroi cœur	1,09 \pm 0,15	1,25 \pm 0,16	0,49 \pm 0,17
Reins	0,74 \pm 0,09	1,10 \pm 0,12	4,96 \pm 0,92
Foie	0,92 \pm 0,09	1,50 \pm 0,16	0,44 \pm 0,08
Poumons	0,35 \pm 0,05	0,36 \pm 0,05	0,17 \pm 0,03
Ganglions lymphatiques	0,30 \pm 0,04	0,27 \pm 0,03	0,23 \pm 0,06
Muscle	0,22 \pm 0,04	0,15 \pm 0,03	0,13 \pm 0,04
Œsophage	0,41 \pm 0,04	0,43 \pm 0,03	0,20 \pm 0,02
Muqueuse buccale	0,19 \pm 0,03	0,11 \pm 0,02	0,08 \pm 0,03
Ovaires	0,27 \pm 0,04	0,16 \pm 0,03	0,12 \pm 0,04
Pancréas	0,47 \pm 0,04	0,59 \pm 0,04	0,63 \pm 0,22
Prostate	0,23 \pm 0,04	0,13 \pm 0,02	0,10 \pm 0,04
Moelle osseuse	0,30 \pm 0,04	0,25 \pm 0,04	0,21 \pm 0,05
Glandes salivaires	0,18 \pm 0,03	0,11 \pm 0,02	0,07 \pm 0,03
Peau	0,15 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02
Paroi intestin grêle	0,27 \pm 0,04	0,24 \pm 0,04	0,31 \pm 0,08
Rate	0,60 \pm 0,07	0,50 \pm 0,07	0,46 \pm 0,10
Paroi estomac	0,41 \pm 0,04	0,48 \pm 0,05	0,36 \pm 0,10
Testicules	0,18 \pm 0,03	0,10 \pm 0,02	0,07 \pm 0,03
Thymus	0,29 \pm 0,04	0,25 \pm 0,04	0,13 \pm 0,02
Thyroïde	0,22 \pm 0,03	0,15 \pm 0,02	0,09 \pm 0,03
Paroi vessie	0,21 \pm 0,03	0,13 \pm 0,02	0,10 \pm 0,03
Utérus/col de l'utérus	0,26 \pm 0,04	0,15 \pm 0,03	0,12 \pm 0,04
Dose efficace (mSv/MBq)	0,34 \pm 0,03	0,35 \pm 0,02	0,26 \pm 0,05

Abréviation : ^{89}Zr , zirconium-89.

Les doses efficaces estimées étaient de 0,34 mSv/MBq pour le ^{89}Zr -IgG C4, 0,35 mSv/MBq pour le ^{89}Zr -IgG C4 mutant et 0,26 mSv/MBq pour le ^{89}Zr -Fab C4. Ces estimations sont légèrement inférieures à la dose efficace de 0,57 mSv/MBq obtenue dans l'étude préclinique avec

le ^{89}Zr -REGN3504 sur les souris humanisées hPD-1⁺/hPD-L1⁺ (Kelly *et al.*, 2021). Cela pourrait là encore s'expliquer par la sous-estimation des doses absorbées dans les organes lymphoïdes pour les radioligands C4 dans notre étude. Les valeurs de dose efficace estimées restent néanmoins du même ordre de grandeur que les valeurs calculées dans le cadre d'études immunoTEP cliniques utilisant des anticorps radiomarqués au ^{89}Zr (Tableau 23).

Tableau 23. Dosimétrie effectuée dans diverses études immunoTEP cliniques avec des anticorps ou fragments d'anticorps radiomarqués au ^{89}Zr .

Patients	Radioligand	Dose efficace (mSv/MBq)	Référence
20 patients avec cancer de la tête et du cou	^{89}Zr -cmAb U36 anticorps anti-CD44v6	0,60	Borjesson <i>et al.</i> , 2009
10 patients avec cancer de la prostate métastatique	^{89}Zr -huJ591 anticorps anti-PSMA	0,38	Pandit-Taskar <i>et al.</i> , 2014
7 patients avec cancer colorectal avancé	^{89}Zr -cetuximab anticorps anti-EGFR	0,61	Makris <i>et al.</i> , 2015
12 patients avec cancer du sein HER2 ⁺	^{89}Zr -trastuzumab anticorps anti-HER2	0,61	Laforest <i>et al.</i> , 2016
18 patients avec cancer de la prostate métastatique	^{89}Zr -IAB2M minibody anti-PSMA	0,41	Pandit-Taskar <i>et al.</i> , 2016
6 patients avec cancer métastatique HER2 ⁺	^{89}Zr -pertuzumab anticorps anti-HER2	0,54	Ulaner <i>et al.</i> , 2018
6 patients avec cancer œsogastrique métastatique HER2 ⁺	^{89}Zr -trastuzumab anticorps anti-HER2	0,48	O'Donoghue <i>et al.</i> , 2018
6 patients avec cancer de la prostate métastatique STEAP1 ⁺	^{89}Zr -MSTP2109A anticorps anti-STEAP1	0,44	O'Donoghue <i>et al.</i> , 2019

Abréviations : EGFR, « epidermal growth factor receptor » ; HER2, « human epidermal growth factor receptor 2 » ; PSMA, « prostate-specific membrane antigen » ; STEAP1, « six-transmembrane epithelial antigen of the prostate » ; ^{89}Zr , zirconium-89.

L'administration de 37 MBq de radioligand C4 aux patients, valeur d'activité injectée dans la première étude TEP clinique avec le ^{89}Zr -atezolizumab (Bensch *et al.*, 2018), conduirait à une dose efficace de ~ 13 mSv pour le ^{89}Zr -IgG C4 et le ^{89}Zr -IgG C4 mutant, et à une dose efficace de ~ 10 mSv pour le ^{89}Zr -Fab C4. A titre de comparaison, la dose efficace reçue lors d'un examen TEP diagnostique au ^{18}F -FDG est de $\sim 6-7$ mSv (sans compter la TDM) (Martí-Climent *et al.*, 2017). Une activité totale injectée de 37 MBq correspondrait à une dose absorbée dans les reins de 0,18 Gy pour le ^{89}Zr -Fab C4, et à des doses absorbées dans le foie de 0,03 Gy et 0,06 Gy pour le ^{89}Zr -IgG C4 et le ^{89}Zr -IgG C4 mutant, respectivement. Ces faibles doses radioactives sont peu susceptibles d'engendrer des dommages au niveau de ces organes. La tolérance des organes sains aux rayonnements ionisants, et les limites de radiotoxicité associées, ont surtout été caractérisées pour la radiothérapie externe délivrée par doses fractionnées (généralement 2 Gy/jour). Pour ordre d'idée, dans le cadre d'une irradiation externe des 2 reins entiers, le risque à 5 ans de développer des anomalies rénales induites par les rayonnements ionisants est $< 5\%$ pour des doses absorbées moyennes dans chaque rein < 18 Gy. Une dose absorbée unique de 4 Gy au niveau des reins peut entraîner des dommages (Klaus, Niyazi and Lange-Sperandio, 2021).

Pour une irradiation externe du foie entier, le risque de maladie hépatique causée par les radiations est $< 5 \%$ pour des doses absorbées moyennes dans le foie $\leq 28-30$ Gy (Emami, 2013). Par ailleurs, grâce à sa PK rapide, le fragment Fab C4 pourrait être radiomarqué avec un radionucléide de période plus courte, comme le ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ min), ce qui permettrait de diminuer encore les doses de radiation reçues.

Conclusion

En conclusion, la dosimétrie relativement favorable des ligands C4 anti-PD-L1 radiomarqués au ^{89}Zr permettrait d'envisager la réalisation d'examen TEP répétés avec ces radioligands (par ex. tous les 4-6 mois), comme cela pourrait être nécessaire pour suivre l'évolution du statut PD-L1 tumoral des patients. L'anticorps C4 reconnaissant à la fois la protéine PD-L1 humaine et murine, il serait utile d'effectuer une étude dosimétrique à partir de la biodistribution des radioligands C4 dans des souris immunocompétentes ou dans des souris humanisées pour PD-L1, possédant un système immunitaire complet exprimant PD-L1 (murin ou humain). Cette étude permettrait ainsi de mieux évaluer les doses absorbées par les organes lymphoïdes hébergeant les cellules immunitaires PD-L1⁺.

Références

- Andersson, M. *et al.* (2017) 'IDAC-Dose 2.1, an internal dosimetry program for diagnostic nuclear medicine based on the ICRP adult reference voxel phantoms', *EJNMMI Research*, 7(1), p. 88. doi:10.1186/s13550-017-0339-3.
- Bednarz, B. *et al.* (2018) 'Murine-specific Internal Dosimetry for Preclinical Investigations of Imaging and Therapeutic Agents', *Health Physics*, 114(4), pp. 450–459. doi:10.1097/HP.0000000000000789.
- Bensch, F. *et al.* (2018) '89Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer', *Nature Medicine*, 24(12), pp. 1852–1858. doi:10.1038/s41591-018-0255-8.
- Bolch, W.E. *et al.* (2009) 'MIRD Pamphlet No. 21: A Generalized Schema for Radiopharmaceutical Dosimetry--Standardization of Nomenclature', *Journal of Nuclear Medicine*, 50(3), pp. 477–484. doi:10.2967/jnumed.108.056036.
- Borjesson, P.K.E. *et al.* (2009) 'Radiation Dosimetry of 89Zr-Labeled Chimeric Monoclonal Antibody U36 as Used for Immuno-PET in Head and Neck Cancer Patients', *Journal of Nuclear Medicine*, 50(11), pp. 1828–1836. doi:10.2967/jnumed.109.065862.
- Cristy, M. and Eckerman, K. (1987) 'Specific absorbed fractions of energy at various ages from internal photons sources', *Oak Ridge National Laboratory*, ORNL/TM-8381 V1-V7.
- Directive 2013/59/EURATOM (2013). Available at: <http://data.europa.eu/eli/dir/2013/59/oj/fra> (Accessed: 14 August 2021).
- Emami, B. (2013) 'Tolerance of Normal Tissue to Therapeutic Radiation', *Reports of Radiotherapy and Oncology*, 1(1).
- Hindorf, C., Ljungberg, M. and Strand, S.-E. (2004) 'Evaluation of Parameters Influencing S Values in Mouse Dosimetry', *Journal of Nuclear Medicine*, 45(11), p. 6.
- Hui, T.E. *et al.* (1994) 'A mouse model for calculating cross-organ beta doses from yttrium-90-labeled immunoconjugates', *CANCER Supplement*, 73(3), p. 7.
- ICRP (2002) 'Basic Anatomical and Physiological Data for Use in Radiological Protection: Reference Values', *ICRP Publication 89*, Ann. ICRP 32(3–4).
- ICRP (2007) 'The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection', *ICRP Publication 103*, Ann. ICRP 37(2–4).
- ICRP (2008) 'Radiation Dose to Patients from Radiopharmaceuticals', *ICRP Publication 106*, Ann. ICRP 38(1–2).
- ICRP (2009) 'Adult Reference Computational Phantoms', *ICRP Publication 110*, Ann. ICRP 39(2).
- ICRP (2016) 'The ICRP Computational Framework for Internal Dose Assessment for Reference Adults: Specific Absorbed Fractions', *ICRP Publication 133*, Ann. ICRP 45(2).
- IRSN (2021) 'Exposition de la population française aux rayonnements ionisants – Bilan 2014-2019', *Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN)* [Preprint].
- Keenan, M.A. *et al.* (2010) 'RADAR Realistic Animal Model Series for Dose Assessment', *Journal of Nuclear Medicine*, 51(3), pp. 471–476. doi:10.2967/jnumed.109.070532.

- Kelly, M.P. *et al.* (2021) 'Preclinical PET imaging with the novel human antibody ^{89}Zr -DFO-REGN3504 sensitively detects PD-L1 expression in tumors and normal tissues', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(1), p. e002025. doi:10.1136/jitc-2020-002025.
- Klaus, R., Niyazi, M. and Lange-Sperandio, B. (2021) 'Radiation-induced kidney toxicity: molecular and cellular pathogenesis', *Radiation Oncology*, 16(1), p. 43. doi:10.1186/s13014-021-01764-y.
- Laforest, R. *et al.* (2016) '[^{89}Zr]Trastuzumab: Evaluation of Radiation Dosimetry, Safety, and Optimal Imaging Parameters in Women with HER2-Positive Breast Cancer', *Molecular Imaging and Biology*, 18(6), pp. 952–959. doi:10.1007/s11307-016-0951-z.
- Lee, C. *et al.* (2010) 'The UF family of reference hybrid phantoms for computational radiation dosimetry', *Physics in Medicine and Biology*, 55(2), pp. 339–363. doi:10.1088/0031-9155/55/2/002.
- Locatelli, M. (2012) 'Modèle anatomique et élaboration d'un logiciel de calcul de dose en contamination interne pour les rongeurs', *Mémoire de stage réalisé à l'IRSN, dans le cadre du Master de physique médicale de la Faculté de Médecine Paris-Sud* [Preprint].
- Locatelli, M. *et al.* (2017) 'RODES software for dose assessment of rats and mice contaminated with radionuclides', *Journal of Radiological Protection*, 37(1), pp. 214–229. doi:10.1088/1361-6498/aa58aa.
- Loke, K.S.H. *et al.* (2011) 'Dosimetric Considerations in Radioimmunotherapy and Systemic Radionuclide Therapies: A Review', *World Journal of Nuclear Medicine*, 10(2), p. 17.
- Makris, N.E. *et al.* (2015) 'PET/CT-Derived Whole-Body and Bone Marrow Dosimetry of ^{89}Zr -Cetuximab', *Journal of Nuclear Medicine*, 56(2), pp. 249–254. doi:10.2967/jnumed.114.147819.
- Martí-Climent, J.M. *et al.* (2017) 'Effective dose estimation for oncological and neurological PET/CT procedures', *EJNMMI Research*, 7(1), p. 37. doi:10.1186/s13550-017-0272-5.
- Nedrow, J.R. *et al.* (2017) 'Pharmacokinetics, microscale distribution, and dosimetry of alpha-emitter-labeled anti-PD-L1 antibodies in an immune competent transgenic breast cancer model', *EJNMMI Research*, 7(1), p. 57. doi:10.1186/s13550-017-0303-2.
- O'Donoghue, J.A. *et al.* (2018) 'Pharmacokinetics, Biodistribution, and Radiation Dosimetry for ^{89}Zr -Trastuzumab in Patients with Esophagogastric Cancer', *Journal of Nuclear Medicine*, 59(1), pp. 161–166. doi:10.2967/jnumed.117.194555.
- O'Donoghue, J.A. *et al.* (2019) 'Pharmacokinetics and Biodistribution of a [^{89}Zr]Zr-DFO-MSTP2109A Anti-STEAP1 Antibody in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Patients', *Molecular Pharmaceutics*, 16(7), pp. 3083–3090. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00326.
- Pandit-Taskar, N. *et al.* (2014) ' ^{89}Zr -huJ591 immuno-PET imaging in patients with advanced metastatic prostate cancer', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 41(11), pp. 2093–2105. doi:10.1007/s00259-014-2830-7.
- Pandit-Taskar, N. *et al.* (2016) 'First-in-Human Imaging with ^{89}Zr -Df-IAB2M Anti-PSMA Minibody in Patients with Metastatic Prostate Cancer: Pharmacokinetics, Biodistribution, Dosimetry, and Lesion Uptake', *Journal of Nuclear Medicine*, 57(12), pp. 1858–1864. doi:10.2967/jnumed.116.176206.
- RADAR Phantoms (no date). Available at: <https://www.doseinfo-radar.com/RADARphan.html> (Accessed: 14 August 2021).
- Segars, W. (2004) 'Development of a 4-D digital mouse phantom for molecular imaging research', *Molecular Imaging & Biology*, 6(3), pp. 149–159. doi:10.1016/j.mibio.2004.03.002.

Snyder, W.S. *et al.* (1975) ‘“S.” absorbed dose per unit cumulated activity for selected radionuclides and organs’, *New York: Society of Nuclear Medicine*, MIRD Pamphlet No 11.

Stabin, M.G. (2008) *Fundamentals of Nuclear Medicine Dosimetry*. New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-0-387-74579-4.

Stabin, M.G. and Siegel, J.A. (2018) ‘RADAR Dose Estimate Report: A Compendium of Radiopharmaceutical Dose Estimates Based on OLINDA/EXM Version 2.0’, *Journal of Nuclear Medicine*, 59(1), pp. 154–160. doi:10.2967/jnumed.117.196261.

Stabin, M.G., Sparks, R.B. and Crowe, E. (2005) ‘OLINDA/EXM: The Second-Generation Personal Computer Software for Internal Dose Assessment in Nuclear Medicine’, *Journal of Nuclear Medicine*, 46, pp. 1023–1027.

Ulaner, G.A. *et al.* (2018) ‘First-in-Human Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Targeted Imaging Using ⁸⁹Zr-Pertuzumab PET/CT: Dosimetry and Clinical Application in Patients with Breast Cancer’, *Journal of Nuclear Medicine*, 59(6), pp. 900–906. doi:10.2967/jnumed.117.202010.

III. Suivi de la dynamique d'expression tumorale de PD-L1 dans des modèles de CPNPC humain

Introduction

La régulation de l'expression de PD-L1 à la surface des cellules cancéreuses est complexe et fortement dynamique. Celle-ci repose sur des facteurs intrinsèques à la cellule, qui influencent l'expression constitutive de PD-L1 à de multiples niveaux. Notamment, l'activation anormale de voies de signalisation et de facteurs de transcription oncogènes conduit à la surexpression de PD-L1 dans de nombreux types de cancer. L'expression tumorale de PD-L1 peut également être induite par des stimuli externes, provenant du microenvironnement tumoral (TME). Enfin, les diverses thérapies reçues par le patient (par ex. radiothérapie, chimiothérapie) sont également susceptibles de moduler cette expression.

Les traitements qui régulent positivement l'expression tumorale de PD-L1 peuvent promouvoir le développement de résistances, en réprimant la réponse immunitaire engagée contre la tumeur. Le suivi global des variations d'expression de PD-L1 par imagerie TEP au cours de la thérapie permettrait de mieux prédire cet échappement immunitaire associé à une perte d'efficacité, sans avoir besoin d'effectuer des biopsies répétées. La stratégie thérapeutique pourrait alors être rationalisée en fonction de l'évolution du statut PD-L1 tumoral du patient, en ajoutant par exemple une immunothérapie anti-PD-1 ou anti-PD-L1 au traitement initial en cas d'activation positive de PD-L1.

Comme présenté dans le Chapitre I, le fragment ^{89}Zr -Fab C4 et le double mutant ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) ont chacun permis de visualiser efficacement par TEP l'expression de PD-L1 dans des xénogreffes humaines de CPNPC, avec une PK plus rapide que le ^{89}Zr -IgG C4 parental. Le prochain objectif serait de montrer que ces nouveaux radioligands anti-PD-L1 pourraient également être utilisés pour détecter par TEP les changements d'expression tumorale de PD-L1 induits par un traitement thérapeutique. Nous avons donc tout d'abord cherché des composés pharmacologiques capables de moduler l'expression de PD-L1 à la surface des cellules cancéreuses. Diverses études dans des modèles de CPNPC ont montré l'implication de la voie de signalisation oncogène mTOR dans la régulation de l'expression tumorale de PD-L1. De même, les protéines à bromodomaine et domaine extraterminal (protéines BET), activant la transcription de protéines oncogènes, ont été identifiées comme régulant l'expression de PD-L1 dans de nombreux cancers dont le CPNPC. En se basant sur ces résultats, nous avons étudié l'effet du traitement avec l'inhibiteur de mTOR everolimus, ou avec l'inhibiteur des protéines BET JQ1, sur l'expression de PD-L1 dans plusieurs lignées cellulaires humaines de CPNPC.

La partie 1 de ce chapitre introduit les divers facteurs impliqués dans la régulation de l'expression de PD-L1 à la surface des cellules cancéreuses, en s'intéressant plus en détails aux rôles joués par la voie mTOR et les protéines BET. Les études ayant détecté les variations d'expression tumorale de PD-L1 induites par divers traitements grâce à l'imagerie TEP sont également présentées. La partie 2 de ce chapitre est quant à elle dédiée aux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse sur la modulation de l'expression de PD-L1 dans des lignées cellulaires humaines de CPNPC PD-L1⁺ traitées avec l'everolimus ou avec JQ1.

1. Régulation dynamique de l'expression tumorale de PD-L1 et suivi des variations d'expression par imagerie TEP

1.1. Régulation de l'expression tumorale de PD-L1 par de nombreux mécanismes

La protéine PD-L1 est surexprimée dans de nombreux cancers, dont le CPNPC. Skov *et al.* ont étudié par IHC la prévalence d'expression de PD-L1 sur des échantillons tumoraux de 791 patients souffrant de CPNPC : 63 % des échantillons avaient ≥ 1 % et 30 % des échantillons avaient ≥ 50 % de cellules tumorales PD-L1⁺. Les stades plus avancés et les adénocarcinomes étaient associés à une expression plus importante de PD-L1, en comparaison des stades moins avancés et des carcinomes épidermoïdes respectivement (Skov *et al.*, 2020).

La surexpression constitutive de PD-L1 à la surface des cellules tumorales est le résultat d'altérations aux niveaux génétique, épigénétique, transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Quelques exemples généraux (non exhaustifs) de ces mécanismes sont présentés ci-dessous (Figure 47).

- *Altération du nombre de copies du gène codant pour PD-L1.* L'amplification de la région chromosomique 9p24.1, contenant le gène CD274 codant pour la protéine PD-L1, a été associée à une surexpression de PD-L1 dans plusieurs types de tumeurs (Sun, Mezzadra and Schumacher, 2018; Ju *et al.*, 2020).
- *Activation anormale de facteurs de transcription.* Plusieurs facteurs de transcription oncogènes ont été identifiés comme activant la transcription de PD-L1, incluant c-Myc, STAT1/3, HIF-1 α et NF-k β (Sun, Mezzadra and Schumacher, 2018; Ju *et al.*, 2020) (Figure 47). Le facteur de transcription c-Myc est surexprimé dans divers cancers, dont environ 59 % des CPNPCs (Zhu *et al.*, 2020). Casey *et al.* ont montré que c-Myc se liait directement au promoteur du gène CD274, et que l'inactivation du facteur de transcription entraînait une diminution de l'expression de PD-L1 dans plusieurs lignées cancéreuses (Casey *et al.*, 2016). En accord avec ces résultats, Kim *et al.* ont trouvé que les expressions de c-Myc et de PD-L1, mesurées par IHC sur des échantillons tumoraux provenant de 84 patients souffrant de CPNPC, étaient significativement corrélées (Kim *et al.*, 2017).
- *Surexpression de protéines oncogènes et/ou perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeur.* Les facteurs de transcription stimulant l'expression de PD-L1 sont contrôlés par plusieurs voies de signalisation intracellulaires interconnectées, dont les voies majeures PI3K/Akt/mTOR, Ras/Raf/MEK/ERK et JAK/STAT (Sun, Mezzadra and Schumacher, 2018; Ju *et al.*, 2020) (Figure 47). Dans les cellules tumorales, l'activation anormale de ces voies de signalisation oncogènes peut donc conduire à la surexpression de PD-L1. Par exemple, les CPNPCs montrent fréquemment des mutations activatrices du récepteur EGFR (14 % des adénocarcinomes pulmonaires) et de la protéine KRAS (33 % des adénocarcinomes pulmonaires) (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). La perte d'expression du gène suppresseur de tumeur PTEN, qui inhibe normalement la voie PI3K/Akt/mTOR, est aussi associée à une augmentation de l'expression de PD-L1 dans le CPNPC (Lamberti *et al.*, 2020).

- *Régulation épigénétique de la traduction de PD-L1.* Après la transcription, de petits ARNs non codants, appelés micro-ARNs (miARNs), peuvent se lier à la région 3' non traduite (3'-UTR) de l'ARN messager (ARNm) de PD-L1 pour inhiber sa traduction (Lamberti *et al.*, 2020) (Figure 47). Par exemple, le miARN miR-34a a été identifié comme réduisant l'expression de PD-L1 dans des lignées cellulaires de CPNPC (Cortez *et al.*, 2016). Cette étude a également montré que la transcription du miR-34a était induite par l'expression du gène suppresseur de tumeur TP53 (protéine p53), qui est inactivé dans 46 % des adénocarcinomes pulmonaires (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014; Cortez *et al.*, 2016). L'influence des miARNs sur l'expression de PD-L1 peut également être indirecte, via leur liaison à l'ARNm d'autres protéines impliquées dans sa régulation (Sun, Mezzadra and Schumacher, 2018).
- *Modifications post-traductionnelles de PD-L1.* Diverses modifications post-traductionnelles de la protéine PD-L1 (par ex. ubiquitination, glycosylation, phosphorylation) peuvent moduler sa stabilité, sa localisation intracellulaire et sa vitesse de dégradation (Figure 47). La phosphorylation et la poly-ubiquitination de PD-L1 régulent son expression négativement, en conduisant à sa dégradation par le protéasome. La glycosylation de PD-L1 favorise au contraire sa stabilité et empêche sa dégradation (Ju *et al.*, 2020; Lamberti *et al.*, 2020).

Divers facteurs extrinsèques à la cellule cancéreuse peuvent également renforcer l'expression tumorale de PD-L1 (Figure 47). Notamment, la cytokine IFN- γ , sécrétée par les lymphocytes T et les cellules NK activés dans le TME, a été identifiée comme un stimulateur majeur de l'expression de PD-L1 dans divers cancers, dont le CPNPC (Lamberti *et al.*, 2020). La liaison de l'IFN- γ à son récepteur à la surface des cellules tumorales conduit à l'expression de divers facteurs de transcription via la voie de signalisation JAK/STAT. Parmi eux, le facteur de transcription IRF1 se lie directement au promoteur du gène CD274 de PD-L1 pour activer sa transcription (Sun, Mezzadra and Schumacher, 2018; Ju *et al.*, 2020). En plus de l'IFN- γ , d'autres cytokines pro-inflammatoires (par ex. IFN- α , IFN- β , TNF- α , IL-17, IL-27, IL-4) régulent positivement l'expression tumorale de PD-L1.

Enfin, l'expression tumorale de PD-L1 peut être modulée par certains traitements thérapeutiques reçus par le patient, comme la radiothérapie ou la chimiothérapie. En effet, même si ces thérapies induisent une mort cellulaire immunogène capable de (ré)enclencher une réponse immunitaire anti-tumorale, elles sont aussi à l'origine d'une activation de l'expression de PD-L1 par les cellules cancéreuses (Gong *et al.*, 2018; Bailly, Thuru and Quesnel, 2020). Par exemple, l'évolution de l'expression de PD-L1, avant et après chimiothérapie à base de platine, a été évaluée par IHC sur des échantillons tumoraux de 86 patients souffrant de CPNPC. Une proportion significative de patients (environ 1 tiers) présentait des biopsies tumorales PD-L1⁻ avant chimiothérapie mais PD-L1⁺ après traitement (TPS > 1 %) (Shin *et al.*, 2019).

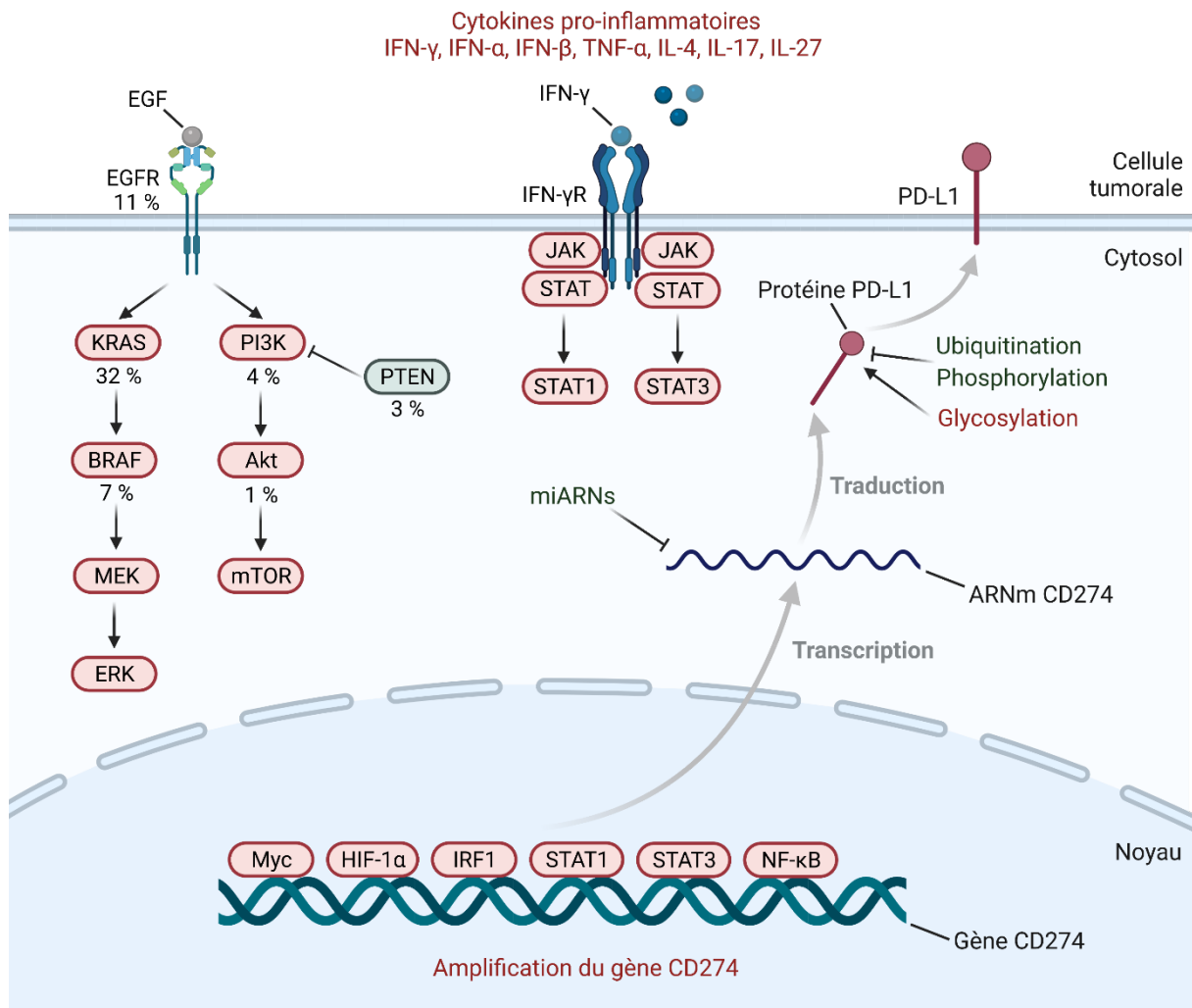


Figure 47. Régulation de l'expression tumorale de PD-L1. De nombreux mécanismes sont impliqués dans la régulation de l'expression constitutive de PD-L1 à la surface des cellules tumorales, agissant aux niveaux génétique, transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. La dérégulation des voies de signalisation oncogènes est un des facteurs majeurs conduisant à la surexpression de PD-L1. Des signaux externes, comme les cytokines pro-inflammatoires, contribuent également à l'induction de l'expression tumorale de PD-L1. Sur la figure, les protéines et mécanismes ayant une influence positive sur l'expression de PD-L1 sont indiqués en rouge, tandis que ceux régulant PD-L1 négativement sont indiqués en vert. Pour certaines protéines, le pourcentage de mutations quantifié dans les adénocarcinomes pulmonaires est indiqué (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Abréviations : ARN, acide ribonucléique ; ARNm, ARN messager ; CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; EGF, « epidermal growth factor » ; EGFR, « epidermal growth factor receptor » ; ERK, « extracellular signal-regulated kinase » ; HIF, « hypoxia inducible factor » ; IFN, interféron ; IFN- γ R, récepteur de l'interféron IFN- γ ; IL, interleukine ; IRF1, « interferon regulatory factor 1 » ; JAK, « Janus kinase » ; MEK, « mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase » ; miARN, microARN ; mTOR, « mechanistic target of rapamycin » ; NF- κ B, « nuclear factor-kappa B » ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; PI3K, « phosphoinositide 3-kinase » ; PTEN, « phosphatase and tensin homolog » ; STAT, « signal transducer and activator of transcription » ; TNF, « tumor necrosis factor ».

En plus de la chimiothérapie et de la radiothérapie, des traitements ciblant les voies de signalisation intracellulaires oncogènes sont également susceptibles d'impacter l'expression tumorale de PD-L1. Plus particulièrement, les effets de l'inhibition de la voie mTOR ou des protéines BET sur l'expression de PD-L1 sont présentés plus en détail dans les parties suivantes.

1.2. Régulation de l'expression tumorale de PD-L1 par la voie mTOR

La protéine mTOR (« mechanistic target of rapamycin ») est une sérine/thréonine kinase constituant la sous-unité catalytique de 2 complexes multiprotéiques structurellement et fonctionnellement distincts (Laplante and Sabatini, 2009) :

- Le complexe mTORC1 composé, en plus de mTOR, de 4 autres protéines dont Raptor (Figure 48).
- Le complexe mTORC2 comprenant, en plus de mTOR, 5 autres protéines dont Rictor.

En intégrant de multiples signaux, à la fois intracellulaires (par ex. statut énergétique de la cellule) et extracellulaires (par ex. facteurs de croissance, acides aminés, oxygène), la voie de signalisation mTOR agit comme un régulateur central du métabolisme, de la croissance et de la survie cellulaire. Les complexes mTORC1 et mTORC2 catalysent la phosphorylation de nombreuses protéines cibles, conduisant à l'activation de processus anaboliques (par ex. synthèse de protéines, de lipides, d'organelles) et à l'inhibition de processus cataboliques (par ex. autophagie) (Laplante and Sabatini, 2009).

Le complexe mTORC1 régule positivement la synthèse protéique via la phosphorylation de la protéine 4E-BP1 et de la kinase S6K1 (Figure 48). La phosphorylation de 4EBP1 empêche sa liaison inhibitrice avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, qui est alors libre de promouvoir la traduction de ses ARNm cibles. Une fois phosphorylée, la kinase S6K1 activée phosphoryle à son tour la protéine S6. Les voies de signalisation en aval de la protéine p-S6 stimulent alors la synthèse d'ARNm et de protéines (Laplante and Sabatini, 2009).

Dans de nombreux cancers, l'activation anormale de la voie de signalisation mTOR joue un rôle majeur dans la croissance, la migration et l'invasion des cellules tumorales. mTORC1 peut notamment stimuler la transcription et la traduction de protéines oncogènes (Hua *et al.*, 2019). Compte tenu de son importance dans le développement tumoral, mTOR représente une cible thérapeutique attractive. Plusieurs inhibiteurs de la protéine ont ainsi été développés (Hua *et al.*, 2019). La rapamycine (sirolimus) et ses analogues (appelés rapalogues), comme l'everolimus ou le temsirolimus, sont des inhibiteurs allostériques du complexe mTORC1, mais non du complexe mTORC2. Afin d'inhiber la voie mTOR de manière plus complète, des inhibiteurs compétitifs de liaison à l'ATP (nécessaire à la réaction de phosphorylation par la kinase) ont été produits. Ces inhibiteurs (appelés TORKinibs), comme INK128 (MLN0128) ou AZD805, ciblent mTORC1 et mTORC2. Enfin, des composés capables d'inhiber à la fois mTORC1/2 et la kinase PI3K existent également, permettant ainsi une suppression renforcée de la voie PI3K/Akt/mTOR. L'everolimus a été approuvé par l'EMA pour le traitement de carcinomes rénaux et de cancers du sein avancés, ainsi que de tumeurs pancréatiques neuroendocrines (Hua *et al.*, 2019). Cependant, le succès clinique des inhibiteurs de mTOR dans la majorité des cancers solides (y compris le CPNPC) reste peu concluant, les tumeurs développant généralement des résistances (Fumarola *et al.*, 2014).

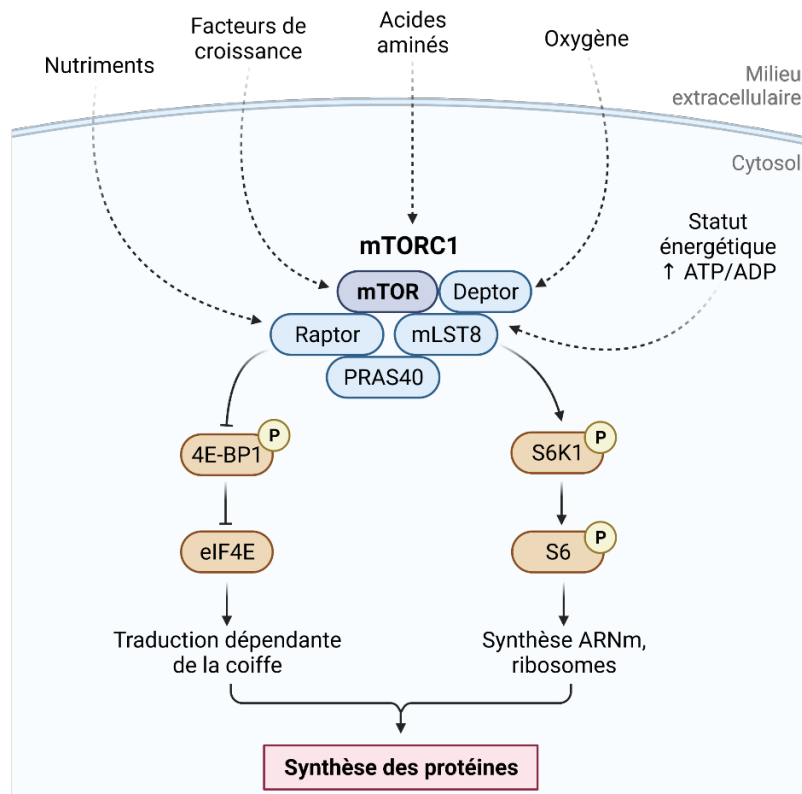


Figure 48. Activation de la synthèse protéique par le complexe mTORC1. En réponse à divers signaux intracellulaires et extracellulaires, le complexe mTORC1 phosphoryle les protéines 4E-BP1 et S6K1, stimulant alors la synthèse protéique. Abréviations : ADP, adésonine diphosphate ; ARNm, ARN messenger ; ATP, adénosine triphosphate ; Deptor, « DEP-domain-containing mTOR-interacting protein » ; eIF4E, « eukaryotic translation initiation factor 4E » ; mLST8, « mammalian lethal with Sec13 protein 8 » ; mTOR, « mechanistic target of rapamycin » ; mTORC1, « mechanistic target of rapamycin complex 1 » ; P, phosphorylation ; PRAS40, « proline rich AKT substrate 40 kDa » ; Raptor, « regulatory-associated protein of mTOR » ; S6, « p70 ribosomal protein S6 » ; S6K1, « p70 ribosomal protein S6 kinase 1 » ; 4E-BP1, « eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 ».

Concernant la régulation de l'expression de PD-L1 par la voie mTOR dans le CPNPC, plusieurs études précliniques ont généré des résultats conflictuels.

Deux études ont montré que le traitement de diverses lignées cellulaires humaines de CPNPC PD-L1⁺ (dont la lignée H1975) avec des inhibiteurs de mTORC1 (rapamycin) ou de mTORC1/mTORC2 (AZD805, MTI-31) diminuait bien l'activation du complexe mTORC1, comme illustré par l'expression réduite de la protéine S6 phosphorylée (p-S6) (Figure 49). Cette inhibition pharmacologique de mTORC1 était associée à une diminution de l'expression protéique de PD-L1 (Lastwika *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019) (Figure 49). Lastwika *et al.* ont également étudié l'effet de la rapamycine sur l'expression de PD-L1 *in vivo*, dans un modèle de souris génétiquement modifiées pour développer des cancers du poumon (expression des protéines oncogéniques KRAS^{G12D} et EGFR^{L858R/T790M}) et dans un modèle de cancer du poumon induit par le carcinogène spécifique au tabac NKK. L'activation de mTORC1 et l'expression de PD-L1 (mesurées par IHC) était significativement réduites dans les tumeurs pulmonaires des souris traitées avec la rapamycine (Lastwika *et al.*, 2016). Enfin, Lastwika *et al.* ont analysé par IHC l'expression de PD-L1 et de p-S6 dans des échantillons humains de CPNPC (63 adénocarcinomes

et 96 carcinomes épidermoïdes). Une corrélation positive significative a été trouvée entre l'expression de PD-L1 et l'activation de mTORC1 (expression de p-S6) (Lastwika *et al.*, 2016).

A l'opposé total de ces résultats, une autre étude a montré que le blocage de la voie mTOR dans les cellules tumorales par des inhibiteurs de mTORC1 (rapamycin) ou de mTORC1/mTORC2 (INK128, AZD8055) diminuait toujours bien l'activation du complexe mTORC1 (niveaux réduits de p-S6), mais augmentait au contraire cette fois-ci l'expression de PD-L1 de manière plus ou moins intense (Figure 49). Ces résultats ont été observés dans plusieurs lignées cellulaires humaines PD-L1⁺ de cancers du poumon (dont la lignée H1975), du côlon, de la prostate et du sein (Deng *et al.*, 2019). Tout comme dans l'étude de Lastwika *et al.*, Deng *et al.* ont aussi étudié par IHC l'expression de PD-L1 et de p-S6 dans des échantillons humains de CPNPC (98 adénocarcinomes et 96 carcinomes épidermoïdes). Cependant, l'expression positive de PD-L1 dans ces tissus était cette fois-ci significativement associée à une expression négative de p-S6 (Deng *et al.*, 2019). Il est cependant à souligner que les 2 études n'ont pas utilisé les mêmes clones pour les anticorps anti-PD-L1 et anti-p-S6, ni les mêmes méthodes de score pour évaluer l'expression des 2 protéines. Par exemple, le seuil de positivité pour l'expression de p-S6 était placé à $\geq 10\%$ contre seulement $\geq 5\%$ des cellules tumorales marquées dans les études de Lastwika *et al.* et Deng *et al.*, respectivement (Lastwika *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2019).

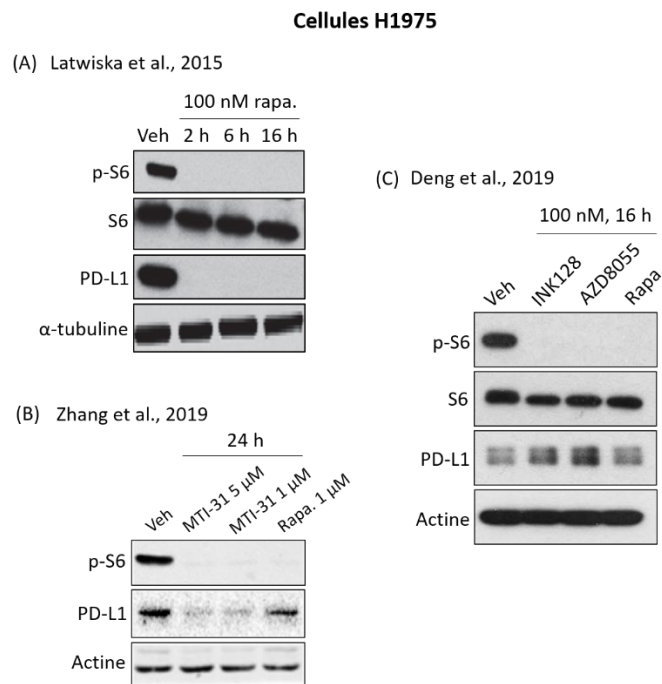


Figure 49. Effet de l'inhibition de la voie mTOR sur l'expression de PD-L1 dans la lignée cellulaire humaine de CPNPC H1975. Les cellules H1975, exprimant PD-L1 de manière constitutive, ont été traitées pendant les durées précisées sur la figure avec un inhibiteur de mTORC1 (rapamycine) ou avec des inhibiteurs de mTORC1/mTORC2 (MTI-31, AZD805, INK128) aux concentrations indiquées. (A) Figure adaptée de Lastwika *et al.*, 2016. (B) Figure adaptée de Zhang *et al.*, 2019. (C) Figure adaptée de Deng *et al.*, 2019. Abréviations : p, phosphorylation ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; rapa., rapamycine ; S6, « p70 ribosomal protein S6 » ; Veh, véhicule.

Les études menées par Lastwika *et al.* et Zhang *et al.* indiquent ainsi que l'activation de la voie de signalisation mTOR régule positivement l'expression de PD-L1 dans le CPNPC. Au contraire, les résultats obtenus par Deng *et al.* suggèrent que l'activation de cette voie régule négativement l'expression de PD-L1 dans le CPNPC.

En plus de la voie mTOR, les protéines BET semblent également participer au contrôle de l'expression tumorale de PD-L1, en régulant directement sa transcription et celle d'autres facteurs oncogènes.

1.3. Régulation de l'expression tumorale de PD-L1 par les protéines BET

La famille des protéines à bromodomaine et domaine extraterminal (protéines BET), faisant partie du grand groupe des protéines à bromodomaine (BRD), est composée des protéines ubiquitaires BRD2, BRD3 et BRD4 et de la protéine spécifique aux testicules BRDT (Ferri, Petosa and McKenna, 2016). BRD4 est la protéine BET dont le rôle a été le mieux caractérisé. Les protéines BET possèdent 2 bromodomains (BD1 et BD2) capables de se lier aux résidus lysine acétylés présents sur la queue des histones et sur certains facteurs de transcription (Ferri, Petosa and McKenna, 2016).

Une fois liées aux histones acétylées, les protéines BET recrutent diverses protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine et dans la régulation de la transcription (Ferri, Petosa and McKenna, 2016). Plus précisément, la protéine BRD4 interagit avec les histones acétylées au niveau des régions promotrices et des séquences amplificatrices (« enhancer ») de certains gènes cibles. BRD4 recrute et active ensuite le facteur d'élongation de la transcription P-TEFb. Une fois activé, P-TEFb phosphoryle l'ARN polymérase II initialement en pause, stimulant alors l'élongation de la transcription (Ferri, Petosa and McKenna, 2016) (Figure 50).

Les protéines BET sont essentielles à la progression correcte du cycle cellulaire et au développement normal des cellules. Cependant, ces protéines sont fréquemment dérégulées dans les cellules tumorales (par ex. par mutations ou réarrangements du gène codant pour BRD4) (White, Fenger and Carson, 2019). Or, la surexpression des protéines BET augmente la transcription de protéines oncogènes (par ex. c-Myc) et de cytokines pro-inflammatoires, favorisant le développement, la progression et l'invasion tumorale (White, Fenger and Carson, 2019). L'inhibition de ces protéines apparaît donc comme une stratégie thérapeutique intéressante pour lutter contre le cancer. Plusieurs inhibiteurs des protéines BET ont été développés, dont la triazolodiazépine JQ1 (Filippakopoulos *et al.*, 2010). Ces inhibiteurs se lient de manière compétitive aux bromodomains des 4 protéines BET, empêchant alors leur liaison avec les histones acétylées sur la chromatine (Ferri, Petosa and McKenna, 2016).

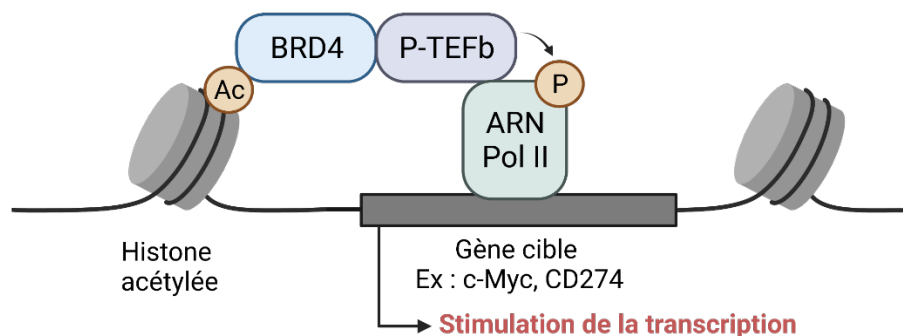


Figure 50. Régulation de la transcription par la protéine BRD4. BRD4 se lie via ses bromodomains aux résidus lysine acétylés des histones et recrute le facteur d'élongation de la transcription P-TEFb. Celui-ci phosphoryle l'ARN polymérase II, ce qui active alors l'élongation de la transcription du gène cible. Abréviations : Ac, acétylation ; ARN Pol II, ARN polymérase II ; BRD, bromodomaine ; P, phosphorylation ; P-TEFb, « positive transcription elongation factor ».

Dans de nombreux modèles tumoraux précliniques, l'inhibition pharmacologique des protéines BET avec JQ1 a réduit la croissance tumorale et amélioré la survie globale. L'effet anti-tumoral de JQ1 a notamment été observé pour des cancers hématologiques (par ex. lymphome) (Hogg *et al.*, 2017) ainsi que dans diverses tumeurs solides (par ex. CPNPC, glioblastome, cancers du sein, du colon, du pancréas et des ovaires) (Cheng *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2016; da Motta *et al.*, 2017; Adeegbe *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2019). Même si aucun inhibiteur des protéines BET n'a encore été approuvé cliniquement, plusieurs composés sont actuellement testés en phase I ou II sur des patients souffrant de cancers hématologiques et/ou de cancers solides (Alqahtani *et al.*, 2019). La protéine JQ1 n'est pas transposable en clinique en raison de sa courte durée de vie, mais des composés structurellement similaires ont été investigués, comme le birabresib (MK-8628/OTX015) (Lewin *et al.*, 2018). Cependant, ces essais cliniques ont pour l'instant démontré un faible succès des inhibiteurs de BET en monothérapie, motivant leur combinaison avec d'autres agents anti-tumoraux (par ex. inhibiteurs de tyrosine kinase, immunothérapies) pour augmenter le bénéfice thérapeutique (White, Fenger and Carson, 2019).

Plusieurs études ont montré que les protéines BET, et plus particulièrement la protéine BRD4, régulaient l'expression tumorale de PD-L1 *in vitro* (Tableau 24). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont mis en évidence la liaison directe de BRD4 au promoteur du gène CD274 de PD-L1, permettant ainsi d'activer sa transcription (Zhu *et al.*, 2016; Hogg *et al.*, 2017; Andrieu *et al.*, 2019; Jing *et al.*, 2020). Cette association a été fortement réduite par traitement des cellules avec JQ1. En accord avec ces observations, l'expression de PD-L1 (constitutive ou induite par l'IFN- γ) dans différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines et murines a été significativement inhibée par JQ1, à la fois au niveau transcriptionnel (ARNm) et protéique (Tableau 24). Le traitement JQ1 a également diminué l'expression de PD-L1 *in vivo* dans divers modèles précliniques de tumeurs humaines et murines (Tableau 24).

Tableau 24. Effet de l'inhibition des protéines BET avec JQ1 sur l'expression tumorale de PD-L1. Les études présentées dans le tableau ont montré que l'inhibition pharmacologique des protéines BET avec JQ1 diminuait l'expression de PD-L1 dans diverses lignées cellulaires cancéreuses ainsi que dans des modèles précliniques de tumeurs humaines et murines.

Modèle tumoral	Référence
<i>In vitro</i> : lignées cellulaires humaines CSTN	Andrieu <i>et al.</i> , 2019
<i>In vitro</i> : cellules primaires humaines de carcinome à cellules rénales, lignées cellulaires humaines cancers poumon, foie et prostate	Liu <i>et al.</i> , 2019
<i>In vitro</i> : lignées cellulaires humaines cancer des ovaires	
<i>In vivo</i> : souris immunocompétentes avec tumeurs des ovaires murines orthotopiques	Zhu <i>et al.</i> , 2016
<i>In vitro</i> : lignée cellulaire murine lymphome à cellules B	
<i>In vivo</i> : souris immunocompétentes avec lymphome à cellules B murin	Hogg <i>et al.</i> , 2017
<i>In vitro</i> : lignées cellulaires humaines neuroblastome	
<i>In vivo</i> : souris immunodéficientes avec xénogreffes humaines neuroblastome sc.	Melaiu <i>et al.</i> , 2017
<i>In vitro</i> : lignées cellulaires humaines adénocarcinome du pancréas	
<i>In vivo</i> : souris immunodéficientes avec xénogreffes humaines adénocarcinome du pancréas sc., souris immunocompétentes avec tumeurs du pancréas murines sc.	Pan <i>et al.</i> , 2019
<i>In vitro</i> : lignées cellulaires humaines et murines CSTN	
<i>In vivo</i> : souris immunocompétentes avec tumeurs CSTN murines orthotopiques	Jing <i>et al.</i> , 2020

Abréviations : CSTN, cancer du sein triple négatif ; sc., sous-cutanées.

Certaines études ont montré que JQ1 inhibait l'expression tumorale de c-Myc *in vitro* et *in vivo* (Melaiu *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2019). Par ailleurs, dans ces mêmes études, c-Myc est apparu comme un stimulateur majeur de l'expression tumorale de PD-L1, en accord avec d'autres résultats préalablement publiés (Casey *et al.*, 2016; Melaiu *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2019). La diminution d'expression de PD-L1 en réponse au traitement JQ1 serait donc due, entre autres, à l'inactivation de c-Myc par JQ1.

Cependant, dans d'autres études, le traitement de lignées cellulaires cancéreuses avec JQ1 (dont la lignée de CPNPC H1975) n'a eu aucun impact sur l'expression de c-Myc par ces cellules (Lockwood *et al.*, 2012; Hogg *et al.*, 2017). Pourtant, là encore, une réduction de l'expression de PD-L1 a bien été observée (Hogg *et al.*, 2017). Dans ces cellules, l'inhibition des protéines BET a dû impacter d'autres protéines cibles que c-Myc, également impliquées dans la régulation de PD-L1. Justement, en analysant l'expression des gènes dans différentes lignées cellulaires de cancer du poumon traitées avec JQ1 (dont la lignée H1975), Lockwood *et al.* ont identifié le gène FOSL1 comme l'un des plus réprimés par le traitement (Lockwood *et al.*, 2012). Ce gène code pour la protéine FRA1 (« Fos-related antigen 1 ») qui se lie à la protéine JUN pour former le facteur de transcription oncogène AP-1, régulant la prolifération, la différenciation et l'invasion des cellules tumorales (Jiang *et al.*, 2020). Dans les cellules de cancer du poumon, le traitement avec JQ1 a effectivement diminué le niveau d'expression de FRA1 (ARNm et protéine) (Lockwood *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'implication de FRA1 dans la régulation de PD-L1 a également été mis en évidence dans des cellules épithéliales bronchiques humaines prémaxillaires

(Lee *et al.*, 2020). Ainsi, la diminution d'expression de PD-L1 en réponse au traitement JQ1 pourrait également être dû à l'inactivation de FRA1 par JQ1.

La combinaison thérapeutique de JQ1 avec un anticorps anti-PD-1 ou anti-PD-L1 a montré une activité anti-tumorale synergique dans divers modèles précliniques de cancers murins (Zhu *et al.*, 2016; Hogg *et al.*, 2017; Adeegbe *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2019; Jing *et al.*, 2020). En plus de réduire l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales et de certaines cellules immunitaires (par ex. cellules dendritiques, macrophages), la combinaison des 2 traitements a permis de réactiver l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ infiltrés dans le TME, tout en diminuant le nombre de lymphocytes T régulateurs pro-tumorigènes. Par exemple, le traitement de souris transgéniques ayant développé un CPNPC avec la combinaison JQ1 + anticorps anti-PD-1 a réduit la croissance tumorale et amélioré la survie (temps de survie médian de 87 jours), en comparaison des souris traitées uniquement avec l'anticorps anti-PD-1 (TSM de 69 jours) et des souris contrôles traitées uniquement avec le véhicule (TSM de 16 jours) (Adeegbe *et al.*, 2018). La suppression ciblée de l'axe PD-1/PD-L1 en combinant un inhibiteur des protéines BET et un anticorps anti-PD-1/PD-L1 apparaît donc comme une stratégie thérapeutique prometteuse pour traiter les tumeurs solides comme le CPNPC.

Comme présenté jusqu'ici, l'expression de PD-L1 à la surface des cellules cancéreuses résulte d'une régulation complexe et fortement dynamique, et est susceptible d'évoluer avec les traitements anti-tumoraux reçus par le patient. Le suivi du statut PD-L1 des tumeurs du patient par imagerie TEP au cours de la thérapie permettrait de détecter ces changements d'expression, sans avoir besoin de réaliser des biopsies répétées. Cette approche pourrait par exemple identifier une activation positive de l'expression tumorale de PD-L1 induite par un certain traitement, qui pourrait alors rendre le patient éligible à une immunothérapie anti-PD-1/anti-PD-L1.

1.4. Suivi des variations d'expression tumorale de PD-L1 induites par divers traitements par imagerie TEP

Plusieurs études précliniques ont montré qu'il était effectivement possible de visualiser et quantifier par imagerie TEP les changements d'expression tumorale de PD-L1 induits par divers traitements (chimiothérapie, radiothérapie) *in vivo*.

L'IgG C4 anti-PD-L1 utilisé dans cette thèse, radiomarcqué au ⁸⁹Zr, a préalablement permis de détecter par immunoTEP les variations d'expression tumorale de PD-L1 en réponse au traitement avec les agents cytotoxiques paclitaxel ou doxorubicine. Le paclitaxel a activé l'expression de PD-L1 à la surface des cellules humaines de CPNPC H1975 *in vitro*, tandis que la doxorubicine a inhibé cette expression. En accord avec ces résultats, l'accumulation du ⁸⁹Zr-IgG C4 était significativement plus élevée dans les tumeurs H1975 des souris traitées avec le paclitaxel tandis qu'elle était plus faible dans les tumeurs H1975 des souris traitées avec la doxorubicine, en comparaison des souris traitées uniquement avec le véhicule (Truillet *et al.*, 2018) (Figure 51).

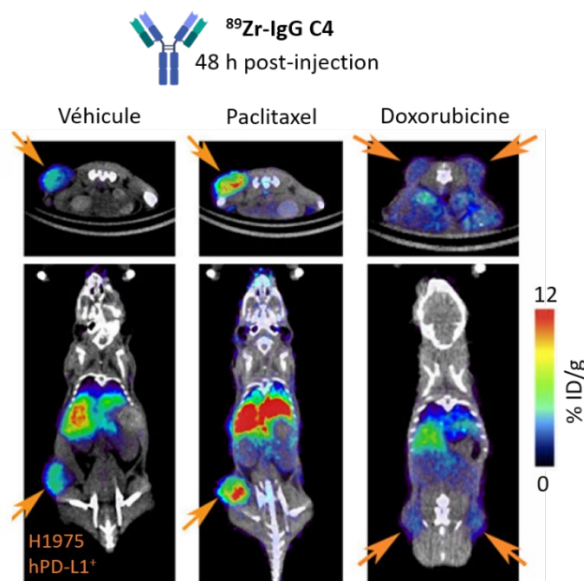


Figure 51. Détection par imagerie TEP des variations d'expression tumorale de PD-L1 après chimiothérapie dans un modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1⁺. Images TEP/TDM de souris nues portant des xénogreffes humaines sous-cutanées de CPNPC H1975 PD-L1⁺ (flèches orange), 48 h après administration du radioligand anti-PD-L1 ⁸⁹Zr-IgG C4. Les souris ont été préalablement traitées avec les composés cytotoxiques paclitaxel ou doxorubicine, ou avec l'agent véhicule seulement. Figure adaptée de Truillet *et al.*, 2018. Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; % ID/g, pourcentage de dose injectée par gramme de tissu ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

Kikuchi *et al.* ont montré que l'activation de l'expression tumorale de PD-L1 induite par radiothérapie externe fractionnée pouvait être quantifiée par immunoTEP, avec l'anticorps anti-PD-L1 murin 10F.9G2 radiomarqué au ⁸⁹Zr. Des souris immunocompétentes ont été implantées au niveau des épaules et des flancs avec des tumeurs murines de mélanome ou de carcinome épidermoïde de la tête et du cou, et seules les tumeurs sur les épaules ont été irradiées. L'accumulation du ⁸⁹Zr-10F.9G2 dans ces tumeurs irradiées était significativement plus élevée que celle dans les tumeurs non irradiées sur les flancs. L'analyse *ex vivo* des tumeurs par cytométrie de flux a corroboré les résultats observés par TEP, montrant bien une augmentation de l'expression de PD-L1 à la surface des cellules irradiées (Kikuchi *et al.*, 2017). Deux autres études ont par la suite également détecté par immunoTEP la régulation positive de l'expression tumorale de PD-L1 après radiothérapie externe fractionnée, dans des modèles précliniques de cancer du poumon humain et de cancer du côlon murin avec les anticorps anti-PD-L1 ⁸⁹Zr-atezolizumab et ⁸⁹Zr-6E11 (Ehlerding *et al.*, 2019; Christensen *et al.*, 2020).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons tout d'abord étudié l'effet des traitements avec l'inhibiteur de mTOR everolimus, ou avec l'inhibiteur des protéines BET JQ1, sur l'expression de PD-L1 *in vitro* dans diverses lignées cellulaires humaines de CPNPC. L'objectif était ensuite de montrer que les variations d'expression tumorale de PD-L1 induites par ces traitements pouvaient être visualisées *in vivo* par imagerie TEP dans un modèle préclinique de CPNPC, avec les nouveaux radioligands anti-PD-L1 ⁸⁹Zr-Fab C4 et ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) développés au cours de la thèse.

2. Etude de l'effet de différents traitements sur l'expression de PD-L1 dans des lignées cellulaires humaines de CPNPC

2.1. Effet du traitement everolimus sur l'expression de PD-L1 par les cellules humaines de CPNPC

Les lignées cellulaires humaines de CPNPC H1975, HCC44 et CAL-12T, exprimant PD-L1 de manière constitutive, ont été traitées avec l'inhibiteur du complexe mTORC1 everolimus (analogue de la rapamycine), ou simplement avec l'agent véhicule (DMSO) pour contrôle (Annexe 1). Après différentes durées de traitement, l'expression des substrats de mTORC1 S6 et 4EBP1, sous leur forme phosphorylée (activée) ou non, ainsi que l'expression de PD-L1 ont été analysées par WB sur les lysats de cellules entières (Figure 52, Annexe 1).

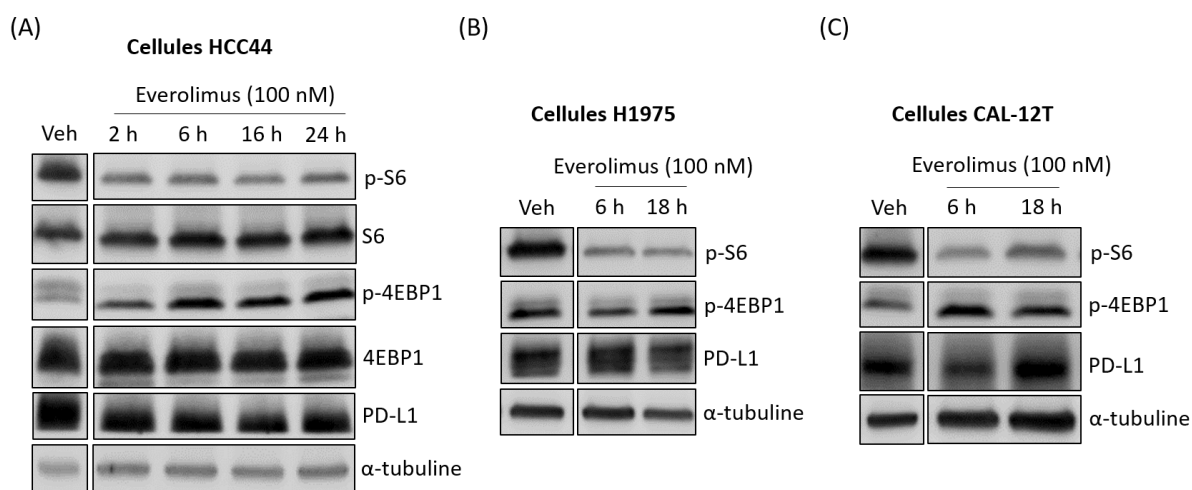


Figure 52. Caractérisation par WB de l'effet du traitement everolimus sur l'expression de PD-L1 dans des lignées cellulaires humaines de CPNPC. Images des membranes après immunodétection des protéines p-S6 et S6, p-4EBP1 et 4EBP1, PD-L1 et α -tubuline dans les lysats des cellules humaines de CPNPC PD-L1⁺ HCC44 (A), H1975 (B) et CAL-12T (C) traitées ou non avec l'everolimus (100 nM). N = 1 expérience par lignée cellulaire. Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; p, phosphorylation ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; S6, « p70 ribosomal protein S6 » ; Veh, véhicule ; 4E-BP1, « eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 ».

Les résultats des expériences de WB ont bien mis en évidence l'inhibition du complexe mTORC1 par l'everolimus dans les 3 lignées cellulaires humaines de CPNPC traitées, caractérisée par une diminution du niveau d'expression de son substrat p-S6. En revanche, l'everolimus ne semble pas avoir réduit de manière notable l'expression de p-4EBP1, l'autre substrat du complexe mTORC1 (le traitement semble même l'avoir activée pour la lignée HCC44).

Par ailleurs, pour les 3 lignées cellulaires humaines de CPNPC, il est apparu difficile de distinguer un impact notable de l'inhibition de mTORC1 par l'everolimus sur l'expression totale de PD-L1. Pour les lignées H1975 et HCC44, le niveau d'expression de PD-L1 a semblé légèrement diminuer après traitement (notamment à partir de 16-18 h de traitement), tandis que pour la lignée CAL-12T il a semblé au contraire faiblement augmenter (à 18 h de traitement). Quoi qu'il en soit, ces résultats sont loin de la réduction radicale du niveau d'expression de PD-L1 obtenue

par Lastwika *et al.* dans les cellules H1975, 16 h après traitement avec la rapamycine au même dosage (100 nM) (Lastwika *et al.*, 2016) (Figure 49). Nos résultats se rapprochent en revanche de ceux de Deng *et al.*, qui ont observé une très modeste (voire nulle) augmentation de l'expression de PD-L1 dans les cellules H1975 en réponse à la rapamycine (Deng *et al.*, 2019) (Figure 49).

La lignée H1975 utilisée par Lastwika *et al.* a été authentifiée par profilage génétique, ce qui n'a pas été le cas dans l'étude menée par Deng *et al.* ou bien dans notre étude. La vérification de l'identité d'une lignée cellulaire est une étape importante car le génotype et le phénotype des cellules peuvent évoluer avec les mutations acquises au fil des cycles de culture (Geraghty *et al.*, 2014). Compte tenu de la complexité des mécanismes de régulation de l'expression de PD-L1, impliquant de nombreuses voies de signalisation interconnectées, il n'est pas impossible que des dérives génotypiques entre les lignées H1975 utilisées aient pu conduire aux résultats contradictoires observés sur la régulation de PD-L1 par mTORC1. Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps anti-PD-L1 différents pour les expériences de WB pourrait être un autre facteur à l'origine des divergences de résultat. Lastwika *et al.* ont utilisé l'anticorps anti-PD-L1 #ab58810 du fournisseur Abcam, qui n'est désormais plus commercialisé en raison de son incapacité à satisfaire les critères de qualité exigés par l'entreprise (Lastwika *et al.*, 2016). De même que Deng *et al.*, nous avons utilisé dans cette étude l'anticorps anti-PD-L1 du fournisseur Cell Signaling (clone E1L3N). La spécificité de cet anticorps a été vérifiée sur des cellules H1975 dans lesquelles l'expression de PD-L1 a été inactivée (Deng *et al.*, 2019). Enfin, en plus des expériences de WB, il pourrait être intéressant d'effectuer des expériences de cytométrie de flux, afin d'évaluer l'effet de l'inhibition de mTORC1 par l'everolimus sur l'expression surfacique de PD-L1 (qui pourrait potentiellement varier sans que l'expression totale de PD-L1 ne change).

Compte tenu du faible impact de l'everolimus sur l'expression de PD-L1 *in vitro* dans les 3 lignées cellulaires humaines de CPNPC étudiées, nous n'avons pas retenu ce traitement pour tester la capacité des radioligands C4 à détecter la dynamique d'expression tumorale de PD-L1 *in vivo*. Nous avons plutôt décidé d'investiguer une autre stratégie thérapeutique, en s'intéressant cette fois-ci à l'effet du traitement JQ1 sur l'expression de PD-L1 dans ces mêmes lignées cellulaires humaines de CPNPC.

2.2. Effet du traitement JQ1 sur l'expression de PD-L1 par les cellules humaines de CPNPC

Les lignées cellulaires humaines de CPNPC PD-L1⁺ H1975, HCC44 et CAL-12T ont été traitées avec l'inhibiteur des protéines BET JQ1, ou simplement avec l'agent véhicule (DMSO) pour contrôle (Annexe 1). Après différentes durées de traitement, l'expression des facteurs de transcription c-Myc et FRA1 ainsi que celle de PD-L1 ont été analysées par WB sur les lysats de cellules entières (Figure 53, Annexe 1).

Les résultats des expériences de WB ont bien montré une inhibition de l'expression totale de PD-L1 par JQ1 dans les 3 lignées cellulaires humaines de CPNPC traitées, avec cependant des cinétiques différentes (Figure 53). En effet, pour la lignée H1975, le niveau d'expression de PD-L1 était significativement réduit dès 24 h après le début du traitement. La diminution d'expression de PD-L1 dans les lignées CAL-12T et HCC44 a été plus progressive, atteignant un niveau minimal au bout de 96 h de traitement.

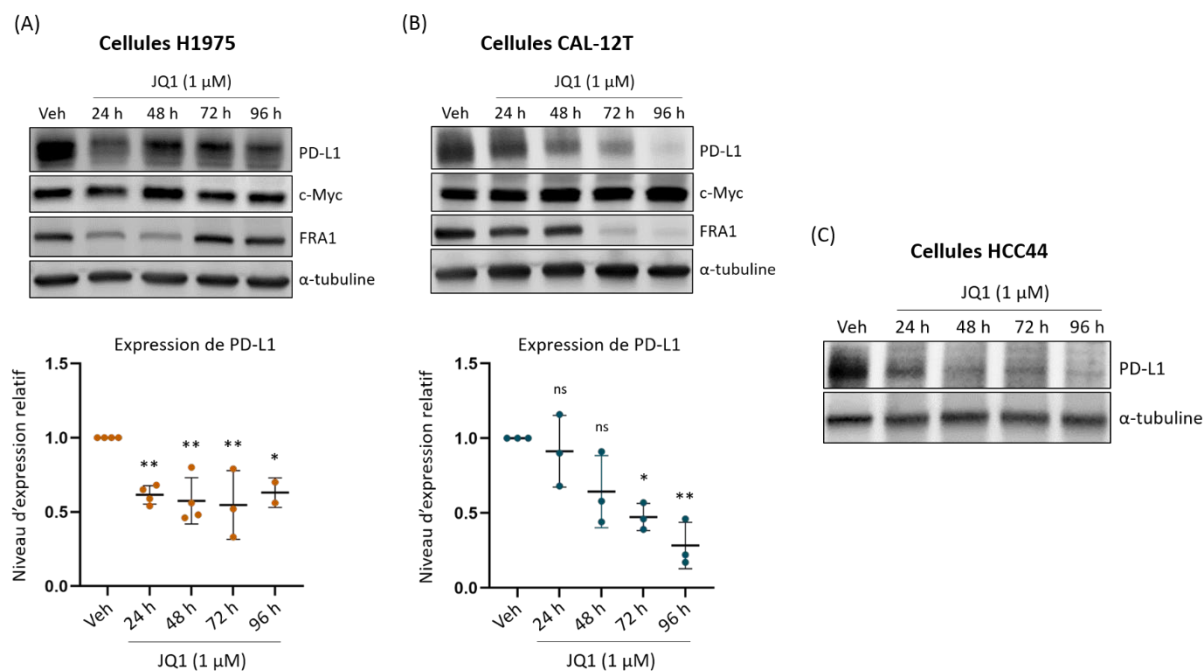


Figure 53. Caractérisation par WB de l'effet du traitement JQ1 sur l'expression de PD-L1 dans des lignées cellulaires humaines de CPNPC. Images des membranes après immunodétection des protéines PD-L1, c-Myc, FRA1 et α -tubuline dans les lysats des cellules humaines de CPNPC PD-L1⁺ H1975 (A), CAL-12T (B) et HCC44 (C) traitées ou non avec JQ1 (1 μ M). Les niveaux relatifs d'expression de PD-L1 dans les conditions traitement par rapport à la condition véhicule sont indiqués pour les lignées H1975 et CAL-12T (les barres représentent la valeur moyenne \pm l'écart-type). Les comparaisons statistiques entre la condition véhicule et les conditions traitement ont été effectuées par ANOVA à 1 facteur avec test post-hoc de Dunnett (ns, non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). N = 2-4 expériences pour la lignée H1975, N = 3 expériences pour la lignée CAL-12T, et N = 1 expérience pour la lignée HCC44. Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; FRA1, « Fos-related antigen 1 » ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; Veh, véhicule.

Pour la lignée H1975, l'inhibition de l'expression surfacique de PD-L1 en réponse au traitement JQ1 a été vérifiée par une expérience de cytométrie de flux (Annexe 1). Sur les histogrammes PE-H, un décalage négatif du pic de fluorescence a été observé pour les cellules H1975 marquées avec l'anticorps anti-PD-L1-PE et traitées avec JQ1, par rapport aux cellules marquées avec le même anticorps fluorescent et traitées avec l'agent véhicule seulement (Figure 54). La valeur de MFI du signal PE-H obtenue pour les cellules H1975 traitées avec le véhicule était de 736 ± 89 , contre une valeur de 496 ± 39 (~ 1,5 fois moins) pour les cellules H1975 traitées avec JQ1.

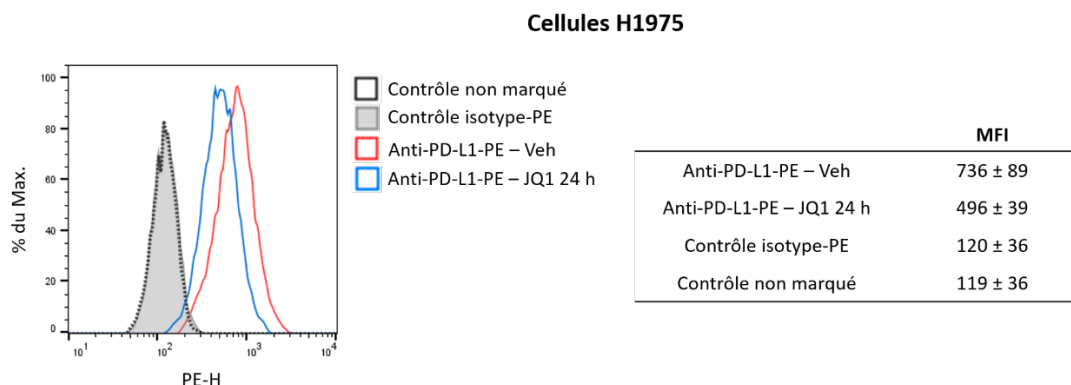


Figure 54. Caractérisation par cytométrie de flux de l'effet du traitement JQ1 sur l'expression de PD-L1 dans une lignée cellulaire humaine de CPNPC. Histogrammes obtenus lors de l'expérience de cytométrie de flux sur les cellules humaines de CPNPC H1975 PD-L1⁺ traitées avec JQ1 (1 μ M, 24 h) ou bien uniquement avec l'agent véhicule. Les valeurs de MFI du signal PE-H obtenues pour les cellules non marquées, et marquées avec l'anticorps anti-PD-L1 ou le contrôle isotype fluorescents sont indiquées (moyenne \pm écart-type). N = 1 expérience. Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; MFI, « median fluorescence intensity » ; PE, phycoérythrine ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 », Veh, véhicule.

Par ailleurs, le traitement des lignées H1975 et CAL-12T avec JQ1 n'a pas eu d'impact notable sur leur expression de c-Myc (Figure 53). A l'opposé, une diminution du niveau d'expression de FRA1 a été observée dans les cellules traitées lorsque l'expression de PD-L1 était également réduite (Figure 53). Pour la lignée H1975, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Lockwood *et al.*, qui ont également constaté une diminution de l'expression de FRA1 dans les cellules H1975 traitées avec JQ1 (5 μ M, 6 h), sans effet notable sur l'expression de c-Myc (Lockwood *et al.*, 2012). L'expression de FRA1 dans les cellules H1975 est cependant remontée à son niveau basal à partir de 72 h de traitement (Figure 53). Cela pourrait peut-être s'expliquer par le déclenchement d'une boucle de rétroaction positive, expliquant aussi l'inhibition légèrement plus faible de l'expression de PD-L1 à ces temps longs de traitement.

Conclusion

L'inhibition de mTORC1 par l'everolimus n'a pas semblé influencer sur l'expression protéique de PD-L1 dans les 3 lignées cellulaires humaines de CPNPC PD-L1⁺ testées. Ces données s'ajoutent aux résultats hétérogènes précédemment publiés quant à l'impact positif ou négatif de l'inhibition de mTOR sur l'expression tumorale de PD-L1 dans le CPNPC. L'inhibition des protéines BET par JQ1 a quant à elle bien diminué l'expression protéique de PD-L1 dans les mêmes lignées cellulaires humaines de CPNPC, rejoignant les résultats observés dans d'autres types de cancer. Les expériences de WB réalisées au cours de cette thèse soutiennent l'implication du facteur de transcription FRA1 dans l'inhibition de l'expression tumorale de PD-L1 par JQ1, tandis que le facteur de transcription c-Myc n'a pas semblé intervenir dans ce processus. Ces résultats, couplés à ceux précédemment publiés, soulignent le fait que l'inhibition des protéines BET peut cibler différentes protéines/facteurs de transcription (par ex. c-Myc ou FRA1) en fonction du type de cellule cancéreuse et de son paysage épigénétique. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant l'expression tumorale de PD-L1 contribuera au développement de stratégies thérapeutiques plus précises et efficaces en clinique.

L'identification de traitements inhibant l'expression tumorale de PD-L1 (comme les inhibiteurs des protéines BET) pourrait par exemple permettre leur utilisation combinée avec des immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1, pour une action synergique sur la stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale.

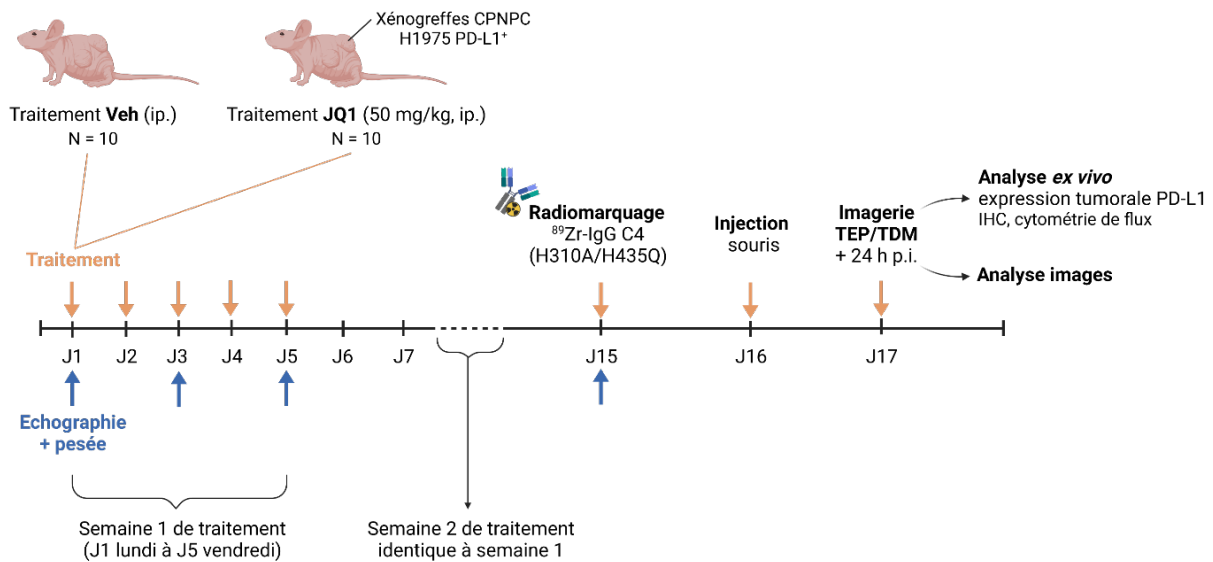


Figure 55. Protocole mis en place pour évaluer par imagerie TEP la variation d'expression tumorale de PD-L1 induite par JQ1 dans un modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1⁺. Les souris portant les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺) seront traitées avec JQ1 (50 mg/kg) ou uniquement avec l'agent véhicule (10 % DMSO dans une solution eau saline + 10 % β-cyclodextrine). La croissance tumorale sera suivie par échographie. L'effet de JQ1 sur l'expression de PD-L1 dans les tumeurs H1975 sera quantifié par imagerie TEP, 24 h après injection du radioligand anti-PD-L1 ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q). Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; IHC, immunohistochimie ; ip., intrapéritonéal ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; p.i., post-injection ; Veh, véhicule ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

La suite de ce projet consistera à évaluer par imagerie TEP l'impact du traitement JQ1 sur l'expression tumorale de PD-L1 *in vivo*, dans des souris nues portant des xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺), selon le protocole présenté dans la Figure 55. Les souris seront traitées avec JQ1 ou uniquement avec l'agent véhicule par injection intrapéritonéale, à raison de 5 jours par semaine pendant 2 semaines et 3 jours (J1 à J17). Durant le traitement, le suivi de la croissance des tumeurs sous-cutanées se fera par échographie, permettant une mesure en 3D plus précise qu'avec l'utilisation d'un pied à coulisse. A la fin du traitement, les souris seront injectées avec le ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q), puis imagées par TEP/TDM 24 h plus tard. Ce temps d'acquisition correspond au temps pour lequel l'accumulation maximale du ⁸⁹Zr-IgG C4 mutant dans les tumeurs H1975 a été préalablement observée (Chapitre I). Le ⁸⁹Zr-IgG C4 mutant a été choisi ici comme radioligand anti-PD-L1 en raison de sa PK plus rapide que le ⁸⁹Zr-IgG C4 parental, tout en conservant une forte accumulation absolue dans les xénogreffes H1975 au contraire du ⁸⁹Zr-Fab C4. L'accumulation tumorale plus importante du ⁸⁹Zr-IgG C4 mutant en comparaison du ⁸⁹Zr-Fab C4 pourrait faciliter la détection des variations d'expression

de PD-L1 dans les tumeurs H1975. Une fois la session d'imagerie terminée, les souris seront sacrifiées, et les tumeurs H1975 seront récupérées pour analyser l'expression tumorale de PD-L1 *ex vivo* par IHC et cytométrie de flux. L'accumulation du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) dans les tumeurs H1975 sera quantifiée à partir de l'analyse des images TEP/TDM, et comparée entre les souris traitées avec JQ1 ou l'agent véhicule. Enfin, l'effet anti-tumoral du traitement JQ1 pourra être évalué grâce aux mesures de volume des tumeurs H1975 réalisées par échographie.

Références

- Adeegbe, D.O. *et al.* (2018) 'BET Bromodomain Inhibition Cooperates with PD-1 Blockade to Facilitate Antitumor Response in *Kras*-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer', *Cancer Immunology Research*, 6(10), pp. 1234–1245. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0077.
- Alqahtani, A. *et al.* (2019) 'Bromodomain and extra-terminal motif inhibitors: a review of preclinical and clinical advances in cancer therapy', *Future Science OA*, 5(3), p. FSO372. doi:10.4155/fsoa-2018-0115.
- Andrieu, G.P. *et al.* (2019) 'BET protein targeting suppresses the PD-1/PD-L1 pathway in triple-negative breast cancer and elicits anti-tumor immune response', *Cancer Letters*, 465, pp. 45–58. doi:10.1016/j.canlet.2019.08.013.
- Bailly, C., Thuru, X. and Quesnel, B. (2020) 'Combined cytotoxic chemotherapy and immunotherapy of cancer: modern times', *NAR Cancer*, 2(1), p. zcaa002. doi:10.1093/narcan/zcaa002.
- Casey, S.C. *et al.* (2016) 'MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1', *Science*, 352(6282), pp. 227–231. doi:10.1126/science.aac9935.
- Cheng, Z. *et al.* (2013) 'Inhibition of BET Bromodomain Targets Genetically Diverse Glioblastoma', *Clinical Cancer Research*, 19(7), pp. 1748–1759. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3066.
- Christensen, C. *et al.* (2020) 'Quantitative PET imaging of PD-L1 expression in xenograft and syngeneic tumour models using a site-specifically labelled PD-L1 antibody', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 47(5), pp. 1302–1313. doi:10.1007/s00259-019-04646-4.
- Cortez, M.A. *et al.* (2016) 'PDL1 Regulation by p53 via miR-34', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 108(1). doi:10.1093/jnci/djv303.
- Deng, L. *et al.* (2019) 'Inhibition of mTOR complex 1/p70 S6 kinase signaling elevates PD-L1 levels in human cancer cells through enhancing protein stabilization accompanied with enhanced β -TrCP degradation', *Oncogene*, 38(35), pp. 6270–6282. doi:10.1038/s41388-019-0877-4.
- Ehlerding, E.B. *et al.* (2019) 'Noninvasive Imaging and Quantification of Radiotherapy-Induced PD-L1 Upregulation with ^{89}Zr -Df-Atezolizumab', *Bioconjugate Chemistry*, 30(5), pp. 1434–1441. doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00178.
- Ferri, E., Petosa, C. and McKenna, C.E. (2016) 'Bromodomains: Structure, function and pharmacology of inhibition', *Biochemical Pharmacology*, 106, pp. 1–18. doi:10.1016/j.bcp.2015.12.005.
- Filippakopoulos, P. *et al.* (2010) 'Selective inhibition of BET bromodomains', *Nature*, 468(7327), pp. 1067–1073. doi:10.1038/nature09504.
- Fumarola, C. *et al.* (2014) 'Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer', *Biochemical Pharmacology*, 90(3), pp. 197–207. doi:10.1016/j.bcp.2014.05.011.
- Geraghty, R.J. *et al.* (2014) 'Guidelines for the use of cell lines in biomedical research', *British Journal of Cancer*, 111(6), pp. 1021–1046. doi:10.1038/bjc.2014.166.
- Gong, J. *et al.* (2018) 'Radiation therapy and PD-1/PD-L1 blockade: the clinical development of an evolving anticancer combination', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 6(1), p. 46. doi:10.1186/s40425-018-0361-7.

III. Suivi de la dynamique d'expression tumorale de PD-L1 dans des modèles de CPNPC humains

- Hogg, S.J. *et al.* (2017) 'BET-Bromodomain Inhibitors Engage the Host Immune System and Regulate Expression of the Immune Checkpoint Ligand PD-L1', *Cell Reports*, 18(9), pp. 2162–2174. doi:10.1016/j.celrep.2017.02.011.
- Hua, H. *et al.* (2019) 'Targeting mTOR for cancer therapy', *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), p. 71. doi:10.1186/s13045-019-0754-1.
- Jiang, X. *et al.* (2020) 'Expression and function of FRA1 protein in tumors', *Molecular Biology Reports*, 47(1), pp. 737–752. doi:10.1007/s11033-019-05123-9.
- Jing, X. *et al.* (2020) 'BRD4 inhibition suppresses PD-L1 expression in triple-negative breast cancer', *Experimental Cell Research*, 392(2), p. 112034. doi:10.1016/j.yexcr.2020.112034.
- Ju, X. *et al.* (2020) 'Regulation of PD-L1 expression in cancer and clinical implications in immunotherapy', *American Journal of Cancer Research*, 10(1), pp. 1–11.
- Kikuchi, M. *et al.* (2017) 'Preclinical immunoPET/CT imaging using Zr-89-labeled anti-PD-L1 monoclonal antibody for assessing radiation-induced PD-L1 upregulation in head and neck cancer and melanoma', *OncoImmunology*, p. e1329071. doi:10.1080/2162402X.2017.1329071.
- Kim, E.Y. *et al.* (2017) 'MYC expression correlates with PD-L1 expression in non-small cell lung cancer', *Lung Cancer*, 110, pp. 63–67. doi:10.1016/j.lungcan.2017.06.006.
- Lamberti, G. *et al.* (2020) 'The Mechanisms of PD-L1 Regulation in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC): Which Are the Involved Players?', *Cancers*, 12(11), p. 3129. doi:10.3390/cancers12113129.
- Laplante, M. and Sabatini, D.M. (2009) 'mTOR signaling at a glance', *Journal of Cell Science*, 122(20), pp. 3589–3594. doi:10.1242/jcs.051011.
- Lastwika, K.J. *et al.* (2016) 'Control of PD-L1 Expression by Oncogenic Activation of the AKT–mTOR Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer', *Cancer Research*, 76(2), pp. 227–238. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3362.
- Lee, M.-H. *et al.* (2020) 'FRA1 contributes to MEK-ERK pathway-dependent PD-L1 upregulation by KRAS mutation in premalignant human bronchial epithelial cells', *American Journal of Translational Research*, 12(2), pp. 409–427.
- Lewin, J. *et al.* (2018) 'Phase Ib Trial With Birabresib, a Small-Molecule Inhibitor of Bromodomain and Extraterminal Proteins, in Patients With Selected Advanced Solid Tumors', *Journal of Clinical Oncology*, 36(30), pp. 3007–3014. doi:10.1200/JCO.2018.78.2292.
- Liu, K. *et al.* (2019) 'JQ1, a BET-bromodomain inhibitor, inhibits human cancer growth and suppresses PD-L1 expression', *Cell Biology International*, 43(6), pp. 642–650. doi:10.1002/cbin.11139.
- Lockwood, W.W. *et al.* (2012) 'Sensitivity of human lung adenocarcinoma cell lines to targeted inhibition of BET epigenetic signaling proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), pp. 19408–19413. doi:10.1073/pnas.1216363109.
- Melaiu, O. *et al.* (2017) 'PD-L1 Is a Therapeutic Target of the Bromodomain Inhibitor JQ1 and, Combined with HLA Class I, a Promising Prognostic Biomarker in Neuroblastoma', *Clinical Cancer Research*, 23(15), pp. 4462–4472. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2601.
- da Motta, L.L. *et al.* (2017) 'The BET inhibitor JQ1 selectively impairs tumour response to hypoxia and downregulates CA9 and angiogenesis in triple negative breast cancer', *Oncogene*, 36(1), pp. 122–132. doi:10.1038/onc.2016.184.

- Pan, Y. *et al.* (2019) ‘Synergistic inhibition of pancreatic cancer with anti-PD-L1 and c-Myc inhibitor JQ1’, *OncoImmunology*, 8(5), p. e1581529. doi:10.1080/2162402X.2019.1581529.
- Shin, J. *et al.* (2019) ‘Effect of Platinum-Based Chemotherapy on PD-L1 Expression on Tumor Cells in Non-small Cell Lung Cancer’, *Cancer Research and Treatment*, 51(3), pp. 1086–1097. doi:10.4143/crt.2018.537.
- Skov, B.G. *et al.* (2020) ‘The prevalence of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer in an unselected, consecutive population’, *Modern Pathology*, 33(1), pp. 109–117. doi:10.1038/s41379-019-0339-0.
- Sun, C., Mezzadra, R. and Schumacher, T.N. (2018) ‘Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint’, *Immunity*, 48(3), pp. 434–452. doi:10.1016/j.immuni.2018.03.014.
- The Cancer Genome Atlas Research Network (2014) ‘Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma’, *Nature*, 511(7511), pp. 543–550. doi:10.1038/nature13385.
- Truillet, C. *et al.* (2018) ‘Imaging PD-L1 Expression with ImmunoPET’, *Bioconjugate Chemistry*, 29(1), pp. 96–103. doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00631.
- White, M.E., Fenger, J.M. and Carson, W.E. (2019) ‘Emerging roles of and therapeutic strategies targeting BRD4 in cancer’, *Cellular Immunology*, 337, pp. 48–53. doi:10.1016/j.cellimm.2019.02.001.
- Zhang, Q. *et al.* (2019) ‘A Novel mTORC1/2 Inhibitor (MTI-31) Inhibits Tumor Growth, Epithelial–Mesenchymal Transition, Metastases, and Improves Antitumor Immunity in Preclinical Models of Lung Cancer’, *Clinical Cancer Research*, 25(12), pp. 3630–3642. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2548.
- Zhang, Y. *et al.* (2018) ‘JQ-1 Inhibits Colon Cancer Proliferation via Suppressing Wnt/ β -Catenin Signaling and miR-21’, *Chemical Research in Toxicology*, 31(5), pp. 302–307. doi:10.1021/acs.chemrestox.7b00346.
- Zhu, H. *et al.* (2016) ‘BET Bromodomain Inhibition Promotes Anti-tumor Immunity by Suppressing PD-L1 Expression’, *Cell Reports*, 16(11), pp. 2829–2837. doi:10.1016/j.celrep.2016.08.032.
- Zhu, T. *et al.* (2020) ‘Mechanisms and Future of Non-Small Cell Lung Cancer Metastasis’, *Frontiers in Oncology*, 10, p. 585284. doi:10.3389/fonc.2020.585284.

Conclusion générale

Les 3 formats de ligand C4 anti-PD-L1 étudiés – IgG C4, IgG C4 (H310A/H435Q) et Fab C4 – radiomarqués au ^{89}Zr ont chacun permis de visualiser efficacement et spécifiquement par TEP l'expression de PD-L1 dans les xénogreffes humaines de CPNPC PD-L1⁺ implantées dans des souris immunodéficientes. Les stratégies de réduire la taille de l'IgG C4 parental en utilisant un fragment Fab C4, ou de le modifier pour empêcher son recyclage par le mFcRn (double mutation H310A/H435Q) ont toutes deux effectivement permis d'accélérer la PK du radioligand *in vivo*. Les images TEP avec le meilleur contraste tumeur PD-L1⁺/bruit ont ainsi été obtenues à des temps plus courts post-injection avec le ^{89}Zr -Fab C4 et le ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q). Par ailleurs, malgré une rétention importante de l'activité du ^{89}Zr -Fab C4 dans les reins et de celle du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) dans le foie, la dosimétrie des 3 radioligands C4 s'est révélée convenable pour une éventuelle utilisation clinique. La possibilité de détecter les variations d'expression tumorale de PD-L1 en réponse à un traitement (par ex. JQ1) par imagerie TEP avec les nouveaux radioligands ^{89}Zr -Fab C4 et ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q) reste encore à explorer.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse soulignent la faisabilité de développer des radioligands avec des propriétés pharmacocinétiques optimisées pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1 dans des modèles précliniques. Ces données encouragent la translation clinique de tels radioligands pour mieux prédire et surveiller l'efficacité des immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1 grâce à l'imagerie TEP. En clinique, le choix du format de radioligand anti-PD-L1 utilisé pourra dépendre de la pathologie. Par exemple, compte tenu de son élimination rénale, le fragment Fab C4 serait particulièrement adapté pour la détection des tumeurs PD-L1⁺ dans le foie, constituant le 3^{ème} site métastatique le plus fréquent chez les patients souffrant de CPNPC (après le cerveau et les os) (Zhu *et al.*, 2020). La visualisation de ces mêmes tumeurs pourrait en revanche être obstruée par le signal d'élimination du ^{89}Zr -IgG C4 (H310A/H435Q). Au contraire, la détection de tumeurs PD-L1⁺ rénales ou de la région pelvienne pourrait quant à elle être facilitée par l'utilisation d'un radioligand éliminé par la voie hépatobiliaire, comme le ^{89}Zr -IgG (H310A/H435Q).

Les 2 premières études cliniques d'imagerie TEP de PD-L1 ont obtenu des résultats prometteurs quant à sa capacité à prédire l'efficacité des immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1 chez des patients souffrant de cancers avancés (Bensch *et al.*, 2018; Niemeijer *et al.*, 2018). D'autres essais cliniques incluant l'imagerie TEP de PD-L1 sont actuellement en cours dans divers types de cancer (Tableau 25). Ces essais évaluent principalement la valeur prédictive d'un examen TEP PD-L1 pré-traitement pour la réponse à une immunothérapie anti-PD-1/anti-PD-L1. Certains essais utilisent également l'imagerie TEP dans le but de suivre la dynamique d'expression tumorale de PD-L1 avant et pendant un traitement de chimiothérapie et/ou radiothérapie.

Tableau 25. Essais cliniques incluant l'imagerie TEP de PD-L1. Ces essais cliniques sont répertoriés sur le site *ClinicalTrials.gov*.

Essai clinique	Radioligand TEP	Type de cancer	Nombre de patients	Statut
NCT03514719	⁸⁹ Zr-avelumab	CPNPC	37	En cours de recrutement
NCT03829007	⁸⁹ Zr-durvalumab	CETEC	33	Terminé
NCT03610061	⁸⁹ Zr-durvalumab	Lymphome	36	En cours de recrutement
NCT03853187	⁸⁹ Zr-durvalumab	CPNPC	20	En cours de recrutement
NCT02453984	⁸⁹ Zr-atezolizumab	Cancers solides localement avancés ou métastatiques	45	Actif, pas de recrutement
NCT02478099	⁸⁹ Zr-atezolizumab	Cancers solides localement avancés ou métastatiques	98	En cours de recrutement
NCT03850028	⁸⁹ Zr-atezolizumab	Lymphome	20	En cours de recrutement
NCT04006522	⁸⁹ Zr-atezolizumab	Carcinome à cellules rénales avancé	40	En cours de recrutement
NCT04222426	⁸⁹ Zr-atezolizumab	Cancer du sein métastatique	10	En cours de recrutement
NCT04564482	⁸⁹ Zr-atezolizumab	Cancer du rectum, cancer de l'œsophage	20	Actif, pas de recrutement
NCT04297748	⁸⁹ Zr-M7824 (protéine de fusion mAb anti-PD-L1-TGFβRII)	CPNPC	12	En cours de recrutement
NCT03746704	⁸⁹ Zr-REGN3504 (mAb)	Cancers avancés PD-L1 ⁺	28	En cours de recrutement
NCT03520634	¹⁸ F-BMS-986192 (adnectine)	Mélanome	10	Terminé
NCT03843515	¹⁸ F-BMS-986192 (adnectine)	Carcinome épidermoïde de la cavité buccale	15	En cours de recrutement
NCT03564197	¹⁸ F-BMS-986192 (adnectine)	CPNPC stade IV	80	En cours de recrutement
NCT04304066	¹⁸ F-WL12 or ⁶⁸ Ga-WL12 (petit peptide)	Cancers solides	50	En cours de recrutement

Abréviations : CETEC, carcinome épidermoïde de la tête et du cou ; CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; mAb, anticorps monoclonal ; PD-L1, « programmed cell death-ligand 1 » ; TGFβRII, « transforming growth factor β receptor II » ; ¹⁸F, fluor-18 ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

Au-delà de ces perspectives excitantes, l'imagerie TEP de PD-L1 nécessitera plusieurs niveaux de standardisation afin d'obtenir des données fiables et reproductibles pouvant être comparées dans des études multicentriques de grande envergure. Les procédures concernant la

préparation du patient, la production et l'administration du radioligand anti-PD-L1, ainsi que l'acquisition, la reconstruction et l'interprétation des images devront être harmonisées (Boellaard, 2009). Les recommandations publiées par l'EANM (« European Association of Nuclear Medicine ») pour standardiser les protocoles d'imagerie TEP au ^{18}F -fluorodésoxyglucose (^{18}F -FDG) pourraient servir de cadre de départ dans cette démarche (Boellaard *et al.*, 2015). Concernant la normalisation de l'analyse et de la quantification des images TEP, plusieurs méthodes plus ou moins complexes pourraient être considérées. Une méthode qualitative basée sur une inspection visuelle des images pourrait être utilisée pour estimer l'accumulation relative du radioligand anti-PD-L1 dans les lésions tumorales par rapport à une région ou structure de référence (par ex. tissus sains environnants, foie, muscle...). De telles échelles de notation visuelle ont déjà été mises en place pour évaluer la réponse de certaines tumeurs par TEP, comme le critère de Lugano pour la TEP au ^{18}F -FDG dans les lymphomes, ou le critère de Krenning pour la TEP avec le ^{68}Ga -octreotate (DOTATATE) dans les tumeurs neuroendocrines (Hofman, Lau and Hicks, 2015; Van Heertum *et al.*, 2017). Des méthodes semi-quantitatives plus sophistiquées, basées sur le calcul des valeurs SUV, pourraient également être employées pour mesurer l'expression tumorale de PD-L1. Cette approche est par exemple appliquée dans le critère d'interprétation PERCIST (« PET Response Criteria in Solid Tumors ») pour évaluer la réponse des tumeurs solides par TEP au ^{18}F -FDG (Wahl *et al.*, 2009). Dans les premières études cliniques d'imagerie TEP de PD-L1, Bensch *et al.* ont utilisé la valeur de SUV_{max} (activité maximale dans un voxel unique du VOI) pour quantifier l'accumulation du ^{89}Zr -atezolizumab dans les lésions tumorales (Bensch *et al.*, 2018). Niemeijer *et al.* ont quant à eux employé la valeur de SUV_{peak} (activité moyenne dans une sphère de 1 cm^3 centrée sur la zone d'activité maximale du VOI) avec l'adnectine anti-PD-L1 ^{18}F -BMS-986192 (Niemeijer *et al.*, 2018).

A l'ère de la médecine de précision, la combinaison de l'imagerie TEP de PD-L1 à d'autres biomarqueurs prédictifs émergents de l'efficacité des immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1 permettra très certainement d'améliorer la sensibilité et la spécificité des prédictions. Ces biomarqueurs prédictifs incluent notamment une charge mutationnelle élevée de la tumeur (Rizvi *et al.*, 2015), une infiltration intra-tumorale de lymphocytes T cytotoxiques CD8^+ (Tumeh *et al.*, 2014), ou encore l'existence de structures lymphoïdes tertiaires matures riches en lymphocytes B au sein de la tumeur (Vanhersecke *et al.*, 2021). L'analyse de la composition du microbiote intestinal pourrait également apporter une valeur prédictive supplémentaire. Par exemple, la présence de la bactérie *A. muciniphila* dans le microbiote intestinal de patients souffrant de CPNPC ou de carcinome à cellules rénales a été associée à une meilleure réponse à l'immunothérapie anti-PD-1 (Routy *et al.*, 2018). Enfin, des approches radiomiques, consistant à extraire et à analyser un grand nombre de paramètres quantitatifs à partir d'images médicales, pourraient être intégrées. Par exemple, Sun *et al.* ont développé par apprentissage automatique une signature radiomique de l'infiltration intra-tumorale des lymphocytes T CD8^+ basée sur l'analyse des images TDM des patients. La signature radiomique a été capable de prédire la réponse de patients souffrant de divers cancers solides avancés à une immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 (Sun *et al.*, 2018). Ce biomarqueur prédictif d'imagerie apparaît d'autant plus prometteur que la TDM est largement utilisée en oncologie clinique. Au-delà de leur degré de validation encore très variable, le transfert en routine clinique de l'ensemble de ces biomarqueurs prédictifs pour affiner la stratification des patients recevant une immunothérapie anti-PD-1/anti-PD-L1 soulèvera cependant de nombreux challenges : complexité de l'analyse globale, délais d'obtention des résultats, coûts et prise en charge, diversité des expertises nécessaires etc. (Denis *et al.*, 2019).

Références

- Bensch, F. *et al.* (2018) ‘⁸⁹Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer’, *Nature Medicine*, 24(12), pp. 1852–1858. doi:10.1038/s41591-018-0255-8.
- Boellaard, R. (2009) ‘Standards for PET Image Acquisition and Quantitative Data Analysis’, *Journal of Nuclear Medicine*, 50(Suppl_1), pp. 11S-20S. doi:10.2967/jnumed.108.057182.
- Boellaard, R. *et al.* (2015) ‘FDG PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour imaging: version 2.0’, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 42(2), pp. 328–354. doi:10.1007/s00259-014-2961-x.
- ClinicalTrials.gov*. Available at: <https://clinicaltrials.gov/> (Accessed: 17 September 2021).
- Denis, H. *et al.* (2019) ‘Les immunothérapies spécifiques dans le traitement des cancers’, *Bulletin du Cancer*, 106(1), pp. 37–47. doi:10.1016/j.bulcan.2018.12.007.
- Hofman, M.S., Lau, W.F.E. and Hicks, R.J. (2015) ‘Somatostatin Receptor Imaging with ⁶⁸ Ga DOTATATE PET/CT: Clinical Utility, Normal Patterns, Pearls, and Pitfalls in Interpretation’, *RadioGraphics*, 35(2), pp. 500–516. doi:10.1148/rg.352140164.
- Niemeijer, A.N. *et al.* (2018) ‘Whole body PD-1 and PD-L1 positron emission tomography in patients with non-small-cell lung cancer’, *Nature Communications*, 9(1), p. 4664. doi:10.1038/s41467-018-07131-y.
- Rizvi, N.A. *et al.* (2015) ‘Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer’, *Science*, 348(6230), pp. 124–128. doi:10.1126/science.aaa1348.
- Routy, B. *et al.* (2018) ‘Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors’, *Science*, 359(6371), pp. 91–97. doi:10.1126/science.aan3706.
- Sun, R. *et al.* (2018) ‘A radiomics approach to assess tumour-infiltrating CD8 cells and response to anti-PD-1 or anti-PD-L1 immunotherapy: an imaging biomarker, retrospective multicohort study’, *The Lancet Oncology*, 19(9), pp. 1180–1191. doi:10.1016/S1470-2045(18)30413-3.
- Tumeh, P.C. *et al.* (2014) ‘PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance’, *Nature*, 515(7528), pp. 568–571. doi:10.1038/nature13954.
- Van Heertum, R.L. *et al.* (2017) ‘Lugano 2014 criteria for assessing FDG-PET/CT in lymphoma: an operational approach for clinical trials’, *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 11, pp. 1719–1728. doi:10.2147/DDDT.S136988.
- Vanhersecke, L. *et al.* (2021) ‘Mature tertiary lymphoid structures predict immune checkpoint inhibitor efficacy in solid tumors independently of PD-L1 expression’, *Nature Cancer*, 2(8), pp. 794–802. doi:10.1038/s43018-021-00232-6.
- Wahl, R.L. *et al.* (2009) ‘From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET Response Criteria in Solid Tumors’, *Journal of Nuclear Medicine*, 50(Suppl_1), pp. 122S-150S. doi:10.2967/jnumed.108.057307.
- Zhu, T. *et al.* (2020) ‘Mechanisms and Future of Non-Small Cell Lung Cancer Metastasis’, *Frontiers in Oncology*, 10, p. 585284. doi:10.3389/fonc.2020.585284.

Annexe 1. Matériels et Méthodes

1. Produits chimiques et composés utilisés

L'eau ultra pure utilisée dans les solutions a été produite par l'appareil Arium mini (Sartorius). Les produits chimiques et les composés employés de manière récurrente dans les divers protocoles expérimentaux sont regroupés dans le Tableau 26.

Tableau 26. Liste des produits chimiques et des composés communément utilisés pour les expériences.

Produit	Formule	Numéro CAS	Fournisseur
Acétate de sodium	$C_2H_3NaO_2$	127-09-3	Sigma-Aldrich
Acétonitrile	C_2H_3N	75-05-8	Fisher Chemical
Acide chlorhydrique	HCl	7647-01-0	Sigma-Aldrich
Acide citrique	$C_6H_8O_7$	5949-29-1	Sigma-Aldrich
Acide gentisique	$C_7H_6O_4$	490-79-9	Sigma-Aldrich
Bicarbonate de sodium	$NaHCO_3$	144-55-8	Sigma-Aldrich
Carbonate de sodium	Na_2CO_3	497-19-8	VWR Life Science
Chlorure de sodium	NaCl	7647-14-5	Sigma-Aldrich
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	C_2H_6OS	67-68-5	Sigma-Aldrich
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)			Gibco
Ethanol	C_2H_5OH	64-17-5	Carlo Erba Reagents
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$	7365-45-9	Gibco
Phosphate-buffered saline (PBS)			Sigma-Aldrich
Sulfate de magnésium	$MgSO_4$	10034-99-8	Sigma-Aldrich
Tris-buffered saline (TBS)			Sigma-Aldrich
Tween 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	9005-64-5	Sigma-Aldrich

2. Production et caractérisation des ligands C4 anti-PD-L1

2.1. Production des ligands C4

Les 3 ligands C4 anti-PD-L1 – IgG C4, IgG C4 (H310A/H435Q), et Fab C4 – ont été produits par le Laboratoire d'Immunogénicité Cellulaire et Biotechnologies (LICB) du Service d'Ingénierie Moléculaire pour la Santé (SIMoS), faisant partie de l'Institut des sciences du vivant Frédéric Joliot (CEA Paris-Saclay). Les chaînes lourdes et légères des anticorps C4 ont été clonées dans les plasmides AbVec2.0-IGHG1 et AbVec1.1-IGLC, respectivement (Smith *et al.*, 2009). Pour le Fab C4, le fragment Fc de la chaîne lourde a été remplacé par une étiquette poly-histidine. Des bactéries *E. Coli* ont été transformées avec les plasmides recombinants pour amplification. Des cellules humaines FreeStyle 293-F (Thermo-Fisher) ont ensuite été co-transfectées transitoirement avec les 2 plasmides recombinants, en utilisant du polyéthylèneimine (PEI) linéaire. La transfection a été effectuée à une concentration de $2,5 \times 10^6$ cellules/mL dans 100 mL de milieu d'expression FreeStyle (Thermo Fisher Scientific), en ajoutant la même

quantité (150 µg) de chaque plasmide et 1,8 mL de PEI linéaire (0,5 mg/mL, Polysciences). Les cellules transfectées ont été incubées à 37°C sous agitation (120 rpm) dans une atmosphère humidifiée avec 8 % de CO₂ dans l'air. Après 7 jours d'incubation, le surnageant de culture contenant les ligands C4 sécrétés a été récupéré, et ceux-ci ont été purifiés par chromatographie d'affinité. L'IgG C4 a été isolé par liaison de son fragment Fc à la protéine A de *Staphylococcus aureus*, immobilisée sur la colonne HiTrap Protein A (GE Healthcare). Comme l'IgG C4 (H310A/H435Q) n'était plus capable de se lier à la protéine A par son fragment Fc muté, cet anticorps a été purifié via la chaîne légère lambda de son fragment Fab, avec une colonne Lambda Fab Select (GE Healthcare). Le Fab C4 a été capturé via son étiquette poly-histidine, à l'aide d'une colonne HisTrap Excel (GE Healthcare). Une étape finale de chromatographie par exclusion de taille a été réalisée avec une colonne Sephacryl-S-200 HR (GE Healthcare) pour enlever les éventuels agrégats et remplacer le tampon des ligands C4 par du PBS. La pureté des solutions de ligand C4 obtenues a été évaluée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).

2.2. Mesure de l'affinité des ligands C4 pour la protéine PD-L1 humaine par interférométrie bio-couche

La cinétique de liaison des ligands C4 à la protéine PD-L1 humaine a été étudiée par interférométrie bio-couche (BLI pour « biolayer interferometry »), à l'aide de l'appareil Octet RED96 (ForteBio). Pour les mesures avec l'IgG C4 et l'IgG C4 (H310A/H435Q), les anticorps (50 nM) ont été immobilisés sur les biocapteurs Anti-hIgG Fc Capture (ForteBio) pendant 60 s. La ligne de base a été établie pendant 30 s, en plongeant les biocapteurs dans du tampon cinétique (PBS avec 0,5 % d'albumine de sérum bovin [BSA] et 0,05 % de Tween 20). L'association de la protéine PD-L1 humaine recombinante (Sinobiological) aux anticorps immobilisés a ensuite été mesurée pendant 300 s, pour différentes concentrations de la protéine (de 50 nM à 1,6 nM) diluée dans du tampon cinétique. Pour la mesure avec le Fab C4, la protéine PD-L1 biotinyllée (50 nM, Sinobiological) a été immobilisée sur les biocapteurs Streptavidin (ForteBio) pendant 60 s. Après établissement de la ligne de base, l'association du Fab C4 à la protéine PD-L1 immobilisée a été mesurée pendant 200 s, pour différentes concentrations du fragment d'anticorps (de 25 nM à 1,6 nM) dilué dans du tampon cinétique. Pour les 3 ligands C4, l'étape de dissociation a été réalisée pendant 1000 s dans du tampon cinétique. Les courbes de liaison obtenues ont été corrigées par rapport à la ligne de base, puis elles ont été ajustées à un modèle de liaison 1:1 avec le logiciel associé à l'appareil pour calculer les différentes constantes cinétiques (k_a , k_d , K_D).

3. Radiomarquage des ligands C4 anti-PD-L1 au zirconium-89 (⁸⁹Zr)

Pour les expériences d'imagerie TEP/TDM, les 3 ligands C4 anti-PD-L1 – IgG C4, IgG C4 (H310A/H435Q), et Fab C4 - ont été radiomarqués au zirconium-89 (⁸⁹Zr). Pour cela, les ligands ont tout d'abord été conjugués de manière non-spécifique à l'agent chélateur p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine (p-NCS-Bz-DFO), sur les groupements amines des résidus lysines exposés. Le radiomarquage des ligands C4 conjugués au DFO avec le ⁸⁹Zr a ensuite été effectué selon la procédure préalablement publiée par Vosjan *et al.* (Vosjan *et al.*, 2010).

3.1. Conjugaison des ligands C4 au DFO

Un volume de 1 mL de solution de ligand C4 (5 mg/mL dans du PBS) a été prélevé, et le pH a été ajusté à 9,3 à l'aide d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 , 0,1 M). Un volume de solution de p-NCS-Bz-DFO (10 mM dans du DMSO, Macrocyclics), correspondant à un excès molaire de 4x du chélateur par rapport au ligand C4, a ensuite été ajouté progressivement à la solution de ligand C4, en agitant vigoureusement (500 rpm). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 45 min à 37°C, sous agitation douce (350 rpm). Une fois conjugués au DFO, les ligands C4 ont été purifiés par filtration sur gel avec une colonne PD-10 (GE Healthcare), en utilisant une solution d'acide gentisique comme phase mobile (5 mg/mL dans une solution d'acétate de sodium à 0,25 M, pH 5,4-5,6). Après élution, la solution purifiée de ligand C4 conjugué au DFO (2,5 mg/mL dans la solution d'acétate de sodium) a été stockée à -20°C jusqu'à l'étape de radiomarquage.

3.2. Radiomarquage au ^{89}Zr des ligands C4 conjugués avec le DFO

Un volume de 200 μL de solution de ^{89}Zr -oxalate dans de l'acide oxalique (1 M, PerkinElmer) a été prélevé et neutralisé avec 90 μL d'une solution de Na_2CO_3 (2 M). Un volume de 500 μL de solution de ligand C4 conjugué au DFO (2,5 mg/mL) a ensuite été ajouté à la solution de ^{89}Zr -oxalate. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 1 h à 37°C, sous agitation douce (350 rpm). Le pH du mélange a été ajusté à 7,2 avec une solution tampon d'HEPES (0,5 M, pH 7,1-7,3). Une fois radiomarqués au ^{89}Zr , les ligands C4 ont été purifiés avec une colonne PD-10 (GE Healthcare), en utilisant la solution d'acide gentisique comme phase mobile. Les radioligands C4 ont ensuite été concentrés dans du tampon HEPES à l'aide d'un concentrateur centrifuge Vivaspin (Sartorius), avec un seuil de rétention de 30 kDa pour le Fab C4, et de 50 kDa pour les 2 IgGs C4. La concentration protéique de la solution de radioligand C4 a été déterminée par analyse de l'absorption UV à 280 nm à l'aide du spectrophotomètre BioDrop μLIT (BioDrop). La solution de radioligand C4 a été conservée à 4°C jusqu'à son utilisation pour l'expérience d'imagerie TEP/TDM (le jour même ou le lendemain).

3.3. Evaluation de la pureté radiochimique des radioligands C4

La pureté radiochimique des radioligands C4 a été évaluée par chromatographie sur couche mince (CCM), avec une plaque en microfibrilles de verre recouverte de gel de silice (Agilent Technologies) comme phase stationnaire, et une solution d'acide citrique (20 mM dans 5 % d'acétonitrile, pH 4,9-5,1) comme phase mobile. Un volume de solution de radioligand C4 correspondant à une activité de 2-10 μCi a été déposé sur la plaque. Les espèces radioactives éluées ont été détectées avec un scanner radio-CCM Mini-Scan TLC Imaging Scanner (Eckert & Ziegler).

La pureté radiochimique des radioligands C4 a également été vérifiée via chromatographie liquide haute pression (HPLC) par exclusion de taille, avec un système HPLC Dionex (Thermo Fisher Scientific). La solution de radioligand C4 a été entraînée à travers la colonne bioZen 1,8 μm SEC-2 LC (Phenomenex) par gradient linéaire avec une solution de 50 mM KH_2PO_4 + 250 mM KCl (pH 6,8), à un débit de 0,2 mL/min. Les espèces radioactives éluées ont été détectées en sortie de colonne avec un détecteur de lumière UV (UVD 170U UV/VIS) et un détecteur à scintillation (Packard).

3.4. Evaluation de la stabilité *in vivo* des radioligands C4

La stabilité *in vivo* des radioligands C4 a été évaluée par CCM en prélevant le plasma de souris (N = 1 souris par radioligand) injectées avec les radioligands à la fin des expériences d'imagerie TEP longitudinale. Un volume de sérum correspondant à une activité de 2-10 μCi a été déposé sur la plaque. Les espèces radioactives éluées ont été détectées avec le compteur gamma Wizard² (PerkinElmer).

4. Culture de cellules humaines de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC)

Les lignées cellulaires humaines de CPNPC ont été cultivées dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2 (L2), sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II.

4.1. Lignées cellulaires humaines de CPNPC cultivées

Diverses lignées cellulaires humaines de CPNPC ont été utilisées (Tableau 27). Les lignées H1975, A549 et H358 ont été achetées à la banque de cellules américaine ATCC (« American Type Culture Collection »). Les lignées CAL-12T, HCC15 et HCC44 ont été acquises auprès de l'Institut Leibniz DSMZ, une collection allemande de micro-organismes et cultures cellulaires. La lignée cellulaire H322 a été achetée chez Sigma-Aldrich.

Tableau 27. Lignées cellulaires humaines de CPNPC utilisées.

Lignée cellulaire	Individu à partir duquel la lignée a été établie	Sous-type de CPNPC	Référence Fournisseur
A549	Homme, 58 ans	Adénocarcinome	CCL-185 ATCC
H1975	Femme	Adénocarcinome	CRL-5908 ATCC
H358	Homme	Adénocarcinome (carcinome bronchoalvéolaire)	CRL-5807 ATCC
CAL-12T	Homme	Non renseigné	ACC 443 DSMZ
HCC15	Homme, 47 ans	Carcinome épidermoïde	ACC 496 DSMZ
HCC44	Femme, 54 ans	Adénocarcinome	ACC 534 DSMZ
H322	Homme, 52 ans	Adénocarcinome (carcinome bronchoalvéolaire)	Sigma-Aldrich

Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules.

4.2. Conditions de culture des cellules

Les cellules humaines de CPNPC adhérentes ont été cultivées dans des flasques en polystyrène avec bouchon filtrant (TPP) au sein d'un incubateur à 37°C, sous atmosphère humide et avec 5 % de dioxyde de carbone (CO₂) dans l'air. Les milieux de culture recommandés par les fournisseurs ont été utilisés : milieu RPMI-1640 (Gibco) ou milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) (Gibco) avec du GlutaMAX, supplémentés avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco), et avec 1 % d'un cocktail antibiotique-antifongique (Gibco). Le milieu de culture a été renouvelé dans les flasques de culture tous les 2-3 jours.

4.3. Repiquage des cellules

Après débarras du milieu de culture, la flasque a été rincée avec du DPBS, puis une solution de trypsine-EDTA 0,05 % (Gibco) a été introduite pour dissocier les cellules adhérentes. Une fois les cellules détachées, du milieu de culture a été ajouté dans la flasque afin d'inactiver l'enzyme trypsine. La solution cellulaire a été récupérée, centrifugée (1000 g, 5 min), et le culot de cellules a été resuspendu dans du milieu de culture. Les cellules ont ensuite été distribuées dans de nouvelles flasques, préalablement remplies de milieu de culture.

4.4. Congélation et décongélation des cellules

Une fois dissociées des flasques de culture, les cellules ont été comptées manuellement sous un microscope à lumière inversée AE31E (Motic) à l'aide d'un hémocytomètre jetable Fast-Read 102 (Biosigma). La viabilité cellulaire a été déterminée en diluant (1/2) les cellules à compter dans du bleu de trypan : la membrane des cellules vivantes est imperméable à ce composé contrairement à celle des cellules mortes, qui apparaissent ainsi bleues. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée (1000 g, 5 min). Le culot de cellules a été resuspendu dans du milieu de culture avec 10 % de DMSO (Corning) comme cryoprotecteur, à une concentration de 2 millions de cellules/mL. Un volume de 1 mL de suspension cellulaire (2 millions de cellules) a été distribué dans des cryotubes individuels. Ces tubes ont ensuite été placés à - 80°C dans des boîtes CoolCell FTS30 (Corning), permettant une congélation progressive des échantillons cellulaires (-1°C par min). Après 24 h, les cryotubes ont été stockés dans un tank rempli d'azote liquide.

Lors d'une nouvelle mise en culture, 1 ou 2 cryotubes de la lignée cellulaire d'intérêt ont rapidement été décongelés à 37°C dans un bain chauffant à billes (Thermo Fisher Scientific). Les cellules ont ensuite été resuspendues dans du milieu de culture et centrifugées (1000 g, 5 min). Après resuspension du culot cellulaire, les cellules ont été distribuées dans des flasques préalablement remplies de milieu de culture.

4.5. Traitement des cellules avec différents composés pharmacologiques

Les lignées cellulaires humaines de CPNPC H1975, HCC4 et CAL-12T ont été traitées avec le composé everolimus (Aadoq Bioscience), à une concentration finale de 100 nM. Pour cela, les cellules ont été cultivées dans des flasques F75 (surface 75 cm²). Une solution mère d'everolimus à 0,01 mM a été préparée en diluant le composé dans du milieu de culture avec 10 % de DMSO (Corning). Un volume de 200 µL de cette solution mère dans 19,8 mL de milieu de culture a été introduit dans chaque flasque de culture. Pour les cellules contrôles traitées uniquement avec le véhicule, un volume de 20 µL de DMSO dans 20 mL de milieu de culture a été introduit dans les flasques. Les lignées cellulaires H1975, HCC4 et CAL-12T ont également

été traitées avec le composé (+)-JQ1 (JQ1) (Adooq Bioscience), à une concentration finale de 1 μ M. Une solution mère de JQ1 à 1 mM a été préparée en diluant le composé dans du DMSO (Corning). Un volume de 20 μ L de cette solution mère dans 20 mL de milieu de culture a été introduit dans chaque flasque F75. Pour les cellules contrôles traitées uniquement avec le véhicule, un volume de 20 μ L de DMSO dans 20 mL de milieu de culture a été introduit dans les flasques. Les cellules ont été traitées avec l'everolimus ou JQ1 pour une durée de 24, 48, 72 ou 96 h, en renouvelant le milieu de culture contenant le traitement/véhicule quotidiennement. Une fois la durée de traitement écoulée, les cellules ont été récupérées pour effectuer des expériences de Western Blot ou de cytométrie de flux.

4.6. Vérification de la non contamination des cellules par des mycoplasmes

Les cellules cultivées ont régulièrement été testées pour s'assurer qu'elles n'étaient pas contaminées par des mycoplasmes, à l'aide du kit MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza). En cas de contamination, les cellules et les milieux/réactifs utilisés pour leur culture ont été éliminés. Le matériel ayant potentiellement été en contact avec les cellules contaminées (par ex. PSM, incubateur, centrifugeuse) a été désinfecté.

5. Test de liaison des radioligands C4 anti-PD-L1 à des cellules humaines de CPNPC PD-L1⁺

Une fois dissociées des flasques de culture, les cellules humaines de CPNPC H1975 PD-L1⁺ ont été lavées 2 fois avec du DPBS, puis resuspendues dans du milieu de culture (RPMI) non complété avec 1 % de BSA (Thermo Fisher Scientific), à une concentration de 8 millions de cellules/mL. Un volume de 250 μ L de solution cellulaire (2 millions de cellules) a été introduit dans des eppendorfs préalablement enduits avec une solution de BSA à 5 %. Dans chaque eppendorf, un volume de 250 μ L de ⁸⁹Zr-IgG C4, ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) ou ⁸⁹Zr-Fab C4 (2 pmol) dans du tampon HEPES a ensuite été mélangé aux cellules (6 réplicats par radioligand C4). Afin de mesurer l'activité totale ajoutée dans les eppendorfs, un volume de 250 μ L de solution de radioligand C4 (2 pmol) a aussi été ajouté dans des eppendorfs sans cellules, contenant simplement 250 μ L de milieu de culture avec 1 % de BSA (3 réplicats par radioligand). Pour évaluer la fixation non-spécifique des radioligands C4 sur les cellules H1975, une expérience de blocking a été effectuée. Pour cela, un volume de 250 μ L de solution de radioligand C4 (2 pmol) contenant aussi un fort excès molaire de ligand C4 froid (100x, 200 pmol) a été ajouté dans des eppendorfs contenant 250 μ L de solution cellulaire (6 réplicats par radioligand C4). Les eppendorfs contenant les solutions cellulaires radioactives (500 μ L total) ont été incubés pendant 2 h à 37°C. Après incubation, les cellules ont été lavées 3 fois avec du DPBS froid, et resuspendues dans 500 μ L de milieu de culture avec 1 % de BSA. L'activité associée aux cellules a été mesurée avec le compteur gamma Wizard² (PerkinElmer). Les valeurs d'activité obtenues ont été corrigées du bruit de fond, correspondant à l'activité détectée par le compteur dans 3 tubes contenant simplement 500 μ L de milieu de culture avec 1 % de BSA. Pour chaque échantillon, l'activité associée aux cellules a été exprimée en pourcentage de l'activité totale ajoutée dans le tube. Cette activité totale a été mesurée à partir des tubes contenant les radioligands C4 dans du milieu de culture avec 1 % de BSA sans cellules.

6. Western Blot

6.1. Récupération et lyse des cellules

Les cellules ont été dissociées des flasques de culture avec une solution de trypsine-EDTA 0,05 % (Gibco), lavées avec du DPBS, puis centrifugées (5 min, 1000 rpm). Le culot de cellule a été incubé pendant 10 min sur la glace dans 200-400 μ L de tampon de lyse cellulaire (10X, Cell Signaling) dilué dans de l'eau ultrapure. Un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (100X, Thermo Scientific) a également été ajouté dans le tampon de lyse. Après incubation, les cellules lysées ont été centrifugées (14 000 rpm, 15 min, 4°C). Le surnageant, correspondant au lysat cellulaire contenant les protéines, a été récupéré. Les lysats de cellules entières ainsi obtenus ont été conservés à -80°C jusqu'à l'étape de quantification protéique. La concentration en protéines dans les lysats de cellules entières a été mesurée avec un kit de dosage protéique à l'acide bicinchoninique (BCA) (Sigma).

6.2. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel

En se basant sur le dosage protéique préalablement réalisé, un volume de lysat cellulaire contenant 30 μg de protéines a été prélevé. Ce volume de lysat a été mélangé avec du tampon de charge Laemmli (4X, Bio-Rad) et de l'eau ultrapure, pour atteindre un volume total d'échantillon protéique de 30 μL . Les échantillons protéiques ainsi préparés ont été chauffés à 70°C pendant 10 min pour dénaturer les protéines. Le système d'électrophorèse Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) a été utilisé avec les gels de polyacrylamide Mini-PROTEAN TGX 4-15 % 10 puits (Bio-Rad). La cuve à électrophorèse a été remplie de tampon de migration Tris/Glycine/SDS (10X, Bio-Rad) jusqu'au niveau indiqué en fonction du nombre de gels. Un volume de 30 μL de chaque échantillon protéique a été chargé dans les puits du gel. Un volume de 7 μL d'échantillon standard Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad) a également été chargé dans le premier puit du gel. Un courant électrique de 150 V a ensuite été appliqué, jusqu'à ce que le front de migration (formant une ligne bleue uniforme) atteigne le bas du gel. Une fois l'électrophorèse terminée, le gel a été extrait de sa cassette pour passer à l'étape de transfert des protéines sur membrane.

6.3. Transfert liquide des protéines sur membrane

La membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF) Immobilon-P (taille des pores 0,45 μm , Merck Millipore) a tout d'abord été activée dans de l'éthanol pendant 30 s, puis réhydratée dans de l'eau ultrapure pendant 1 min sous agitation vigoureuse. Le gel et la membrane ont ensuite été équilibrés dans du tampon de transfert Tris/Glycine (10X, Bio-Rad) dilué dans de l'eau ultrapure avec de l'éthanol (20 % volume total) pendant 15 min. Le montage du « sandwich » pour le transfert liquide a été réalisé sur la cassette de transfert dans l'ordre suivant : 1 fine éponge, 2 couches de papier absorbant (Bio-Rad), le gel, la membrane, 2 couches de papier absorbant, et 1 fine éponge. Les différentes couches du sandwich ont été soigneusement compressées à l'aide d'un rouleau, de manière à évacuer les bulles d'air et à assurer un contact maximal entre le gel et la membrane. La cassette contenant le sandwich a été positionnée dans le système d'électrophorèse Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). La cuve a été remplie de tampon de transfert jusqu'au niveau indiqué, et un bloc de refroidissement a été ajouté. Un courant électrique de 100 V a été appliqué pendant 2h30 pour permettre le transfert électrophorétique des protéines du gel vers la membrane. Une fois le transfert terminé, la

membrane a été récupérée et rincée pendant 5 min dans du TBS. Pour éviter une liaison non-spécifique des anticorps par la suite, les sites de fixation encore libres sur la membrane ont été bloqués par incubation dans une solution de TBS avec 0,1 % de Tween 20 (TBS-T 0,1 %) et 5 % de BSA pendant 2 h.

6.4. Immunodétection des protéines d'intérêt

La membrane a été incubée avec l'anticorps primaire ciblant la protéine d'intérêt, dilué dans du TBS-T 0,1 % avec 5 % de BSA selon le facteur de dilution recommandé par le fournisseur (Tableau 28), pendant toute une nuit à 4°C sous agitation douce. Le lendemain, la membrane a été lavée 5 fois 5 min avec du TBS-T 0,1 %. Elle a ensuite été incubée avec l'anticorps secondaire dirigé contre l'espèce d'origine de l'anticorps primaire et conjugué avec l'enzyme peroxydase de raifort (HRP) (Tableau 29), dilué dans du TBS-T 0,1 % avec 5 % de BSA. L'incubation avec l'anticorps secondaire s'est déroulée pendant 1 h à température ambiante. Après incubation, la membrane a été lavée 5 fois 5 min avec du TBS-T 0,1 %. Elle a ensuite été recouverte avec une solution de substrat chimioluminescent Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) pendant 1-5 min à l'abri de la lumière. La membrane a enfin été positionnée dans l'imageur FUSION FX imaging System (Vilber), pour détection des protéines par chimioluminescence. Les images acquises ont été traitées avec le logiciel Image J (v1.53i) pour le recadrage, l'inversion de couleur noir/blanc, et l'ajustement du contraste global.

Tableau 28. Liste des anticorps primaires utilisés pour les expériences de Western Blot. Les anticorps sont classés par masse moléculaire décroissante de leurs protéines cibles.

Protéine cible de l'anticorps primaire	Réactivité	Origine	Dilution	Référence	Fournisseur
c-Myc (67 kDa)	Humain	Souris	1/200	Clone 9E10 sc-40	Santa Cruz Biotechnology
α -tubuline (52 kDa)	Humain, souris, rat, singe	Lapin	1/1000	#2144	Cell Signaling
PD-L1 (40-50 kDa)	Humain	Lapin	1/1000	Clone E1L3N #13684	Cell Signaling
FRA1 (40 kDa)	Humain	Lapin	1/1000	Clone D80B4 #5281	Cell Signaling
Protéine ribosomale S6 (32 kDa)	Humain, souris, rat, singe	Lapin	1/1000	Clone 5G10 #14467	Cell Signaling
Protéine ribosomale phospho-S6 (Ser240/244) (32 kDa)	Humain, souris, rat, singe	Lapin	1/1000	Clone D68F8 #5364	Cell Signaling
4E-BP1 (15-20 kDa)	Humain, souris, rat, singe	Lapin	1/1000	Clone 53H11 #9644	Cell Signaling
Phospho-4E-BP1 (Ser65) (15-20 kDa)	Humain, souris, rat, singe	Lapin	1/1000	#9451	Cell Signaling

Abréviations : FRA1, « Fos-related antigen 1 » ; PD-L1, « programmed death-ligand 1 » ; Ser, sérine ; 4E-BP1, « eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 ».

Pour le stripping, après l'acquisition des premières images, la membrane a été lavée dans du TBS-T 0,1 % pendant 5 min, puis incubée dans le tampon Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific) pendant 10 min. Après lavage 3 fois 10 min dans du

TBS-T 0,1 %, la membrane a alors pu être réutilisée pour la détection d’une seconde protéine d’intérêt, en reprenant le protocole de WB à partir de l’étape de saturation des sites de fixation non-spécifiques avec la solution de BSA.

Tableau 29. Liste des anticorps secondaires conjugués à l’enzyme peroxydase de raifort (HRP) utilisés pour les expériences de Western Blot.

Anticorps secondaire	Réactivité	Origine	Dilution	Référence	Fournisseur
Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	IgGs lapin	Âne	1/10 000	711-035-152	Jackson ImmunoResearch
Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG	IgGs souris	Lapin	1/10 000	315-035-003	Jackson ImmunoResearch

6.5. Quantification relative des niveaux d’expression protéique

Différentes lignées cellulaires humaines de CPNPC ont été traitées avec les composés pharmacologiques everolimus et JQ1. L’impact de ces traitements sur l’expression totale de diverses protéines cibles (par ex. PD-L1) par ces cellules a ensuite été analysé par Western Blot. Pour chaque condition de traitement, le niveau relatif d’expression de la protéine d’intérêt par rapport à la condition contrôle (véhicule) a été calculé. Pour cela, l’intensité des bandes sur la membrane de WB a été quantifiée à l’aide du logiciel ImageJ (v1.53i), selon la méthode décrite dans la documentation du logiciel (*ImageJ Analyze Menu*, 2021).

7. Animaux utilisés

Les procédures relatives aux expérimentations animales réalisées dans le cadre de cette thèse sont décrites selon les recommandations ARRIVE (« Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments ») (Percie du Sert *et al.*, 2020).

7.1. Réglementation associée à l’expérimentation animale

Les expérimentations animales ont été effectuées en accord avec la directive européenne 2010/63/EU relative à la protection des animaux de laboratoire et sa transposition dans la loi française (décret n°2013-118). Les études précliniques ont été conduites sur la plateforme d’imagerie du CEA au Service Hospitalier Frédéric Joliot (CEA-SHFJ, autorisation D91-471-105). L’autorisation du projet d’expérimentation animale a été délivrée par le Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche, après avis favorable du comité d’éthique pour l’expérimentation animale (CEEA) local CEA DSV IdF (CEEA-044).

7.2. Souris utilisées

Des souris (*Mus musculus*) nudes femelles de souche NMRI-FOXN1 Nu/Nu (Janvier) ont été utilisées pour l’ensemble des expériences *in vivo*. Cette souche de souris immunodéficientes possède une mutation au niveau des 2 allèles du gène Foxn1 (« forkhead box N1 ») à l’origine d’une aplasie thymique, se caractérisant par une absence des lymphocytes T. Les lymphocytes B

et les cellules de l'immunité innée (par ex. cellules Natural Killer, cellules dendritiques, macrophages) sont en revanche toujours présents. La mutation du gène *Foxn1* entraîne également un défaut de kératinisation des follicules pileux se traduisant par une absence de poils, à l'origine du terme « nude ».

7.3. Hébergement des souris

L'hébergement des animaux s'est fait dans une animalerie confinée de niveau de sécurité biologique 2 (A2). Au sein de l'animalerie, la température était fixée à 22°C, le taux d'humidité contrôlé à 40 %, et un cycle de 12 h de lumière/12 h d'obscurité était appliqué. Les souris ont été hébergées dans des cages avec couvercle filtrant ventilées individuellement (4-5 souris par cage). Les souris avaient accès à la nourriture (cubes nutritionnels standards) et à l'eau à volonté.

7.4. Suivi et surveillance des souris

Les animaux ont été régulièrement observés et pesés (2-3 fois par semaine). Dans l'objectif de tout faire pour limiter la souffrance subie par les animaux, des points limites ont été établis, marquant l'interruption immédiate des expérimentations. Ces points limites incluaient par exemple une perte de masse corporelle de plus de 20 %, une dyspnée, une forte diminution de l'activité, ou encore une taille de tumeur sous-cutanée supérieure à 1,5 cm au diamètre le plus large.

7.5. Anesthésie des souris

Pour les procédures expérimentales le nécessitant (injection sous-cutanée de cellules tumorales, imagerie TEP/TDM), les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane (Baxter) dans de l'oxygène à un débit de ~ 1,5 L/min, et à une concentration de 3 % pour l'induction de l'anesthésie, et 1,5-2 % pour la maintenance. Un module d'anesthésie compacte (Minerve) relié à un concentrateur d'oxygène médical JAY-5A OXY.LIFE (Longfian Scitech Co.) ont été utilisés. Les souris ont été placées sur des tapis chauffants durant la durée de l'anesthésie et pendant la période de réveil.

8. Production des xénogreffes humaines sous-cutanées de CPNPC

8.1. Préparation des cellules tumorales à implanter

Les lignées cellulaires humaines de CPNPC H1975 et A549 ont été amplifiées et récupérées dans leur phase exponentielle de croissance. Les cellules ont été comptées, centrifugées (1000 g, 5 min), puis resuspendues dans un mélange 1:1 de DPBS et de Matrigel (BD Biosciences) froid, à une concentration de 40-50 millions de cellules/mL. La suspension cellulaire a ensuite été rapidement placée dans la glace, pour éviter la polymérisation du Matrigel.

8.2. Implantation sous-cutanée des cellules tumorales

Les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane dans de l'oxygène. Chaque souris a été numérotée par poinçonnage des oreilles et pesée. Le site d'injection (haut de la cuisse) a été désinfecté avec du Dakin (Cooper). La suspension de cellules tumorales a été aspirée dans

une seringue de 1 mL, sur laquelle a ensuite été placée une aiguille 25G. Un volume de 100 μL de suspension cellulaire, correspondant à 4-5 millions de cellules, a été injecté en sous-cutané sur les 2 flancs inférieurs de chaque animal. La croissance des tumeurs implantées a été surveillée 2 à 3 fois par semaine, et les souris ont été pesées à la même fréquence. Les animaux ont été utilisés pour les expériences d'imagerie TEP/TDM lorsque leurs tumeurs sous-cutanées atteignaient ~ 8 mm au diamètre le plus large. Le volume moyen des tumeurs déterminé à partir de l'analyse des images TEP était de $0,15 \pm 0,07 \text{ cm}^3$.

9. Imagerie par tomographie par émission de positons couplée à la tomодensitométrie (TEP/TDM)

Les expériences d'imagerie TEP/TDM préclinique réalisées au cours de la thèse sont décrites selon les recommandations publiées par Stout *et al.* (Stout *et al.*, 2013).

9.1. Injection des radioligands C4 anti-PD-L1

Les souris nudes femelles (10 ± 1 semaines, $27,8 \pm 1,3$ g), portant les xénogreffes humaines sous-cutanées de CPNPC, ont été pesées puis anesthésiées par inhalation d'isoflurane dans de l'oxygène. Les animaux ont ensuite reçu une injection intraveineuse (bolus) de ligand C4 radiomarqué au ^{89}Zr ($\sim 100 \mu\text{L}$, $3,7 \pm 0,7 \text{ MBq}$, $7,0 \pm 3,0 \text{ MBq/nmol}$, $0,6 \pm 0,3 \text{ nmol}$). L'injection a été réalisée une fois les animaux positionnés sur l'imageur, quelques secondes (~ 20 s) après le lancement de l'acquisition TEP, via un cathéter placé dans la veine caudale latérale. Immédiatement après l'injection du radioligand C4, le cathéter a été rincé avec de la solution saline (0,9 % NaCl) afin de minimiser la radioactivité résiduelle dans celui-ci. Pour les expériences de blocking, en plus du radioligand C4, les souris ont été co-injectées avec un excès molaire (20x) de ligand C4 non radiomarqué ($\sim 200 \mu\text{L}$, 1,2 nmol).

9.2. Acquisition des données TEP/TDM

Les examens TEP corps entier des souris ont été réalisés avec les scanners Inveon microPET et Inveon microPET/CT (Siemens), qui possèdent un champ de vue axial de 12,7 cm et une résolution spatiale de $\sim 1,5$ mm (largeur à mi-hauteur). Une fenêtre d'énergie 350–650 keV et une fenêtre de coïncidence de 3,43 ns ont été utilisées. Une acquisition TEP dynamique a été lancée quelques secondes (~ 20 s) avant l'injection du radioligand C4, pour une durée de 60 min. Des acquisitions TEP statiques de 20 min ont ensuite été réalisées à différents temps post-injection (4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 7 jours). Les données TEP enregistrées en mode liste ont été stockées dans des sinogrammes. Sur le scanner Inveon microPET, après chaque acquisition TEP, un scan de transmission d'une durée de 6,6 min a été effectué en mode photons simples avec 2 sources ponctuelles de Cobalt-57 (^{57}Co) rotatives pour la correction d'atténuation des photons. Sur le scanner Inveon microPET/CT, après chaque acquisition TEP, un scan TDM d'une durée de 11 min (120 projections, 220 rotations) a été réalisé pour la correction d'atténuation des photons. Les paramètres du tube à rayons X étaient fixés à 500 μA pour l'intensité du courant parcourant le tube, 250 ms pour le temps d'exposition, et 80 kV pour l'énergie des rayons X émis. Les images TDM ont été acquises à 2 positions de lit successives (5 min et 30 s par position, superposition de 35,9 % entre les positions), couvrant un champ de vue axial total de 13 cm.

9.3. Reconstruction des images TEP/TDM

Les données TEP ont été reconstruites en images à l'aide du logiciel Inveon Acquisition Workspace (v2.1, Siemens). La méthode de reconstruction en 3 dimensions OP-OSEM pour « Ordinary Poisson Ordered-Subset Expectation Maximization » (2 itérations OSEM3D), suivie d'un algorithme OS-MAP pour « Ordered-Subset Maximum *A Posteriori* » (18 itérations MAP avec 16 sous-ensembles par itération) a été utilisée. La taille de la matrice des images TEP reconstruites était de 256 x 256 pixels avec 159 coupes, donnant une dimension de voxel de 0.38 mm x 0.38 mm x 0.80 mm. Une normalisation des données TEP a été appliquée pour corriger les variations de réponse du détecteur. Les phénomènes de temps mort, de diffusion et d'atténuation des photons, et de décroissance radioactive ont également été corrigés sur les données acquises. Les acquisitions TEP dynamiques ont été arrangées en 24 images ou « frames » (3 x 0,5 min, 5 x 1 min, 5 x 2 min, 3 x 3 min, 3 x 4 min, 4 x 5 min, et 1 x 2,5 min). Les images TDM ont été reconstruites en utilisant l'algorithme de reconstruction de volumes à partir de projections coniques « Feldkamp cone beam reconstruction algorithm ». La taille de la matrice des images TDM reconstruites était de 496 x 496 pixels avec 630 coupes, donnant des voxels cubiques de volume 0,21 mm³.

9.4. Analyse des images TEP/TDM

L'analyse des images TEP/TDM a été effectuée avec le logiciel PMOD (v3.9, PMOD Technologies LLC). Les images TEP et TDM ont tout d'abord été rognées autour du corps entier de l'animal. L'image TEP a ensuite été ré-échantillonnée par interpolation trilineaire pour obtenir une taille de voxel similaire à celle de l'image TDM. Sur chaque image TEP, des volumes d'intérêt (VOIs pour « volumes of interest ») ont été dessinés dans les principaux organes fixant la radioactivité et dans les tumeurs, en s'aidant de l'image TDM anatomique pour les acquisitions hybrides. Des VOIs sphériques (3,5-8 mm³) ont été définis dans des zones représentatives du cœur, du foie, de la rate, et des reins. Le corps entier de l'animal et les tumeurs sous-cutanées ont été délimités semi-automatiquement, en utilisant l'outil « auto iso-contour » du logiciel et en ajustant ensuite les contours manuellement sur chaque coupe. Pour les acquisitions TEP dynamiques, une image unique a tout d'abord été produite à partir des 24 images avec la fonction « Average » (chaque voxel de cette image ayant pour valeur la moyenne des valeurs du voxel correspondant sur les 24 images). Les VOIs ont été dessinés sur cette image moyennée, puis ils ont été appliqués sur les 24 images. Pour chaque VOI, divers paramètres comme la concentration moyenne en activité (kBq/cm³) ou le volume (cm³) ont été calculés par le logiciel. Pour quantifier l'accumulation des radioligands C4 dans les organes d'intérêt de chaque animal, la concentration moyenne en activité calculée dans chaque VOI a été corrigée par rapport au temps d'injection (pour tenir compte de la décroissance radioactive) et divisée par l'activité totale administrée (kBq), pour finalement obtenir le pourcentage d'activité injectée par unité de volume de tissu (% ID/cm³).

10. Etude *ex vivo* de la biodistribution des radioligands C4 anti-PD-L1

Après la dernière session d'imagerie TEP/TDM longitudinale, un volume de ~ 500 µL de sang a été prélevé par ponction cardiaque sur les souris anesthésiées, avec une seringue de 1 mL et une aiguille 27G. Les souris ont ensuite été sacrifiées par dislocation cervicale. Les organes/tissus sains principaux (cerveau, cœur, poumons, foie, reins, rate, intestin, muscle et os) et les tumeurs sous-cutanées ont été prélevés. Une fois collectés, le sang, les organes sains et la

tumeur ont été pesés puis comptés avec le compteur gamma Wizard² (PerkinElmer). Pour chaque souris, les valeurs d'activité obtenues ont été corrigées du bruit de fond (activité détectée par le compteur dans 3 tubes vides) et ramenées au temps d'injection du radioligand. Les valeurs d'activité corrigées ont été divisées par l'activité total injectée (kBq) et par la masse du tissu (g), pour finalement obtenir le pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (% ID/g).

11. Modélisation de la pharmacocinétique (PK) plasmatique des radioligands C4 anti-PD-L1

11.1. Choix du modèle et estimation des paramètres PK

En considérant que les anticorps/fragments d'anticorps sont essentiellement présents dans le plasma (pas d'interaction avec les globules rouges), la concentration en activité dans le plasma $C_{plasma}(t)$ des radioligands C4 (% ID/cm³ ou % ID/mL) a été calculée selon la formule suivante :

$$C_{plasma}(t) = \frac{C_{coeur}(t)}{0,55}$$

Avec :

- $C_{coeur}(t)$ concentration en activité dans le VOI cœur (sang) déterminée pour chaque acquisition TEP (% ID/cm³ ou % ID/mL).
- La valeur 0,55 représentant la proportion de plasma dans le volume de sang total (Mathew, Sankar and Varacallo, 2021).

Pour chacun des radioligands C4, les valeurs de concentration en activité dans le plasma $C_{plasma}(t)$ obtenues pour chaque animal ont été rassemblées et ajustées à un modèle bi-compartimental avec injection intraveineuse en bolus et élimination d'ordre 1, à l'aide du logiciel NONMEM (v6.2). Les paramètres pharmacocinétiques V_C , V_P , CL et Q ont été estimés à partir de l'équation :

$$C_{plasma}(t) = \frac{A_0}{V_C} \times \left(\frac{k_{21} - \alpha}{\beta - \alpha} e^{-\alpha \times t} + \frac{k_{21} - \beta}{\alpha - \beta} e^{-\beta \times t} \right)$$

$$\alpha = \frac{k_{21} \times k_{10}}{\beta}$$

$$\beta = \frac{1}{2} \times \left(k_{21} + k_{12} + k_{10} - \sqrt{(k_{21} + k_{12} + k_{10})^2 - 4 \times k_{21} \times k_{10}} \right)$$

$$k_{10} = \frac{CL}{V_C} \quad k_{12} = \frac{Q}{V_C} \quad k_{21} = \frac{Q}{V_P}$$

Avec :

- A_0 activité totale injectée, égale à 100 %.
- V_C volume du compartiment central (mL).
- V_P volume du compartiment périphérique (mL).
- CL clairance du compartiment central (mL/h).
- Q clairance du compartiment périphérique vers le compartiment central (mL/h).

11.2. Validation du modèle

Le modèle bi-compartmental choisi pour modéliser la PK plasmatique des radioligands C4 a été validé par « Visual Predictive Check » (VPC). Cette méthode permet d'évaluer si le modèle est capable d'estimer correctement la variabilité des données expérimentales observées (Karlsson and Holford, 2008). Pour chaque valeur $C_{plasma}(t)$ expérimentale, 1000 simulations de Monte Carlo ont été effectuées en prenant en compte la variabilité des données expérimentales. Les 5^e, 50^e (médiane) et 95^e percentiles des valeurs simulées à chaque temps ont ensuite été calculés, et les courbes correspondantes ont été représentées sur le graphique des données expérimentales réellement observées (Figure 56). La variabilité des données expérimentales est considérée comme raisonnablement estimée lorsque l'intervalle de confiance à 90 % de la proportion des données expérimentales à l'extérieur de l'intervalle [5^e ; 95^e percentiles] des données simulées inclut la valeur théorique de 10 %, ce qui était bien le cas pour les 3 radioligands C4 (Tableau 30).

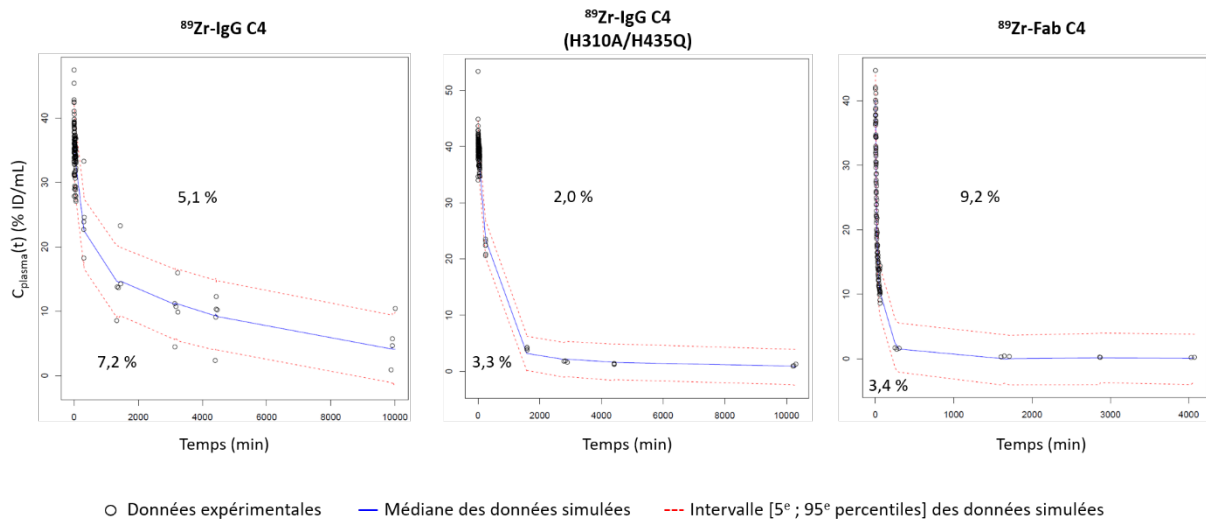


Figure 56. Validation du modèle bi-compartmental pour modéliser la PK plasmatique des radioligands C4 par « Visual Predictive Check » (VPC). Pour chaque radioligand C4, les courbes des 5^e, 50^e (médiane) et 95^e percentiles des valeurs simulées sont représentées sur le graphique des données expérimentales de concentration en activité dans le plasma $C_{plasma}(t)$ (% ID/mL). La proportion de données expérimentales en dessous du 5^e percentile et au-dessus du 95^e percentile des valeurs simulées est également indiquée sur chaque figure. Abréviation : ⁸⁹Zr, zirconium-89.

Les intervalles de confiance à 95 % des paramètres V_C , V_P , CL et Q estimés avec le modèle bi-compartmental ont été calculés par « bootstrap ». Cette méthode de rééchantillonnage consiste à créer 1000 échantillons par tirage aléatoire avec remise dans la base des données expérimentales et, pour chaque échantillon ainsi créé, à estimer les paramètres V_C , V_P , CL et Q avec le même modèle bi-compartmental (Davison, 2006). Pour chaque paramètre, la fonction de répartition des 1000 estimations est alors construite pour calculer la médiane et les intervalles de confiance à 95 %. Le modèle cinétique est validé si les intervalles de confiance à 95 % ne contiennent pas la valeur 0, et si la médiane de chaque paramètre est proche de la valeur du paramètre estimée par le modèle, ce qui était bien le cas pour les 3 radioligands C4 (Tableau 31).

Tableau 30. Validation du modèle bi-compartmental pour modéliser la PK plasmatique des radioligands C4 par « Visual Predictive Check » (VPC).

	⁸⁹ Zr-IgG C4	⁸⁹ Zr-IgG C4 (H310A/H435Q)	⁸⁹ Zr-Fab C4
Nombre total de données expérimentales	138	152	119
Nombre de données expérimentales hors limites ^a	17	8	15
Proportion de données expérimentales hors limites (%)	12,3	5,3	12,6
Intervalle de confiance à 90 % de la proportion de données expérimentales hors limites (%)	[7,3 ; 19]	[2,3 ; 10,1]	[7,2 ; 19,9]

^aNombre de données expérimentales à l'extérieur de l'intervalle [5° – 95° percentiles] des données simulées.

Abréviation : ⁸⁹Zr, zirconium-89.

Tableau 31. Evaluation de l'exactitude et de la stabilité des paramètres PK estimés avec le modèle bi-compartmental par « bootstrap ».

	Valeur estimée	Médiane calculée par bootstrap	Intervalle de confiance à 95 % calculé par bootstrap
⁸⁹Zr-IgG C4			
V _c (mL)	2,71	2,68	[2,12 ; 2,90]
V _P (mL)	2,51	2,60	[0,77 ; 4,25]
CL (mL/h)	0,047	0,051	[0,027 ; 0,076]
Q (mL/h)	0,30	0,33	[0,13 ; 19,5]
⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q)			
V _c (mL)	2,41	2,41	[2,36 ; 2,46]
V _P (mL)	9,92	9,84	[6,83 ; 736 000]
CL (mL/h)	0,16	0,16	[0,10 ; 0,19]
Q (mL/h)	0,18	0,18	[0,17 ; 0,23]
⁸⁹Zr-Fab C4			
V _c (mL)	2,31	2,30	[2,23 ; 2,38]
V _P (mL)	2,30	2,36	[1,99 ; 2,94]
CL (mL/h)	2,46	2,46	[2,05 ; 2,64]
Q (mL/h)	4,42	4,49	[2,81 ; 7,2]

Abréviations : CL, clairance du compartiment central (mL/h) ; Q, clairance du compartiment périphérique vers le compartiment central (mL/h) ; V_C, volume du compartiment central (mL) ; V_P, volume du compartiment périphérique (mL) ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

11.3. Calcul des paramètres PK secondaires

L'estimation des paramètres V_C, V_P, CL et Q a ensuite permis de calculer divers paramètres PK secondaires.

- La constante k_{10} de vitesse d'élimination du compartiment central (h^{-1}) :

$$k_{10} = \frac{CL}{V_C}$$

- La constante k_{12} de vitesse de distribution du compartiment central vers le compartiment périphérique (h^{-1}) :

$$k_{12} = \frac{Q}{V_C}$$

- La constante k_{21} de vitesse de distribution du compartiment périphérique vers le compartiment central (h^{-1}) :

$$k_{21} = \frac{Q}{V_p}$$

- La demi-vie biologique de distribution $t_{1/2\alpha}$ (h) :

$$t_{1/2\alpha} = \frac{\ln(2)}{\alpha}$$

- La demi-vie biologique d'élimination $t_{1/2\beta}$ (h) :

$$t_{1/2\beta} = \frac{\ln(2)}{\beta}$$

- L'exposition plasmatique AUC_{plasma} (% ID*h/mL) :

$$AUC_{plasma} = \frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta}$$

$$A = \frac{A_0}{V_C} \times \frac{k_{21} - \alpha}{\beta - \alpha} \quad B = \frac{A_0}{V_C} \times \frac{k_{21} - \beta}{\alpha - \beta}$$

12. Cytométrie de flux

12.1. Préparation de suspensions cellulaires à partir de cellules cultivées ou de tumeurs solides

Les cellules cultivées ont été dissociées des flasques de culture avec une solution de Versène (Gibco). Pour les cellules primaires dérivées de tumeurs sous-cutanées, la tumeur a été excisée après sacrifice de l'animal en prenant soin d'enlever les tissus périphériques (peau, graisse), puis elle a été rincée avec de la solution saline (0,9 % NaCl). La tumeur a ensuite été émincée en petits fragments (~ 1 à 3 mm^3) à l'aide de 2 lames de scalpel dans une boîte de Petri remplie de milieu de culture non complété. Les fragments de tumeur ont été transférés dans un falcon, centrifugés (100 g, 5 min), et le surnageant a été éliminé par pipetage. Les fragments ont ensuite été incubés dans $\sim 10 \text{ mL}$ de cocktail enzymatique Accutase (Sigma-Aldrich) pendant

1 h à 37°C, en mélangeant régulièrement la solution avec une pipette sérologique de 10 mL. A la fin de l'incubation, un volume de 20 mL de milieu de culture a été ajouté pour stopper la digestion enzymatique. La solution a ensuite été filtrée à travers une série de tamis cellulaires (PluriSelect) de différentes tailles (500, 200, 70, et 40 µm) pour isoler les cellules primaires tumorales. Les cellules individuelles récupérées à partir des cultures *in vitro* ou des tumeurs sous-cutanées ont été comptées en ajoutant du bleu de trypan (Sigma-Aldrich) pour évaluer la viabilité cellulaire. Les cellules ont ensuite été réparties dans des eppendorfs représentant les différents échantillons à analyser au cytomètre (~ 1 million de cellules par échantillon). Les cellules ont été centrifugées (400 g, 5 min, 4°C), et lavées 2 fois avec du DPBS froid.

12.2. Marquage des suspensions cellulaires avec les anticorps/composés fluorescents

Les cellules (~ 1 million de cellules) ont tout d'abord été incubées pendant 30 min à température ambiante dans 100 µL de marqueur de viabilité Zombie Green (BioLegend) dilué dans du DPBS. Après incubation, les cellules ont été lavées avec du tampon de marquage Cell Staining Buffer (BioLegend) et centrifugées (400 g, 5 min, 4°C). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 20 min sur la glace dans 100 µL d'anticorps conjugué au fluorophore phycoérythrine (PE) dilué dans du tampon de marquage. Les composés/anticorps fluorescents et les concentrations/dilutions utilisées sont indiqués dans le Tableau 32. La concentration optimale de l'anticorps fluorescent anti-PD-L1 (10 µg/mL) a été déterminée par titration sur les cellules humaines de CPNPC H1975 PD-L1⁺, avec une gamme de concentrations allant de 0.001 µg/mL à 75 µg/mL. Après incubation avec l'anticorps fluorescent, les cellules ont été lavées 2 fois avec du tampon de marquage et centrifugées (400 g, 5 min, 4°C). Les cellules de chaque échantillon ont finalement été resuspendues dans 1 mL de tampon de marquage, et transférées dans des tubes en polystyrène (12 x 75 mm) pour être analysées au cytomètre.

Tableau 32. Liste des composés fluorescents utilisés pour les expériences de cytométrie de flux.

Composé	Fluorophore	Réactivité	Origine	Concentration /dilution	Référence	Fournisseur
Anticorps anti-PD-L1	PE	Humain, singe	Souris	10 µg/mL	clone 29E.2A3 #329706	BioLegend
Anticorps isotype contrôle IgG2b, κ	PE	/	Souris	10 µg/mL	clone MPC-11 #400314	BioLegend
Marqueur de viabilité Zombie Green	Emission fluorescente similaire au FITC	/	/	1/500	#423111	BioLegend

Abréviations : FITC : isothiocyanate de fluorescéine ; PE, phycoérythrine ; PD-L1, « programmed death-ligand 1 ».

12.3. Passage des suspensions cellulaires au cytomètre de flux

Les suspensions cellulaires ont été analysées sur le cytomètre Attune NxT (Invitrogen), en vortexant chaque tube avant passage. Les voltages des canaux FSC (« forward scatter ») et SSC (« side scatter ») ont été ajustés avec l'échantillon de cellules non marquées, jusqu'à bien distinguer la population cellulaire sur le graphique SSC-H=f(FSC-H). Les voltages des canaux fluorescents d'intérêt ont été réglés avec ce même échantillon de cellules non marquées, de manière à obtenir sur les histogrammes un signal fluorescent $\sim 10^2$. Les voltages ainsi déterminés ont ensuite été conservés pour toutes les expériences de cytométrie (réalisées sur les mêmes lignées cellulaires) (Tableau 33). Le volume d'acquisition a été fixé à 300 μL avec un débit de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Tableau 33. Réglages des canaux de détection du cytomètre utilisés pour les expériences de cytométrie de flux.

Laser d'excitation	Nom du canal	Filtre d'émission	Voltage du PMT (V)	Seuil de détection du PMT (V)	Fluorophore
Bleu 488 nm 50 mW	FSC	BP	170	25	/
	SSC	488/10 nm	340	Pas de seuil	/
	BL1	BP 530/30 nm	280	Pas de seuil	Zombie Green (FITC)
	BL2	BP 590/40 nm	300	Pas de seuil	PE

Abréviations : BP, filtre passe-bande ; FITC, isothiocyanate de fluorescéine ; FSC, « forward scatter » ; PE, phycoérythrine ; PMT, tube photomultiplicateur ; SSC « side scatter ».

Pour les échantillons cellulaires marqués avec 2 composés fluorescents (anticorps anti-PD-L1 ou isotype contrôle + marqueur de viabilité), une étape de compensation a été nécessaire. Les échantillons contrôles de compensation étaient constitués d'un échantillon de cellules non marquées, d'un échantillon de cellules marquées seulement avec un des 2 anticorps conjugués à la PE, et d'un échantillon de cellules marquées seulement avec le marqueur de viabilité fluorescent. Une fois les échantillons contrôles de compensation passés au cytomètre, une matrice de compensation a automatiquement été générée par le logiciel.

12.4. Analyse des données de cytométrie de flux

Les données acquises sur le cytomètre ont été analysées avec le logiciel FlowJo (v10.7). Les résultats obtenus pour les échantillons doublement marqués ont été corrigés avec la matrice de compensation préalablement déterminée. Les populations cellulaires d'intérêt ont été définies (étape de « gating ») en utilisant les différents canaux de détection. Les cellules tumorales ont tout d'abord été distinguées des débris cellulaires sur le graphique SSC-H=f(FSC-H). Les événements coïncidents représentant des amas de cellules ont ensuite été exclus sur les graphiques SSC-H=f(SSC-A) ou SSC-W=f(SSC-H). Les cellules viables ont été sélectionnées sur l'histogramme Zombie Green-H, et les cellules viables PD-L1⁺ ont finalement été visualisées sur l'histogramme PE-H. Divers paramètres statistiques, comme le nombre d'évènements ou la MFI, ont été dérivés des populations cellulaires définies.

13. Immunohistochimie et histologie

13.1. Récupération et section des tumeurs solides congelées

Après sacrifice des souris, les tumeurs sous-cutanées ont été excisées en prenant soin d'enlever les tissus périphériques (peau, graisse). Les tumeurs ont ensuite été placées dans un contenant rempli d'isopentane et elles ont été rapidement congelées avec de l'azote liquide, avant d'être stockées à -80°C . Les tumeurs congelées ont été coupées en sections de $12\ \mu\text{m}$ d'épaisseur à l'aide du cryostat CM3050 S (Leica Biosystems). Les coupes ont été déposées sur des lames en verre Superfrost Ultra Plus (Thermo Scientific) légendées, conservées ensuite à -80°C .

13.2. Détection de PD-L1 sur les coupes de tumeur congelées par immunohistochimie (IHC)

Les coupes de tumeur congelées ont été fixées pendant 10 min à température ambiante avec une solution de formaline tamponnée neutre à 10 % (Sigma-Aldrich). Les lames ont ensuite été incubées pendant 2 h à température ambiante dans du TBS-T 0,1 % avec 10 % de SVF (Gibco) et 1 % de BSA (Thermo Fisher Scientific) pour bloquer les sites de fixation non spécifiques. Les coupes de tumeur ont été incubées pendant toute une nuit à 4°C dans une chambre humidifiée avec un anticorps primaire anti-PD-L1 humain (clone E1L3N, origine lapin, Cell Signaling #13684) dilué au 1/100 dans du TBS-T 0,1 % avec 1 % de BSA. Les lames ont été rincées 3 fois 5 min dans du TBS-T 0,1 %. Elles ont ensuite été incubées pendant 1 h à température ambiante dans une chambre humidifiée avec un anticorps secondaire anti-lapin conjugué à la HRP (Jackson ImmunoResearch 711-035-152) dilué au 1/500 dans du TBS-T 0,1 % avec 1 % de BSA. Après rinçage des lames 3 fois 5 min dans du TBS-T 0,1%, l'activité de la HRP a été détectée par ajout de DAB (3,3'-Diaminobenzidine, BD Pharmingen) sur les sections pendant 20-30 min (jusqu'à ce que la coloration marron des sections soit bien visible) à température ambiante. Les lames ont été rincées 3 fois 3 min dans de l'eau ultrapure.

La contre-coloration des coupes de tumeur a été effectuée par incubation dans de l'hématoxyline de Harris (Sigma-Aldrich) pendant 2 min. Les lames ont ensuite été rincées 3 fois 1 min dans de l'eau ultrapure, puis rapidement trempées dans une solution d'éthanol à 70 % avec 0,25 % d'acide chlorhydrique (HCl). Après rinçage 3 fois 1 min dans de l'eau ultrapure, les lames ont été incubées pendant 1 min (jusqu'à obtenir une coloration bleue des sections) dans de l'eau du robinet de Scott, constituée de 2 g de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) et de 20 g de sulfate de magnésium (MgSO_4) dilués dans 1 L d'eau ultrapure (pH 8-9). Après rinçage 3 fois 1 min dans de l'eau ultrapure, les lames ont été déshydratées dans des solutions de concentration croissante en éthanol : 3 min dans une solution d'éthanol à 50 %, 3 min dans une solution d'éthanol à 70 %, 3 min dans une solution d'éthanol à 95 %, et 3 fois 3 min dans une solution d'éthanol pur. Enfin, les lames ont été incubées 3 fois 3 min dans du toluène (VWR Chemicals). Du milieu de montage organique Eukitt Quick-hardening mounting medium (Fluka Analytical) a été déposé sur chaque lame, recouverte ensuite d'une lamelle. Les lames ont été séchées au moins 24 h, à l'abri de la lumière.

13.3. Coloration des coupes de tumeur congelées à l'hématoxyline/éosine (H&E)

Les coupes de tumeur congelées ont été fixées pendant 10 min à température ambiante avec une solution de formaline tamponnée neutre à 10 % (Sigma-Aldrich). Les lames ont été rincées 3 fois 3 min dans de l'eau ultrapure puis elles ont été colorées à l'hématoxyline de Harris (Sigma-Aldrich) selon le protocole décrit juste avant, jusqu'à l'étape d'incubation dans l'eau du robinet de Scott suivi du rinçage dans l'eau ultrapure. Les lames ont alors été incubées 30 s dans une solution d'éthanol à 50 %, 30 s dans une solution d'éthanol à 70 %, puis 1 min et 30 s dans de l'éosine Y en solution alcoolique (Sigma-Aldrich). Les lames ont ensuite été incubées 3 min dans une solution d'éthanol à 95 %, 3 fois 3 min dans une solution d'éthanol pur, et 3 fois 3 min dans du toluène (VWR Chemicals). Les lames ont été montées avec le milieu de montage organique Eukitt Quick-hardening mounting medium (Fluka Analytical) et séchées pendant au moins 24 h.

13.4. Visualisation des coupes de tumeur au microscope

Après IHC ou coloration H&E, les coupes de tumeur colorées ont été visualisées à l'aide du microscope Axio Observer 5 associé au logiciel ZEN (v2.6) (Zeiss), avec un éclairage par lumière transmise en fond clair et un facteur de grossissement x20. Après acquisition, diverses modifications de l'image (assemblage ou « stitching », balance des blancs, ajustement du contraste global, ajout d'une barre d'échelle) ont été réalisées à l'aide du logiciel.

14. Analyse dosimétrique des radioligands C4 anti-PD-L1

14.1. Dosimétrie murine des radioligands C4

La dosimétrie murine des 3 radioligands C4 anti-PD-L1, injectés en doses traceuse dans les souris portant les xénogreffes humaines de CPNPC H1975 (PD-L1⁺), a été évaluée. Pour chaque examen TEP, la concentration moyenne en activité (Bq/cm³) dans les principaux organes sources (cœur, foie, reins et rate) a été extraite de l'analyse des images (cf. partie 9.4.). Chaque concentration en activité a ensuite été multipliée par le volume de l'organe correspondant pour obtenir l'activité moyenne dans l'organe (Bq). Pour chaque organe source, la courbe de l'activité moyenne en fonction du temps (courbe TAC pour « time-activity curve ») a alors pu être tracée. L'aire sous la courbe TAC a été calculée à l'aide du logiciel R (v4.0.4) afin d'obtenir l'activité cumulée \tilde{A} (Bq.s). Une intégration numérique par la méthode des trapèzes a été effectuée sur l'intervalle des données expérimentales. A partir du dernier point expérimental, la courbe TAC a été extrapolée à l'infini en prenant seulement en compte la décroissance radioactive du ⁸⁹Zr. Cette courbe de décroissance exponentielle a été intégrée de manière analytique. L'aire totale sous chaque courbe TAC a finalement été calculée comme la somme des aires obtenues par intégration numérique et par intégration analytique. Pour chaque animal, les valeurs d'activité cumulée \tilde{A} (Bq.s) calculées dans les organes sources ont été saisies dans le logiciel de dosimétrie murine RODES (« Rodent Dose Evaluation Software »), développé par l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) (Locatelli *et al.*, 2017). Le logiciel a alors calculé les valeurs de doses absorbée (Gy) dans les différents organes cibles sélectionnés. Pour chaque animal, les valeurs de dose ainsi obtenues dans les organes cibles ont été normalisées par l'activité totale de radioligand injectée (MBq).

14.2. Extrapolation de la dosimétrie humaine des radioligands C4

La dosimétrie humaine des 3 radioligands C4 anti-PD-L1 a été extrapolée à partir des données de biodistribution murines. En plus des organes sources cœur, foie, reins et rate, l'organe source « reste du corps » a également été considéré. L'activité cumulée \tilde{A} (Bq.s) dans le reste du corps a été calculée comme la différence entre l'activité cumulée dans le corps entier et les activités cumulées dans les autres organes sources. Pour chaque animal, les activités cumulées dans les organes sources ont été divisées par l'activité totale de radioligand administrée, pour obtenir les temps de résidence \tilde{a} (Bq.h.Bq⁻¹). Ces temps de résidence ont ensuite été saisis dans le logiciel de dosimétrie IDAC-Dose (« Internal Dose Assessed by Computer ») (Andersson *et al.*, 2017). Le logiciel a alors calculé les valeurs de dose absorbée par unité d'activité administrée (mGy/MBq) dans les organes cibles sélectionnés ainsi que la dose efficace par unité d'activité administrée (mSv/MBq), pour l'homme et la femme adultes de référence définis dans la Publication 110 de la CIPR (ICRP, 2009).

15. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (v9.1.2, GraphPad Software). Le test de Shapiro Wilk a été utilisé pour évaluer la normalité des données de chaque échantillon, et un Q-Q plot a automatiquement été tracé. Dans le cas d'une distribution normale (ce qui était le cas pour tous les échantillons testés), la comparaison statistique entre 2 échantillons a été réalisée avec le test t de Student bilatéral non-apparié/apparié pour les échantillons indépendants/appariés. La comparaison statistique de plus de 2 échantillons a été effectuée par ANOVA à 1 facteur avec test post-hoc de Dunnett (comparaisons multiples). La corrélation entre les valeurs d'activité dans les organes déterminées à partir des images TEP et par comptage *ex vivo* a été calculée par le test de Pearson. Sauf spécifié autrement, les résultats sont présentés sous la forme : valeur moyenne \pm écart-type de la moyenne. Le niveau de significativité statistique des p-valeurs renvoyées par les tests est indiqué sur les graphiques par des astérisques : * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 ; **** p < 0,0001.

Références

- Andersson, M. *et al.* (2017) 'IDAC-Dose 2.1, an internal dosimetry program for diagnostic nuclear medicine based on the ICRP adult reference voxel phantoms', *EJNMMI Research*, 7(1), p. 88. doi:10.1186/s13550-017-0339-3.
- Davison, A.C. (2006) 'Bootstrap Methods and their Application.'
- ICRP (2009) 'Adult Reference Computational Phantoms', *ICRP Publication 110*, Ann. ICRP 39(2).
- ImageJ Analyze Menu* (2021). Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html#gels> (Accessed: 16 September 2021).
- Karlsson, Mats.O. and Holford, N. (2008) 'A tutorial on visual predictive checks.'
- Locatelli, M. *et al.* (2017) 'RODES software for dose assessment of rats and mice contaminated with radionuclides', *Journal of Radiological Protection*, 37(1), pp. 214–229. doi:10.1088/1361-6498/aa58aa.
- Mathew, J., Sankar, P. and Varacallo, M. (2021) *Physiology, Blood Plasma*. StatPearls Publishing. Treasure Island (FL).
- Percie du Sert, N. *et al.* (2020) 'The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research', *PLOS Biology*. Edited by I. Boutron, 18(7), p. e3000410. doi:10.1371/journal.pbio.3000410.
- Smith, K. *et al.* (2009) 'Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen', *Nature Protocols*, 4(3), pp. 372–384. doi:10.1038/nprot.2009.3.
- Stout, D. *et al.* (2013) 'Guidance for Methods Descriptions Used in Preclinical Imaging Papers', *Molecular Imaging*, 12(7), p. 7290.2013.00055. doi:10.2310/7290.2013.00055.
- Vosjan, M.J.W.D. *et al.* (2010) 'Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine', *Nature Protocols*, 5(4), pp. 739–743. doi:10.1038/nprot.2010.13.

Annexe 2. Biodistribution *in vivo* des radioligands C4 anti-PD-L1 dans les modèles de CPNPC humain PD-L1⁺ et PD-L1⁻ – Tableaux de valeurs

Tableau 34. Biodistribution des radioligands C4 dans le modèle préclinique de CPNPC humain PD-L1⁺. Les concentrations en activité dans les organes sains et dans la tumeur (% ID/cm³) ont été extraites des images TEP/TDM, obtenues à différents temps après injection des radioligands C4 anti-PD-L1 dans les souris portant les xénogreffes humaines sous-cutanées de CPNPC H1975 (PD-L1⁺). Les données sont présentées comme la valeur moyenne ± l'écart-type (N = 6 souris par radioligand).

Temps post-injection	1 h	4 h	24 h	48 h	72 h	7 jours
Concentration en activité du ⁸⁹Zr-IgG C4 (% ID/cm³)						
Cœur	18,10 ± 7,53	12,33 ± 1,24	7,97 ± 3,29	5,95 ± 2,48	5,43 ± 2,24	2,85 ± 1,48
Foie	12,66 ± 5,23	8,85 ± 0,45	6,20 ± 0,28	6,18 ± 0,35	5,78 ± 0,38	5,12 ± 0,36
Reins	8,03 ± 3,32	5,83 ± 0,17	3,71 ± 0,53	2,96 ± 0,46	2,99 ± 1,24	1,71 ± 0,96
Rate	8,17 ± 3,38	7,35 ± 0,18	5,48 ± 0,43	4,83 ± 0,27	4,60 ± 0,15	4,41 ± 0,19
Muscle	0,80 ± 0,35	1,02 ± 0,05	0,72 ± 0,08	0,59 ± 0,10	0,62 ± 0,09	0,58 ± 0,06
Tumeur H1975	1,36 ± 0,60	4,06 ± 0,47	4,53 ± 0,32	4,85 ± 0,61	4,15 ± 0,50	3,78 ± 0,24
Concentration en activité du ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) (% ID/cm³)						
Cœur	20,70 ± 0,90	12,19 ± 0,66	2,22 ± 1,22	0,96 ± 0,53	0,71 ± 0,39	0,58 ± 0,33
Foie	11,84 ± 1,06	12,39 ± 0,61	12,00 ± 0,51	10,55 ± 0,38	10,66 ± 0,63	10,26 ± 0,44
Reins	9,05 ± 0,21	5,49 ± 0,44	1,56 ± 0,86	1,05 ± 0,58	0,85 ± 0,47	0,64 ± 0,35
Rate	7,35 ± 0,78	6,72 ± 0,49	3,81 ± 0,58	3,09 ± 0,49	3,24 ± 1,77	2,78 ± 1,53
Muscle	0,72 ± 0,06	0,79 ± 0,06	0,49 ± 0,05	0,43 ± 0,06	0,39 ± 0,03	0,31 ± 0,16
Tumeur H1975	1,48 ± 0,15	3,92 ± 0,51	4,60 ± 0,39	3,48 ± 0,33	2,69 ± 0,27	1,69 ± 0,89
Concentration en activité du ⁸⁹Zr-Fab C4 (% ID/cm³)						
Cœur	6,48 ± 2,74	0,86 ± 0,48	0,19 ± 0,11	0,12 ± 0,07	0,11 ± 0,06	/
Foie	2,90 ± 0,31	1,46 ± 0,07	1,02 ± 0,13	0,90 ± 0,41	0,83 ± 0,38	/
Reins	69,57 ± 28,48	64,91 ± 4,50	40,08 ± 0,99	29,58 ± 13,40	22,76 ± 10,20	/
Muscle	0,54 ± 0,08	0,22 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,06	0,12 ± 0,05	/
Tumeur H1975	1,06 ± 0,12	1,36 ± 0,11	0,79 ± 0,12	0,59 ± 0,26	0,50 ± 0,23	/

Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

Tableau 35. Biodistribution des radioligands C4 dans les modèles précliniques de CPNPC PD-L1⁺ et PD-L1⁻. Les concentrations en activité dans les organes sains et la tumeur (% ID/cm³) ont été extraites des images TEP/TDM, obtenues à différents temps après injection des radioligands C4 anti-PD-L1 dans les souris portant les xénogreffes humaines sous-cutanées de CPNPC H1975 (PD-L1⁺) et A549 (PD-L1⁻). Les données sont présentées comme la valeur moyenne ± l'écart-type (N = 5-6 souris par expérience).

Temps post-injection		1 h	4 h	24 h	48 h	72 h
Concentration en activité du ⁸⁹ Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) (% ID/cm ³)						
Cœur	H1975	20,70 ± 0,90	12,19 ± 0,66	2,22 ± 1,22	0,96 ± 0,53	0,71 ± 0,39
	A549	20,66 ± 0,90	11,20 ± 1,16	2,42 ± 1,33	1,11 ± 0,62	0,92 ± 0,51
Foie	H1975	11,84 ± 1,06	12,39 ± 0,61	12,00 ± 0,51	10,55 ± 0,38	10,66 ± 0,63
	A549	15,33 ± 0,68	19,19 ± 1,07	17,49 ± 0,93	13,12 ± 0,66	11,12 ± 1,20
Reins	H1975	9,05 ± 0,21	5,49 ± 0,44	1,56 ± 0,86	1,05 ± 0,58	0,85 ± 0,47
	A549	9,20 ± 0,65	5,52 ± 0,41	1,42 ± 0,21	0,95 ± 0,53	0,99 ± 0,54
Rate	H1975	7,35 ± 0,78	6,72 ± 0,49	3,81 ± 0,58	3,09 ± 0,49	3,24 ± 1,77
	A549	7,76 ± 0,56	7,00 ± 0,28	3,97 ± 0,29	2,75 ± 0,40	2,68 ± 0,37
Muscle	H1975	0,72 ± 0,06	0,79 ± 0,06	0,49 ± 0,05	0,43 ± 0,06	0,39 ± 0,03
	A549	0,71 ± 0,06	0,77 ± 0,04	0,50 ± 0,07	0,40 ± 0,05	0,35 ± 0,16
Tumeur	H1975	1,48 ± 0,15	3,92 ± 0,51	4,60 ± 0,39	3,48 ± 0,33	2,69 ± 0,27
	A549	0,93 ± 0,11	1,86 ± 0,17	2,27 ± 0,30	1,51 ± 0,33	1,34 ± 0,64
Concentration en activité du ⁸⁹ Zr-Fab C4 (% ID/cm ³)						
Cœur	H1975	6,48 ± 2,74	0,86 ± 0,48	0,19 ± 0,11	0,12 ± 0,07	0,11 ± 0,06
	A549	5,10 ± 1,11	1,45 ± 0,81	0,32 ± 0,18	0,16 ± 0,09	0,14 ± 0,08
Foie	H1975	2,90 ± 0,31	1,46 ± 0,07	1,02 ± 0,13	0,90 ± 0,41	0,83 ± 0,38
	A549	2,68 ± 0,39	1,76 ± 0,21	1,58 ± 0,17	1,33 ± 0,14	1,27 ± 0,18
Reins	H1975	69,57 ± 28,48	64,91 ± 4,50	40,08 ± 0,99	29,58 ± 13,40	22,76 ± 10,20
	A549	76,44 ± 3,59	67,26 ± 5,36	46,97 ± 3,97	35,16 ± 3,88	27,58 ± 4,24
Muscle	H1975	0,54 ± 0,08	0,22 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,06	0,12 ± 0,05
	A549	0,39 ± 0,03	0,23 ± 0,10	0,16 ± 0,07	0,14 ± 0,06	0,10 ± 0,05
Tumeur	H1975	1,06 ± 0,12	1,36 ± 0,11	0,79 ± 0,12	0,59 ± 0,26	0,50 ± 0,23
	A549	0,62 ± 0,06	0,65 ± 0,27	0,39 ± 0,17	0,30 ± 0,14	0,23 ± 0,12

Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

Tableau 36. Expériences de blocking avec les radioligands C4 dans les modèles précliniques de CPNPC humain PD-L1⁺ et PD-L1⁻. Les concentrations en activité dans les organes sains et la tumeur (% ID/cm³) ont été extraites des images TEP/TDM, obtenues au temps optimal après administration du radioligand C4 anti-PD-L1 avec ou sans co-injection d'un excès (20x) de ligand C4 froid, dans les souris portant les xénogreffes humaines sous-cutanées de CPNPC H1975 (PD-L1⁺) et A549 (PD-L1⁻). Les données sont présentées comme la valeur moyenne \pm l'écart-type (N = 5-6 souris pour les expériences sans blocking, N = 3-4 souris pour les expériences avec blocking).

		Concentration en activité (% ID/cm ³)					
		⁸⁹ Zr-IgG C4 48 h p.i.		⁸⁹ Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) 24 h p.i.		⁸⁹ Zr-Fab C4 4 h p.i.	
		Sans blocking	Avec blocking	Sans blocking	Avec blocking	Sans blocking	Avec blocking
Cœur	H1975	5.95 \pm 2.48	6.20 \pm 0.51	2.22 \pm 1.22	2.90 \pm 1.70	0.86 \pm 0.48	0.75 \pm 0.43
	A549	/	/	2.42 \pm 1.33	2.24 \pm 1.30	1,45 \pm 0,81	/
Foie	H1975	6.18 \pm 0.35	6.76 \pm 0.48	12.00 \pm 0.51	11.51 \pm 0.44	1.46 \pm 0.07	1.40 \pm 0.07
	A549	/	/	17.49 \pm 0.93	14.78 \pm 0.03	1,76 \pm 0,21	/
Reins	H1975	2.96 \pm 0.46	3.04 \pm 0.23	1.56 \pm 0.86	1.89 \pm 1.09	64.91 \pm 4.50	61.07 \pm 1.96
	A549	/	/	1.42 \pm 0.21	1.62 \pm 0.17	67,26 \pm 5,36	/
Rate	H1975	4.83 \pm 0.27	4.55 \pm 0.33	3.81 \pm 0.58	4.25 \pm 2.46	/	/
	A549	/	/	3.97 \pm 0.29	3.73 \pm 0.39	/	/
Tumeur	H1975	4.85 \pm 0.61	2.17 \pm 0.55	4.60 \pm 0.39	2.43 \pm 0.32	1.36 \pm 0.11	0.73 \pm 0.03
	A549	/	/	2.27 \pm 0.30	2.37 \pm 0.14	0,65 \pm 0,27	/
Muscle	H1975	0.59 \pm 0.10	0.61 \pm 0.09	0.49 \pm 0.05	0.54 \pm 0.05	0.22 \pm 0.02	0.22 \pm 0.02
	A549	/	/	0.50 \pm 0.07	0.55 \pm 0.04	0,23 \pm 0,10	/

Abréviations : CPNPC, cancer du poumon non à petites cellules ; p.i., post-injection ; % ID/cm³, pourcentage de dose injectée par unité de volume de tissu ; ⁸⁹Zr, zirconium-89.

Annexe 3. Publications scientifiques et communications

Publications scientifiques

- Article de review portant sur l'imagerie TEP des points de contrôle immunitaire en oncologie :
Bouleau, A., Lebon, V. and Truillet, C. (2021) 'PET imaging of immune checkpoint proteins in oncology', *Pharmacology & Therapeutics*, 222, p. 107786.
- Article scientifique présentant les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse sur le développement de nouveaux radioligands pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1 juste accepté :
Bouleau, A., Nozach, H., Dubois, S., Kereselidze, D., Chevaleyre, C., Wang, C., Evans, M.J., Lebon, V., Maillère, B., Truillet, C. (2021) 'Optimizing immunoPET imaging of tumor PD-L1 expression: pharmacokinetic, biodistribution and dosimetric comparisons of ⁸⁹Zr-labeled anti-PD-L1 antibody formats', *JNM*.
- Article scientifique présentant le potentiel de l'ouverture de la barrière hématoencéphalique par ultrasons pour faciliter le passage d'un anticorps thérapeutique anti-EGFR (cetuximab) :
Tran, V. L., Novell, A., Tournier, N., Gerstenmayer, M., Schweitzer-Chaput, A., Mateos, C., Jegou, B., Bouleau, A., Nozach, H., Winkeler, A., Kuhnast, B., Larrat, B., Truillet, C. (2020) 'Impact of blood-brain barrier permeabilization induced by ultrasound associated to microbubbles on the brain delivery and kinetics of cetuximab: An immunoPET study using ⁸⁹Zr-cetuximab', *The Journal of Controlled Release*, 328, p. 304-312.
- Article scientifique sur le radiomarquage enzymatique spécifique du fragment Fab C4 anti-PD-L1 au ¹⁸F en cours de rédaction :
Tran, V. L., Bouleau, A., Nozach, H., Richard, M., Chevaleyre, C., Dubois, S., Evans, M. J., Specklin, S., Truillet, C. 'Efficient site-specific radiofluorination by lipoic acid ligase on anti-PD-L1 immunoPET ligand: a pharmacokinetic and biodistribution comparative study with non-specific radioligation strategies'.

Communications

- Poster présenté aux 6èmes Journées Francophones de Médecine Nucléaire :
Bouleau, A., Nozach, H., Richard, M., Dubois, S., Kuhnast, B., Maillère, B., Lebon, V. and Truillet, C. (2020) 'PET imaging of PD-L1 expression in NSCLC: pharmacokinetic and dosimetric comparisons of a full-length antibody and its associated antibody fragments', *Médecine Nucléaire*, 44(2), p. 116.
- Communication orale au congrès de l'Association Européenne de Médecine Nucléaire (EANM) :
Bouleau, A., Nozach, H., Richard, M., Dubois, S., Torquet, G., Kuhnast, B., Maillère, B., Lebon, V. and Truillet, C. (2020) 'PET imaging of PD-L1 expression in NSCLC: pharmacokinetic comparison of an antibody and its Fab fragment', *EJNMMI*, 47.

Titre : Développement de nouveaux radioligands pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1.

Mots clés : tomographie par émission de positons, PD-L1, anticorps radiomarqués, biomarqueur d'imagerie, pharmacocinétique, inhibiteurs de points de contrôle immunitaire.

Résumé : Les immunothérapies avec des anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1 (« programmed cell death protein 1 »/« programmed cell death-ligand 1 ») ont grandement amélioré la prise en charge des patients souffrant de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) avancé. Chez ces patients, une forte expression de PD-L1 mesurée par immunohistochimie (IHC) sur une biopsie tumorale a été identifiée comme un biomarqueur prédictif de l'efficacité thérapeutique. Cependant, tous les patients avec des tumeurs PD-L1⁺ ne répondent pas aux immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1, tandis que certains patients avec des tumeurs PD-L1⁻ y répondent. L'analyse IHC anti-PD-L1 ne permet pas de capturer l'hétérogénéité spatio-temporelle de l'expression de PD-L1 au sein des différentes tumeurs du patient, ce qui pourrait contribuer à sa valeur prédictive limitée. L'utilisation de la tomographie par émission de positons (TEP) avec des anticorps radiomarqués ciblant PD-L1 (immunoTEP) apparaît comme une approche prometteuse pour évaluer le statut PD-L1 tumoral du patient, en complément des méthodes d'IHC conventionnelles. La TEP offre la possibilité de quantifier en temps réel et de manière non invasive l'expression de PD-L1 dans l'ensemble des tumeurs du patient (tumeur primitive et métastases). L'imagerie TEP de PD-L1 pourrait ainsi être utilisée pour mieux prédire et surveiller l'efficacité des immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1 chez les patients souffrant de CPNPC. Idéalement, les radioligands anti-PD-L1 utilisés pour la TEP doivent diffuser rapidement dans les tumeurs tout en étant vite éliminés du sang, afin d'obtenir des images avec un fort contraste tumeur sur bruit à des temps courts post-injection. L'examen TEP peut alors être réalisé quelques heures seulement après l'administration du radioligand anti-PD-L1, limitant la lourdeur du protocole clinique et la dosimétrie du patient.

L'objectif de cette thèse a été d'explorer différentes stratégies permettant d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques (PK) des radioligands utilisés pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1. Pour cela, deux nouveaux formats de ligand ont été produits à partir de l'anticorps IgG C4 anti-PD-L1. Un fragment Fab C4 (« fragment antigen binding ») a été dérivé de l'anticorps entier. Un anticorps C4 doublement muté (H310A/H435Q) sur son domaine Fc a également été développé. Ces mutations ont été introduites dans le but de supprimer l'interaction entre l'IgG C4 mutant et le récepteur Fc néonatal (FcRn), responsable de la demi-vie plasmatique prolongée des IgGs. La PK et la biodistribution *in vivo* de l'IgG C4, de l'IgG C4 mutant et du fragment Fab C4, radiomarqués au ⁸⁹Zr, ont été comparées par imagerie TEP/tomodensitométrie (TDM) longitudinale dans des modèles précliniques de CPNPC humain PD-L1⁺ et PD-L1⁻. Les trois radioligands C4 ont été capables de détecter efficacement et spécifiquement l'expression de PD-L1 dans les xénogreffes sous-cutanées de CPNPC PD-L1⁺. Le fragment Fab C4 et l'IgG C4 mutant ont tous deux montré une PK accélérée *in vivo* en comparaison de l'IgG C4 parental, avec l'obtention des images TEP de meilleur contraste tumeur sur bruit à des temps plus courts post-injection. Par ailleurs, l'analyse dosimétrique effectuée à partir des données de biodistribution murine des trois radioligands C4 a révélé des valeurs de dose acceptables pour une éventuelle utilisation clinique. Enfin, l'inhibiteur des protéines à bromodomaine et domaine extraterminal (BET) JQ1 a été identifié comme régulant négativement l'expression de PD-L1 *in vitro* dans plusieurs lignées cellulaires humaines de CPNPC. La possibilité de détecter les variations d'expression tumorale de PD-L1 en réponse à un traitement (par ex. JQ1) par imagerie TEP avec les nouveaux radioligands ⁸⁹Zr-Fab C4 et ⁸⁹Zr-IgG C4 mutant développés reste à explorer.

Title : Development of new radioligands for immunoPET imaging of PD-L1.

Keywords : positron emission tomography, programmed cell death-ligand 1, radiolabeled antibodies, imaging biomarker, pharmacokinetics, immune checkpoint inhibitors.

Abstract : Immunotherapies with monoclonal antibodies targeting the PD-1/PD-L1 (programmed cell death protein 1/programmed cell death-ligand 1) immune checkpoint pathway have significantly improved the management of advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). In NSCLC patients, high PD-L1 expression determined by immunohistochemistry (IHC) on tumor biopsies has been identified as a predictive biomarker for therapeutic efficacy. However, patients with PD-L1⁺ tumors can fail anti-PD-1/anti-PD-L1 immunotherapies, while patients with PD-L1⁻ tumors can experience objective responses. The IHC assessment of PD-L1 expression suffers from several limitations that might contribute to the discrepancies observed in treatment response. Notably, a single biopsy cannot reflect the spatio-temporal heterogeneity of PD-L1 expression within and across lesions of a patient. Positron emission tomography (PET) with radiolabeled antibodies targeting PD-L1 (immunoPET) appears as a promising approach to evaluate the patient tumor PD-L1 status, complementing the conventional IHC procedures. PET imaging provides a non-invasive, quantitative and real-time assessment of PD-L1 expression within all the patient lesions (primary tumor and metastases). Therefore, PD-L1 PET imaging may be used to better predict and monitor NSCLC patient responses to anti-PD-1/anti-PD-L1 immunotherapies. Ideally, anti-PD-L1 PET radioligands should rapidly diffuse into tumors while being quickly cleared from the blood. As a result, PET images with high tumor-to-background contrast could be obtained within only hours after radioligand administration, enabling same-day imaging and reducing radiation burden for the patient.

The objective of this PhD thesis was to design and evaluate anti-PD-L1 radioligands with optimized pharmacokinetic (PK) properties for immunoPET imaging of PD-L1 expression. To this purpose, two new ligand formats were developed from the anti-PD-L1 IgG antibody C4. A smaller Fab C4 fragment (« fragment antigen binding ») was derived from the full-length IgG C4. An IgG C4 with two mutations (H310A/H435Q) on its Fc domain was also engineered. These mutations were introduced to suppress the interaction between the double mutant IgG C4 and the neonatal Fc receptor (FcRn), which is responsible for the extended serum half-life of IgGs. The in vivo PK and biodistribution of the ⁸⁹Zr-labeled IgG C4, IgG C4 (H310A/H435Q) and Fab C4 were compared by longitudinal PET/computed tomography (CT) imaging in PD-L1⁺ and PD-L1⁻ human NSCLC preclinical models. The three C4 radioligands effectively and specifically detected PD-L1 expression in subcutaneous PD-L1⁺ NSCLC xenografts. Compared with the parental IgG C4, the Fab C4 fragment and the double mutant IgG C4 demonstrated a faster PK in vivo, with best-contrast PET images obtained at earlier time points after injection. Besides, for each C4 radioligand, human organ absorbed doses extrapolated from murine biodistribution data revealed a favorable dosimetry for potential clinical uses. Eventually, the inhibitor of bromodomain and extraterminal domain (BET) proteins JQ1 was identified as a negative regulator of in vitro PD-L1 expression in several human NSCLC cell lines. The feasibility of detecting variations of tumor PD-L1 expression in response to a specific treatment (e.g. JQ1) by PD-L1 PET imaging with the new ⁸⁹Zr-Fab C4 and ⁸⁹Zr-IgG C4 (H310A/H435Q) radioligands remains to be explored.