

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2012

THESE N°

**RADIOMARQUAGE DES IMMUNOGLOBULINES A ET G AU TECHNETIUM 99M
ET ETUDE IN VITRO**

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Obtenue après soutenance du

Mémoire du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Pharmacie Hospitalière et des collectivités

Présenté et soutenu publiquement

Le 21 Septembre 2012

Par

Hélène CARPENET GUERY

Née le 04 Septembre 1982, à LIMOGES

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur Christiane DELAGE

Président

Monsieur le Professeur Jacques MONTEIL

Juge

Madame le Professeur Anne ROUSSIN

Juge

Madame le Docteur Isabelle QUELVEN BERTIN

Juge, Directeur de thèse

Madame le Docteur Armelle CUVILLIER

Membre invité

Mademoiselle le Docteur Madeleine JAVERLIAT

Membre invité

CORPS ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE LIMOGES

DOYEN DE LA FACULTÉ : Monsieur le Professeur Jean-Luc DUROUX

1er VICE-DOYEN : Madame Catherine FAGNÈRE, Maître de Conférences

2ème VICE-DOYEN : Monsieur Serge BATTU, Maître de Conférences

PROFESSEURS DES UNIVERSITES :

BENEYTOU Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE
DESMOULIÈRE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
LOUDART Nicole	PHARMACOLOGIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES

PHARMACEUTIQUES :

LACHÂTRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIÈNE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLÉDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNÈRE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LÉGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR CERTIFIÉ :

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
----------------------	---------

ASSISTANT HOPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

IMBERT Laurent	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
----------------	-----------------------------------

Remerciements

A notre Président de thèse,

Madame le Professeur Christiane DELAGE,

Pour l'honneur que vous me faites de présider ce jury de thèse.

Au cours de nos études, nous avons pu apprécier la pédagogie de votre enseignement et la richesse de vos connaissances.

Soyez assurée de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect.

A notre Directeur,

Madame le Docteur Isabelle QUELVEN BERTIN,

Pour m'avoir fait découvrir et aimer la Radiopharmacie, qui je le souhaite deviendra mon métier,

Pour ton enseignement et ton perfectionnisme, ta gentillesse, ta disponibilité,

Pour m'avoir toujours encouragée et consacrée de nombreuses heures,

Reçois ici Isabelle, l'expression de toute mon amitié et de mon profond respect.

A nos Maîtres et Juges,

Monsieur le Professeur Jacques MONTEIL,

Pour m'avoir accueillie dans votre service, et m'avoir fait confiance,

Pour m'avoir prodiguée tout au long de mes stages, votre science et votre humanité,

Pour votre accessibilité et votre gentillesse

Veuillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse gratitude.

Madame le Professeur Anne ROUSSIN,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail,

Veuillez trouver ici, l'expression de ma profonde gratitude.

Aux membres invités,

Madame le Docteur Armelle CUVILLIER,

Pour me faire l'honneur de participer à ce jury,

Pour m'avoir fait confiance dans la réalisation de ce travail passionnant,

Pour tes compétences, tes précieux conseils et ta disponibilité au quotidien pour répondre à mes nombreuses questions,

Trouve ici le témoignage de mes vifs remerciements.

Mademoiselle le Docteur Madeleine JAVERLIAT,

Pour me faire l'honneur de participer à ce jury,

Pour m'avoir accueillie depuis mon externat dans votre service,

Pour m'avoir inculquée les bases du métier de pharmacien hospitalier,

Recevez aujourd'hui l'expression de mes sincères remerciements pour vos compétences, votre disponibilité et vos qualités humaines.

Aux pharmaciens de la PUI et aux médecins du Service de Médecine Nucléaire,

A toutes celles et ceux avec qui j'ai pu travailler pendant mon internat, qui m'ont fait découvrir leur domaine et partager leur savoir.

Aux manipulateurs et aux préparateurs du Service de Médecine Nucléaire,

A tous ceux qui m'ont aidé pour mes nombreuses « manips » et qui m'ont encouragée.

A mes co-internes.

Notamment mes précieuses co-internes de Radiopharmacie, Anne-So et Sophie.

Pour tous nos bons moments passés à rigoler dans notre « grand bureau remis à neuf »... et pour l'aide et l'attention que vous m'apportez !!

A toute l'équipe du Laboratoire B Cell Design,

Pour m'avoir consacré de votre précieux temps à m'apprendre les ELISA et les Western Blot, répondre à toutes mes questions et m'aider dans mes « manips ».

A toute l'équipe de l'EA 3842,

Notamment les « 2 » Aurélie, Carole et Romain pour vos précieux conseils, votre disponibilité et vos enseignements de choix sur la Culture cellulaire.

Au laboratoire Covidien,

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

A mes parents, « Véro et Jean-Mi »,

Merci pour tout ce que vous m'apportez au quotidien, votre amour, vos encouragements. Vous avez toujours été présents pour moi et m'avez toujours soutenue durant ces 30 années et notamment ces 10 ou 11 longues années de Pharmacie...

Je souhaite vous témoigner aujourd'hui tout mon amour et ma tendresse.

Et merci pour vos relectures !!!!

A mes deux « petits » frères,

Vous êtes de sacrées crapules, sans qui je m'ennuierai bien !

Merci d'être là et d'avoir toujours été là pour me soutenir mais aussi de m'avoir supportée tout au long de ces années...

Il est temps de vous écrire tout mon amour et toute mon affection.

Sans oublier Misa et son très joli accent tchèque !...Merci

A mes grands parents,

Qui ont toujours été là, et qui m'ont toujours soutenue et encouragée.

J'ai de la chance ! Je vous écris ici toute mon affection et tout mon attachement...

A ma famille et à ma belle famille.

A mes vieilles « cop's » de toujours,

A Flo, merci Spritz,

A Ju et Rélie.

D'avoir été là dans les meilleurs comme dans les pires moments...

Pour votre soutien, vos conseils sans faille et votre énergie à revendre !

Pour toutes nos soirées (ou nuits) de rigolades, de danse et un peu d'ivresse passées...

Juste pour vous dire combien vous comptez pour moi !

A mes « copines co-internes » devenues des amies,

Merci à l'internat de nous avoir fait connaître...

A Gaw. Pour ton aide, tes conseils, ton attention et nos fous rires au quotidien. Pour tous nos souvenirs et nos si bons moments passés au « 4 coins » de la planète ! Merci à toi ! En espérant que le duo « Tic et Tac » soit réuni pour longtemps...

A Marquette. Te souviens tu de notre 1^{ère} rencontre dans ce joli bureau « jaune citron » en 2007 ?

A tous nos délires pendant ces années d'internat. Pour ta détermination et ta « pêche » ! Merci d'être là malgré la distance aujourd'hui.

A Géraldine, Sabrina et Sonia...

A toute la bande de potes pharmaciens,

Ça y est je crois que je suis la dernière de la bande à soutenir ma thèse, et c'est pas trop tôt !!!

Pour notre amitié qui dure depuis les 1^{ères} années de fac c'est à dire plus de 10 maintenant.

Pour toutes nos soirées étudiantes et autres, déguisées ou non! Que de sacrés moments passés ensemble qui ont fait que ces années se sont écoulées bien vite.

A Gaw et Antoine, Gaëlle et Flo, Babeth et Sym, Ben's et Karl, Ed et Nico, Les Ninis, Manue et Julien, Mathieu et François, Sandra et Edouard.

Et bien sûr aux copains « non pharmaciens »,

Juliette et Antoine, Manu et Émilie.

Et A Nico ou Cherry Guerry mon Mari et futur papa...

Merci pour tout ce que tu m'apportes au quotidien et toutes ces petites choses qui font que je vis « comme dans un Chocorêve » ! Pour ta persévérance, ta générosité, ton énergie et ton humour.

Merci d'être et d'avoir été toujours à mes côtés en m'encourageant dans mes choix, tout en supportant mon sale caractère durant toutes ces années...

Comme dit un célèbre chanteur :

« Je souris sur mon vélo, c'est l'amour

Je sourirai encore longtemps, c'est l'amour... »

Sommaire

Remerciements.....	4
Sommaire.....	8
Abréviations	9
Introduction.....	11
Chapitre 1 : Revue bibliographique	13
I. Les immunoglobulines	13
A. Immunoglobulines - anticorps monoclonaux.....	13
B. L'immunoglobuline G.....	22
C. Les variants d'anticorps	29
D. L'immunoglobuline A.....	33
II. Les cibles.....	45
A. Les Lymphomes non Hodgkiniens	45
B. Le Cancer colorectal	51
III. Stratégie de radiomarquage des anticorps	56
A. Rappels de radioactivité	56
B. Applications des radioisotopes en Médecine Nucléaire	62
C. Isotopes utilisés pour le radiomarquage d'anticorps.....	64
D. Radiomarquage au technétium 99m.....	67
IV. Présentation du travail.....	79
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	80
I. Matériel.....	80
A. Les immunoglobulines	80
B. Le technétium 99m et le cœur tricarbonyl	80
C. Les réactifs et les cellules	80
D. Les consommables et les instruments pour les études analytiques	81
II. Méthodes	83
A. Mise au point du radiomarquage des immunoglobulines G et A	83
B. Etude de la conservation des propriétés des immunoglobulines radiomarquées.....	91
Chapitre 3 : Résultats et discussion	100
I. Mise au point du radiomarquage des Immunoglobulines G et A	100
A. Radiomarquage de l'Isolink® avec du pertechnétate de sodium [Na ^{99m} TcO ₄].....	100
B. Radiomarquage des immunoglobulines G.....	100
C. Radiomarquage des immunoglobulines A	105
II. Etude de la stabilité et de la conservation des propriétés des immunoglobulines radiomarquées	112
A. Stabilité du radiomarquage.....	112
B. Intégrité des immunoglobulines radiomarquées	114
C. Immunoaffinité des immunoglobulines radiomarquées sur plaques	115
D. Immunoaffinité des immunoglobulines radiomarquées sur cellules	120
Conclusion - Perspectives	135
Serment de Galien.....	137
Bibliographie.....	138
Table des matières	147
Table des figures	149
Table des tables.....	151

Abréviations

Ac : Anticorps
ADCC : Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps
ACE : Antigène CarcinoEmbryonnaire
Ag : Antigène
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ARA : Arachide
ATCC : American Type Culture Collection
ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation
ASGP-R : asialoglycoprotein receptor
B ou Bound : Concentration en récepteurs occupés par le ligand
BCA : BiCinchoninic Acid assay
BCR : Récepteur pour l'antigène des lymphocytes B
BFCA : BiFunctional Chelate Agent
Bmax : Capacité maximale de liaison de récepteurs
Bq : Becquerel
BNS : Fixation non spécifique
BS : Fixation spécifique
BSA : Albumine from Bovine Serum
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CCR : Cancer Colorectal
CD : Cluster de Différenciation
CDC : Cytotoxicité Dépendante du Complément
CDR : région déterminant la complémentarité avec l'Ag
Ci : Curie
DCI : Dénomination Commune Internationale
DTNB : Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque ou réactif d'Ellman
EGFR : Epidermal Growth Factor
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EMA : European Medicines Agency
¹⁸F : Fluor 18
F ou Free: concentration en ligand libre
Fab : Fragment antigen-binding
Fc : Fragment cristallisable
FDA : Food and Drug Administration
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
Fr : Framework
GAMMAPRIM : Transgenic mice for the C Gamma Gene Human Class-G Immunoglobulins
HAMA : Human Anti-Mouse Antibodies
HAMIGA : Humanised Antibody Made Up Of Monoclonal Immunoglobulin A
HAS : Haute Autorité de Santé
HNPCC : Cancer colorectal héréditaire sans polypose ou Syndrome de Lynch
HSA : Albumine Sérique Humaine
¹²³I : Iode 123
¹³¹I : Iode 131
Ig : Immunoglobuline

IgAd : Immunoglobuline A dimérique
IgAm : Immunoglobuline A monomérique
IgAp : Immunoglobuline A polymérique
IgAs : Immunoglobuline A sécrétoire
IRF : Fraction ImmunoRéactive
IL : Interleukine
¹¹¹In : Indium 111
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
2-IT : 2-Iminothiolane
ITLC-SG : Instant Thin-Layer Chromatography-Gel de Silice
Kd : Constante de dissociation
kDa : kilodalton
keV : kiloélectronvolt
LNH : Lymphome Non Hodgkinien
M : mole par litre
MRP : Médicament RadioPharmaceutique
NK : Cellule Natural Killer
PAF : Polypose Adénomateuse Familiale
PBS : Phosphate Buffer Alkaline
PEG : Polyéthylène Glycol
PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase
pIgR : Récepteur d'Immunoglobulines Polymériques
PRC : Pureté RadioChimique
PVDF : Polyviylidène Fluoride
REA : Radioélément Artificiel
RIS : RadioImmunoScintigraphie
RIT : RadioImmunoThérapie
RIV : Radiothérapie Interne Vectorisée
S : Svedberg
SH : thiol (groupement)
T : concentration totale en ligand ajoutée
TAA : Antigènes Associés aux Tumeurs
^{99m}Tc : Technétium 99 métastable
TDM : Tomodensitométrie
TEL : Transfert Linéique d'Energie
TEMP : Tomographie par Emission MonoPhotonique (ou SPECT en Anglais)
TEP : Tomographie par Emission de Positron (ou PET en Anglais)
TfR : Récepteur de la Transferrine
TNF : Facteur de Nécrose Tumorale
TNM : Tumor, Node, Metastasis
⁹⁰Y : Yttrium 90

Introduction

La médecine nucléaire est une spécialité médicale, fondée sur l'utilisation de radioéléments artificiels (REA) administrés aux patients:

- A des fins diagnostiques : dans ce cas, il s'agit d'émetteurs gamma (γ) ou béta+ ($\beta+$) administrés le plus souvent à l'état de traces et dont la distribution peut être suivie par détection externe en imagerie TEMP (Tomographie par Emission MonoPhotonique) ou TEP (Tomographie par Emission de Positron). Ces examens diagnostiques appelés scintigraphies permettent d'obtenir des informations sur la fonctionnalité et le métabolisme des organes explorés, et représentent 90% de l'activité d'un service de Médecine Nucléaire.
- A des fins thérapeutiques : dans ce cas il s'agit d'émetteurs béta- ($\beta-$) voire alpha (α) employés en Radiothérapie Interne Vectorisée (RIV), le but étant d'irradier des cellules ciblées en épargnant les cellules saines.

Dans ces deux applications, le radiotracer administré au patient est un médicament appelé Médicament RadioPharmaceutique (MRP) répondant à la loi du 8 décembre 1992 et au décret du 26 décembre 2000. Il est défini comme étant soit « un médicament qui lorsqu'il est prêt à l'emploi contient un ou plusieurs isotopes radioactifs » soit « une préparation in situ et extemporanée par marquage de molécule vectrice (trousse) avec un radionucléide choisi (issu d'un générateur ou d'un précurseur) ». Un radiopharmaceutique peut être constitué par un radioisotope seul sous forme d'ion qui joue le rôle de traceur et de vecteur, ou le plus souvent formé d'un traceur (radioisotope) fixé ou complexé à un vecteur permettant d'atteindre la cible biologique visée et de favoriser la concentration de la radioactivité à ce niveau. La vectorisation du REA doit permettre une fixation la plus spécifique possible pour déterminer la localisation de la cible (imagerie) et/ou provoquer sa destruction (radiothérapie), tout en entraînant une diminution du rapport signal/bruit en diagnostic et une limitation des effets indésirables en thérapie. Divers radiotraceurs ont été développés en diagnostic et en radiothérapie et sont aujourd'hui couramment utilisés.

Les vecteurs employés peuvent être soit des petites molécules d'intérêt biologique, des molécules métabolisables, des ligands de récepteur, marquées à l'échelle de traces (10^{-8} à 10^{-12} mole/l ou M) ou soit des macromolécules biologiques utilisées à l'échelle macroscopique (10^{-6} M). Le choix du radionucléide, basé sur la nature du rayonnement émis, ses propriétés physiques, son énergie et sa période, ainsi que ses propriétés chimiques, est conditionné par le type d'utilisation du radiopharmaceutique. Celui-ci doit respecter un certain nombre de caractéristiques pour être utilisable chez des patients, mais aussi pour marquer de manière optimale le vecteur.

La recherche de MRP présentant une affinité spécifique vis-à-vis d'un organe, d'un tissu, d'une pathologie a conduit à s'intéresser à des macromolécules, comme les anticorps, en tant qu'agent de vectorisation reconnaissant un antigène cible. L'essor des anticorps monoclonaux, et le développement de leur marquage sont à l'origine de la RadioImmunoScintigraphie (RIS) en diagnostic et de la RadioImmunoThérapie (RIT) en thérapeutique. Actuellement les immunoglobulines d'isotype G et les fragments de celles-ci sont exploités dans ces domaines. Malgré leur principe séduisant, de nombreuses limitations persistent.

Nous nous proposons d'étudier une classe d'immunoglobuline jusque là délaissée au profit des immunoglobulines G, les immunoglobulines A. Les connaissances sur les immunoglobulines A et leurs applications sont beaucoup plus restreintes, compte tenu de la difficulté de les produire, difficulté qui a été contournée grâce à la technologie HAMIGA. Les immunoglobulines A n'ont de plus jamais été utilisées en imagerie isotopique. Leurs particularités, comme leur tropisme naturel vers les muqueuses, peuvent faire espérer un intérêt en diagnostic comme en thérapeutique dans certains types de tumeurs à localisation muqueuse.

L'objectif de ce travail de thèse est double. Dans un premier temps le but est de mettre au point le radiomarquage des immunoglobulines G et des immunoglobulines A selon la même procédure, afin de pouvoir ultérieurement comparer le comportement de ces deux classes d'immunoglobuline en imagerie isotopique. Dans un second temps, nous étudierons ces immunoglobulines radiomarquées afin de s'assurer que le radiomarquage est stable et n'altère pas les propriétés des anticorps (intégrité, immunoaffinité). Pour ce projet, nous avons décidé de cibler deux antigènes, le CD20 et l'Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE). Le CD20 est un marqueur tumoral du lymphome non hodgkinien. Il a été choisi comme cible car actuellement les immunoglobulines G anti-CD20 sont très appliquées en immunothérapie et en RIT et ont fait preuve de leur efficacité dans cette indication. L'ACE est un marqueur tumoral du cancer colorectal. Il a été choisi comme cible en particulier pour exploiter le tropisme vers les épithéliums muqueux des immunoglobulines A.

Ce manuscrit s'articulera en trois parties. Nous réaliserons tout d'abord une revue bibliographique sur les immunoglobulines G et A, les cancers visés par les antigènes CD20 et ACE et les stratégies de radiomarquage des anticorps. Nous décrirons ensuite le matériel et les méthodes nécessaires à la mise au point du radiomarquage et à l'évaluation des propriétés des anticorps radiomarqués. Enfin, nous présenterons les résultats obtenus, que nous discuterons avant de conclure.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

Cette revue bibliographique portera sur les immunoglobulines, c'est à dire les immunoglobulines G et A, puis sur les deux cancers ciblés par les antigènes étudiés, et enfin sur la stratégie de radiomarquage des anticorps.

I. Les immunoglobulines

A. Immunoglobulines - anticorps monoclonaux

1. Structure des immunoglobulines

C'est en 1939, que Tiselius et Kabat ont séparé par différence de migration électrophorétique à partir d'un sérum, l'albumine, et les différentes fractions de globulines : alpha globuline, bêta globuline, et gammaglobuline (Schroeder, 2010).

On distingue ainsi les alpha (1 et 2), les bêta (1 et 2) et les gamma-globulines dans l'ordre des vitesses de migration décroissantes. Les immunoglobulines produites par les cellules B, sont retrouvées en majorité dans la fraction sérique des gammaglobulines. Chez l'homme cinq classes d'immunoglobuline (Ig) existent : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Les Ig peuvent être liées à la membrane du lymphocyte B, dans ce cas elles jouent le rôle de structure de reconnaissance du lymphocyte B ou BCR spécifique de l'antigène (immunoglobulines de surface) ou être sécrétées par ces lymphocytes différenciés en plasmocytes, dans ce cas les Ig sont appelées anticorps (Ac). Qu'elles soient exprimées à la surface ou excrétées, les Ig possèdent une structure générale voisine.

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

Alors que les chaînes légères comprennent un domaine variable et un domaine constant seulement, les chaînes lourdes sont constituées par un domaine variable et de trois à quatre domaines constants en fonction de la classe d'Ig (Schroeder, 2010). Ils existent 5 types de chaînes lourdes γ , α , μ , δ , et ϵ qui correspondent aux cinq classes d'Ig.

Les chaînes lourdes sont unies entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures ; les chaînes légères sont reliées aux chaînes lourdes par un pont disulfure proche de leur extrémité carboxy terminale (Figure 1.A).

Les domaines variables des chaînes L et H comprennent de courts fragments d'une extrême variabilité qualifiés de régions hypervariables ou CDR (Complementary Determining Region). Ils sont au nombre de 3 par chaîne et sont entrecoupés de « tronçons » relativement bien conservés appelés Fr (Framework).

Les domaines variables VH et VL associés participent à la constitution du site de fixation de l'antigène, où les CDR correspondent aux zones de contact entre l'Ac et le déterminant antigénique correspondant.

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

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

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

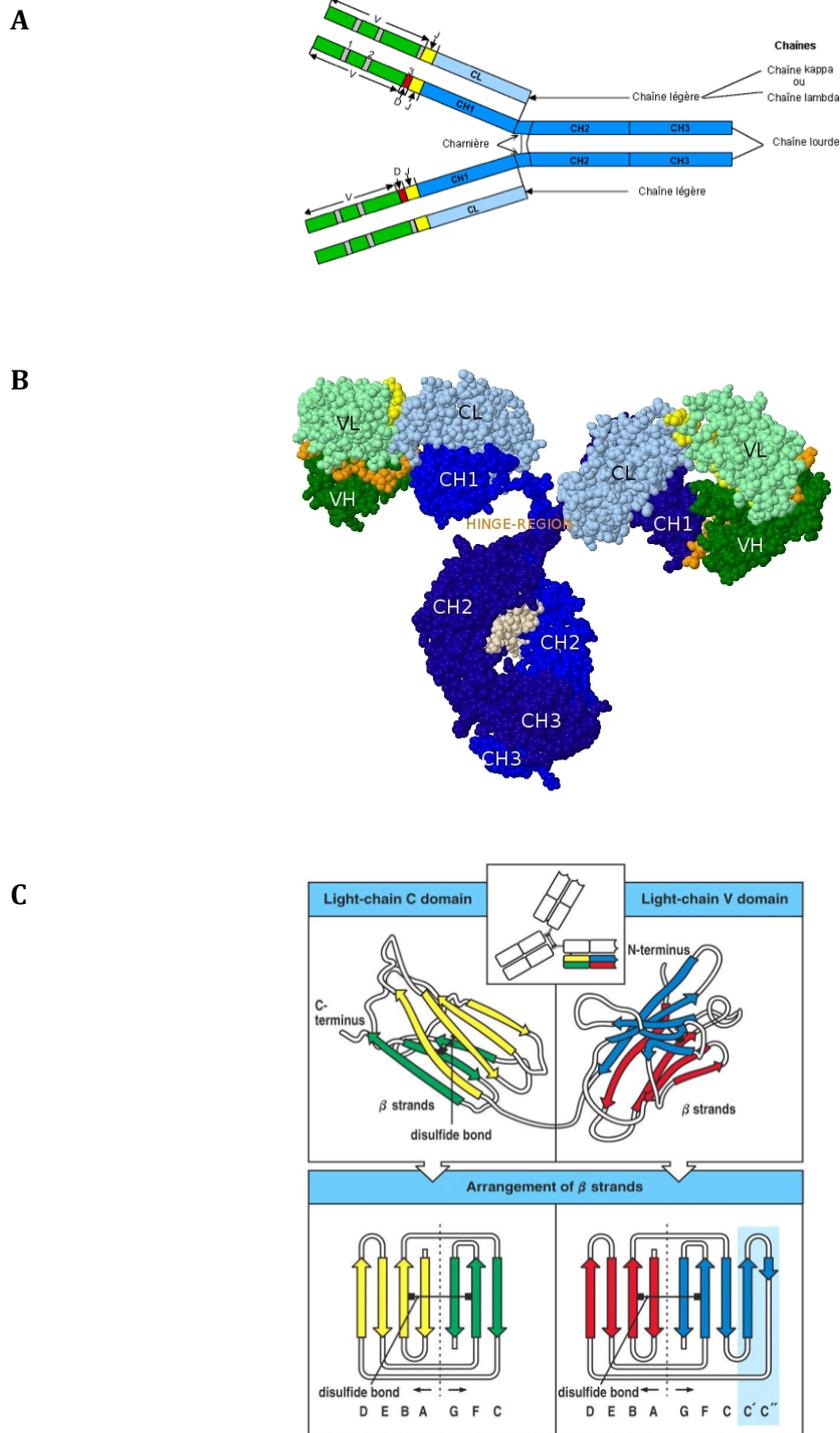


Figure 1 : Structure des immunoglobulines (Ig)

A. Représentation bi-dimensionnelle d'une Ig

B. Représentation tri-dimensionnelle d'une IgG

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

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

2. Fonctions effectrices et propriétés biologiques des anticorps

Les Ac ont trois propriétés : ils se lient à l'antigène, activent la cascade du complément et recrutent les cellules immunocompétentes.

Comme énoncé précédemment, la structure des Ig a pu être élucidée par des protéolyse partielles enzymatiques ou chimiques. La protéolyse enzymatique par la papaïne, proposée en 1958 par Porter et Edelman, a permis de générer, deux fragments identiques univalents (ne possèdent qu'un site Ac) appelés Fab qui conservent l'activité de liaison à l'antigène (Ag), ainsi qu'un fragment cristallisable en solution aqueuse, Fc. La protéolyse enzymatique par la pepsine produit deux fragments : un grand fragment $F(ab')_2$ et des petits peptides. $F(ab')_2$ se comporte pratiquement comme un Ac entier (Figure 2).

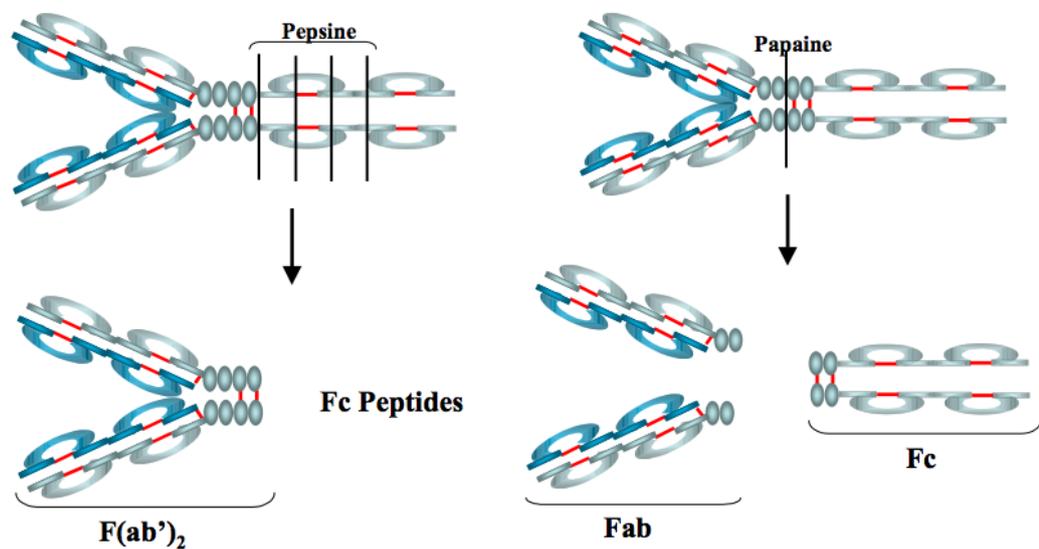


Figure 2 : Hydrolyse enzymatique des immunoglobulines par la papaïne et la pepsine

Ces hydrolyses ont permis de définir trois types de fragments Fab, Fc et $F(ab')_2$.

Les Ig possèdent une dualité fonctionnelle expliquant leurs propriétés :

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

Le paratope sur l'Ac est complémentaire de l'épitope de l'Ag. Cette liaison Ag-Ac est non covalente, elle fait intervenir des liaisons hydrogène, électrostatiques, ou hydrophobes et des forces de Van des Waals.

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

- Cytotoxicité dépendante du complément CDC (Figure 3). Il s'agit d'une voie cytotoxique dépendante du complément. Elle comprend trois voies : classique, alterne et la voie des lectines. La CDC par voie classique est dépendante de la liaison du fragment Fc avec le C1q du complément. Cette liaison permet d'activer la cascade du complément qui aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire et à la lyse de la cellule cible. La glycosylation des Ig joue un rôle prépondérant dans l'activation de cette fonction.
 - Activation de la voie classique après liaison à l'Ag : IgM>IgG1>IgG3 > IgG2
 - Activation de la voie alterne : IgG1, 2, 3 et 4 ou IgA agrégées
- Liaison à des récepteurs spécifiques du Fc, notamment les FcγRs présents sur de nombreuses cellules immunitaires (cellules Natural Killer (NK), monocytes). La liaison de Fc avec ces récepteurs entraîne une activation et une réponse cellulaire comme une phagocytose, un phénomène d'ADCC (Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity). L'ADCC est une autre voie cytotoxique, elle sera abordée plus en détail dans le paragraphe I.B.2. Chaque classe d'Ig possède des récepteurs, ils seront décrits pour les IgG et les IgA.
- Traversée du placenta
- Catabolisme des Ig.

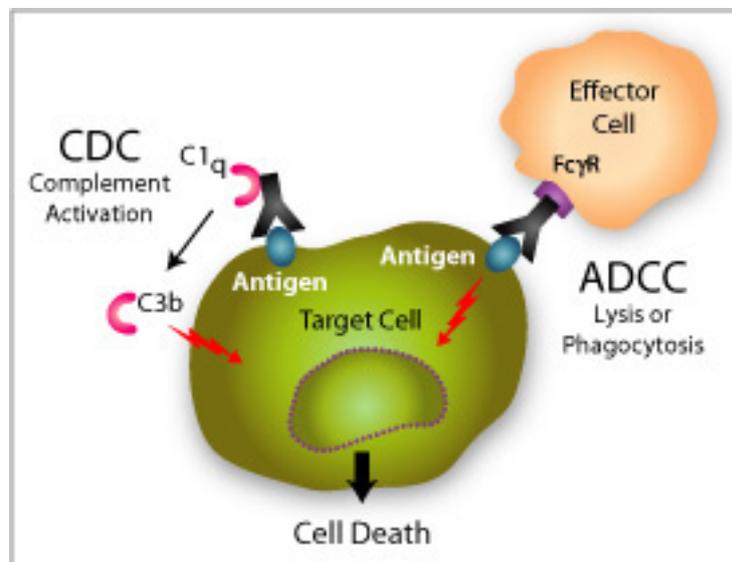


Figure 3 : Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps (ADCC) et Cytotoxicité Dépendante du Complément (CDC).

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

3. Anticorps monoclonaux : des anticorps monoclonaux chimériques aux anticorps humains

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

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

Les Ac monoclonaux présentent d'importants avantages par rapport aux Ac polyclonaux du sérum. Ils peuvent être cultivés *in vitro* pendant des années et congelés sans modification de l'Ac qu'ils produisent, avec la même affinité et les mêmes propriétés physicochimiques (Siberil, 2005).

L'obtention de tels Ac désignés par le suffixe *-momab* a permis des avancées considérables en recherche fondamentale et clinique, et a suscité de grands espoirs thérapeutiques qui ont été cependant en vain car leur utilisation chez des patients s'est heurtée à des limites notamment, la production, d'Ac humains anti-souris (HAMA : Human Anti-Mouse Antibodies). Les Ac chimériques ont été développés dans les années 1980, en corrélation avec l'apparition de la PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase). Les Ac chimériques (70% humains) sont des Ac hybrides souris-homme constitués de domaines variables murins et de domaines constants humains et sont désignés par le suffixe *-ximab* (Figure 4). Ces nouveaux types d'Ac dits recombinants ont eu pour conséquence de réduire la réponse HAMA et d'augmenter la cytotoxicité en raison d'une interaction de meilleure affinité avec les récepteurs FcγR présents sur les cellules effectrices des

patients car le fragment Fc est humain (Baty, 2006). Ces Ac sont moins immunogènes, cependant certains patients développent encore une réponse contre ces Ac chimériques (Ac humains dirigés contre les Ac chimériques). La construction d'Ac monoclonaux humanisés a été alors nécessaire, et a consisté à substituer les zones hypervariables (appelées région déterminant la complémentarité avec l'Ag ou « CDR ») d'une IgG humaine par celles de l'Ac monoclonal de souris conférant à l'IgG humaine la spécificité de l'Ac murin parental. Ces Ac sont entre 85 et 90% humains, sont beaucoup moins immunogènes que les précédents, et sont désignés par le suffixe *-zumab* (Figure 5).

Dans les années 1990, pour obtenir des Ac totalement humains, deux approches ont été développées. La première est celle de la construction de banques combinatoires de régions VH et VL humaines, exprimées à la surface de phages (Bourel, 2006). Cette approche a été notamment rendue possible en utilisant des techniques de sélection *in vitro* comme le phage display. Après une sélection par phage display, les domaines VH-VL spécifiques contre l'antigène d'intérêt sont fusionnés aux régions constantes d'IgG humaines pour générer des anticorps humains complets. Une autre approche, visant à l'obtention d'AcM humains se fonde sur l'utilisation de souris transgéniques. Celle-ci a pu être développée grâce à l'apparition des techniques de transgénèse. Ces souris comportent dans leur génome une grande partie des gènes d'Ac humains (loci des gènes d'Ig de souris remplacés par les loci équivalents humains). Après immunisation avec l'Ag choisi, ces animaux sont capables de produire des Ac humanisés pour tout ou partie de leurs séquences, avec la possibilité de dériver aussi bien des Ac monoclonaux par la technique des hybridomes que des polyclonaux à partir du sérum des animaux (Pascal, 2009).

Ces AcM sont désignés par le suffixe *-mumab*.

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

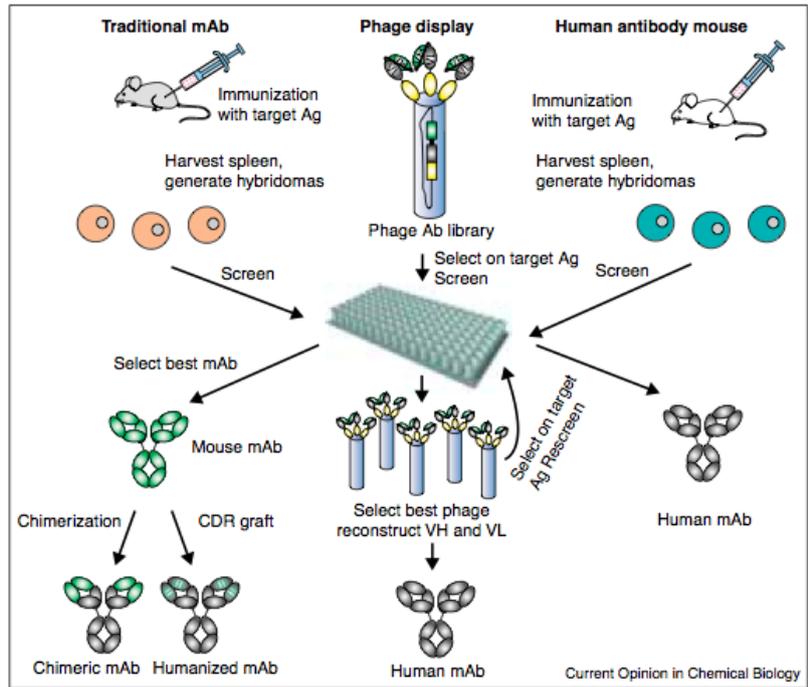


Figure 4 : Génération d'anticorps monoclonaux humains.

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

Des anticorps murins...

...aux anticorps humains

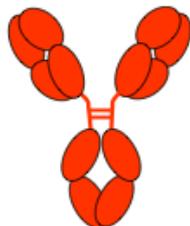
Fonctions effectrices imparfaites

Acm immunogènes (HAMA)

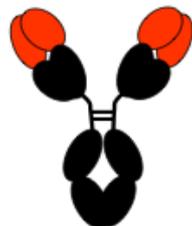
Acm plus actifs

Moins antigéniques

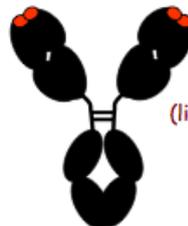
Demi-vie accrue



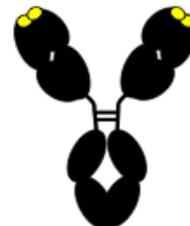
Acm murins (hybridomes) 1975 ...*(m)*omab



Acm chimériques (biotechnologie / souris chimériques humanisées) 1984 ...*ximab*



Acm humanisés (biotechnologie) 1988-1991 ...*zumab*



Acm intégralement humains (bibliothèques humaines phage display / souris humanisées) 1994-1999 ...*(m)*umab

Figure 5: Evolution de l'humanisation des anticorps monoclonaux (d'après Cogné, 2009)

D'une manière générale, les Ac monoclonaux peuvent être vus comme les « *magic bullets* » imaginées par l'immunologiste Paul Ehrlich au début du XXème siècle. Celui-ci avait évoqué la possibilité de molécules capables de viser directement, au sein d'un organisme, un certain type de bactérie ou de virus pour le détruire spécifiquement, en épargnant les autres éléments. Les Ac monoclonaux apparaissent ainsi intéressants pour la thérapie et l'imagerie ciblée des cancers, en raison de leur capacité de ciblage hautement spécifique. Ce sont donc, dans le cadre de la Médecine Nucléaire des candidats de choix à radiomarquer, afin d'avoir une vectorisation de radioéléments utilisés à des fins diagnostiques ou thérapeutiques.

Les Ac monoclonaux utilisés actuellement sont pour la plupart des IgG ou des variants de celles-ci. Nous allons vous décrire plus en détail ce premier isotype et ses variants. Ensuite, nous vous présenterons une autre classe d'Ig jusque là peu étudiée, les IgA.

B. L'immunoglobuline G

1. Structure

Toutes les IgG sont monomériques. Ce sont les plus petites Ig avec une masse moléculaire d'environ 150 kiloDaltons (kDa). Ces Ig sont peu glycosylées (3%). En microscopie électronique, elles apparaissent sous la forme d'un Y. Des différences de séquences en acides aminés des chaînes lourdes γ (80% d'homologie) permettent de définir quatre sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Ces sous-classes ont été nommées ainsi en fonction de la concentration sérique de chacune d'entre elles : IgG1>IgG2>IgG3>IgG4 (Schroeder, 2010). Les chaînes lourdes possèdent toutes, quelle que soit la sous-classe, de N vers C terminal : un domaine constant $C\gamma$, une région charnière et deux autres domaines constants $C\gamma 2$ et $C\gamma 3$.

2. Propriétés

a. Pharmacocinétique :

Les IgG constituent l'isotype le plus abondamment rencontré dans le sérum (85% des Ig) et ont une demi-vie sérique relativement longue (23 jours).

b. Fonctions physiologiques :

Les IgG sont produites en grande quantité dans les réponses secondaires.

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

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

3. *Utilisation des anticorps monoclonaux d'isotype G*

Les Ac monoclonaux représentent un des outils majeurs des biothérapies, dans divers domaines cliniques, particulièrement grâce à une ingénierie moléculaire remarquable. Les Ac monoclonaux d'isotype G, voire même IgG1, représentent la plupart des Ac trouvés dans des spécialités approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) et l'EMA (European Medicines Agency), notamment grâce à leurs caractéristiques fonctionnelles particulièrement intéressantes. Ils peuvent être utilisés en immunothérapie en particulier en thérapie anticancéreuse. En effet, ces Ac agissent par des mécanismes indirects en provoquant une cytotoxicité cellulaire ciblée par des mécanismes indirects (ADCC, CDC) entraînés par leur liaison à des domaines constants d'effecteur moléculaire ou cellulaire (Figure 6). Outre ces mécanismes d'action indirects, il existe les mécanismes dits directs médiés par les régions variables de l'Ac. Les Ac monoclonaux vont interagir avec des antigènes associés aux tumeurs (TAA). Ces TAA spécifiques des tumeurs humaines ont été mis en évidence depuis les années 1980, ils apparaissent lorsque les cellules tumorales subissent de nombreuses altérations génétiques et épigénétiques aboutissant à une modification de leur profil d'expression génique (Pardoll, 2003). Les plus communs de ces TAA sont les récepteurs de facteurs de croissance surexprimés à la surface des cellules tumorales. Sans traitement, leur activation entraîne une croissance tumorale, une augmentation de la survie tumorale, et l'apparition d'une résistance aux anticancéreux. Les Ac monoclonaux en se fixant sur ces récepteurs peuvent bloquer leur signalisation et inhiber le développement cellulaire, induire une apoptose et diminuer la production de facteur de croissance. Une nouvelle approche pour optimiser l'action de ces Ac monoclonaux est de les coupler à des molécules telles que des agents anti-cancéreux, des toxines, des enzymes ou encore des radioéléments.

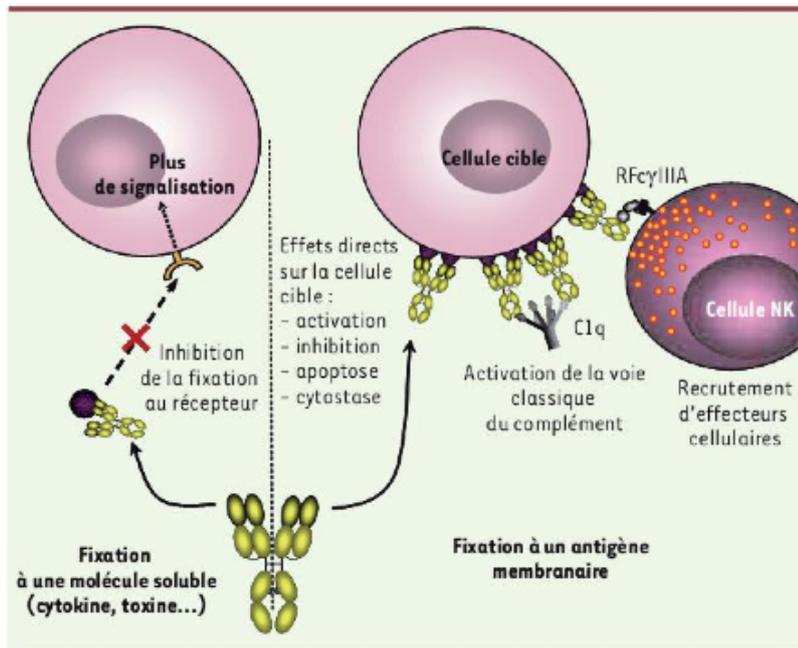


Figure 6 : Mécanisme d'action des principaux anticorps.

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

Depuis 1986, année où le premier Ac monoclonal, le muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®) a été mis sur le marché, le monde des Ac monoclonaux a beaucoup évolué (Table 1). En effet en 2009, 22 Ac monoclonaux avaient été approuvés par la FDA aux Etats-Unis et plus de 200 étaient évalués dans des essais cliniques (Teillaud, 2009). En 2010, la proportion d'Ac thérapeutiques représentait 50% dans le marché des biomédicaments, soit plus de 50 millions de Dollars, soit 6% du marché des spécialités pharmaceutiques. 90% des ventes sont représentées par six Ac monoclonaux : etanercept, bevacizumab, adalimumab, rituximab, trastuzumab.

DCI	Spécialité pharmaceutique	Type	Antigène	Pathologie	Autorisation
ANTICORPS MURINS					
Muromonab	Orthoclone OKT3®	Murin IgG2a	CD3	Prévention des rejets aigus d'allogreffe	AMM
Ibritumomab	⁹⁰ Y Zevalin®	Murin, IgG1	CD20	Lymphome non Hodgkinien à cellule B CD20 positive	AMM
Tositumomab	¹³¹ I Bexxar®	Murin, IgG2a	CD20	Lymphome non Hodgkinien à cellule B CD20 positive	AMM aux Etats Unis seulement
ANTICORPS CHIMÉRIQUES					
Abciximab	ReoPro®	Chimérique, IgG1	GPIIb/IIIa r	Intervention coronarienne percutanée, angor instable	AMM
Rituximab	Mabthera®	Chimérique, IgG1	CD20	Lymphome non Hodgkinien à cellule B CD20 positive	AMM
Basiliximab	Simulect®	Chimérique, IgG1	CD25	Prévention des rejets aigus d'allogreffe	AMM
Infliximab	Remicade®	Chimérique, IgG1	TNF α	Maladie de Crohn et polyarthrite rhumatoïde	AMM
Cetuximab	Erbix®	Chimérique, IgG1	EGFR	Cancer colorectal métastatique, carcinome épidermoïde de la tête et du cou	AMM
Brentuximab	Adcetris®	Chimérique IgG1	CD30	Lymphome de Hodgkin en rechute	ATU
ANTICORPS HUMANISÉS					
Daclizumab	Zenapax®	Humanisé, IgG1	CD25 (II2r)	Prévention des rejets aigus d'allogreffe	Retiré en 2009
Palivizumab	Synagis®	Humanisé, IgG1	Protéine F	Prévention des infections respiratoires dues au Virus Respiratoire Syncytial	AMM
Trastuzumab	Herceptin®	Humanisé, IgG1	HER2/Neu	Cancer du sein précoce et métastatique HER2 positif	AMM
Gemtuzumab	Mylotarg®	Humanisé, IgG4	CD33	Leucémie myéloïde aigue CD33 positive	ATU
Alemtuzumab	Mabcampath®	Humanisé, IgG1	CD52	Leucémie lymphoïde chronique à cellules B	AMM
Bevacizumab	Avastin®	Humanisé, IgG1	VEGF ou Vascular	Cancer colorectal métastatique, du	AMM

			endothelial growth factor	sein métastatique, bronchique non à petites cellules, du rein avancé ou métastatique, de l'ovaire avancé	
Omalizumab	Xolair®	Humanisé, IgG1	IgE	Traitement de l'asthme	AMM
Efalizumab	Raptiva®	Humanisé, IgG1	CD11a	Psoriasis en plaque	Abrogée en 2009
Natalizumab	Tysabri®	Humanisé, IgG4	Integrine- α 4	Sclérose en plaque formes sévères	AMM
Ranibizumab	Lucentis®	Humanisé, IgG1	VEGF-A	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	AMM
Eculizumab	Soliris®	Humanisé, IgG2/4	C5	Hémoglobinurie paroxystique nocturne	AMM
Certolizumab	Cimzia®	Humanisé, IgG1	TNF α	Polyarthrite rhumatoïde	AMM
Tocilizumab	Roactemra®	Humanisé, IgG1	IL6	Polyarthrite rhumatoïde	AMM
ANTICORPS HUMAINS					
Adalimumab	Humira®	Humain, IgG1	TNF α	Maladie de Crohn et polyarthrite rhumatoïde	AMM
Panitumumab	Vectibix®	Humain, IgG2	EGFR	Cancer colorectal métastatique	AMM
Ofatumumab	Arzerra®	Humain, IgG1	CD20	Leucémie lymphoïde chronique	AMM
Dénosumab	Prolia®	Humain, IgG2	RANKL	Ostéoporose post-ménopausique	AMM
Ustékinumab	Stelara®	Humain, IgG1	IL2, IL3	Psoriasis en plaque	AMM
Ipilimumab	Yervoy®	Humain, IgG1	CTLA-4	Mélanome avancé non résecable ou métastatique	AMM
IMMUNOADHÉSINES (ou protéines de fusion)					
Abatacept	Orencia®	CTLA-4Fc	CD80-CD86	Polyarthrite rhumatoïde	AMM
Belatacept	Nulojix®	CTLA-4Fc	CD80-CD86	Prévention du rejet du greffon (rein)	AMM
Etanercept	Enbrel®	huFc γ 1 / TNFr	TNF α et β	Maladie auto-immune comme spondylarthrite ankylosante	AMM

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

DCI : Dénomination Commune Internationale

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

IL : Interleukine

TNF : Facteur de Nécrose Tumorale

CD : Cluster de Différenciation

Certains Ac monoclonaux sont couplés à un radioisotope à visée thérapeutique comme le Zevalin® et le Bexxar®, d'autres sont couplés à un agent cytotoxique (auristatine) comme l'Adcetris®.

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

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

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

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

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

- La difficulté de trouver un antigène tumoral d'intérêt : la plupart des antigènes tumoraux ont une spécificité imparfaite, sont exprimés de manière hétérogène par les tumeurs, peuvent avoir une localisation intracellulaire, et être libérés (Ag circulants) ou être internalisés (dégradation).

- L'affinité entre le fragment Fc des Ac monoclonaux et ses récepteurs peut être modifiée :
 - 80% de la population exprime un variant de ce récepteur de basse affinité.
 - Les IgG1 sont des molécules glycosylées sur le domaine CH2 de la région Fc. Cette glycosylation peut être modifiée, elle est extrêmement importante et permet une modulation de l'affinité du fragment Fc pour le récepteur FcγRIIIa. Ainsi, elle peut provoquer une modification de l'efficacité de l'Ac. La nature des sucres est dépendante des enzymes exprimées par les lignées cellulaires qui permettent de produire les Ac monoclonaux.
 - Les Ac monoclonaux entrent en compétition avec les IgG du patient qui sont présentes en concentration sérique importante. Pas plus de 20% de la dose administrée en Ac monoclonaux agit réellement sur la tumeur (Beckman, 2007).
 - Les Ac monoclonaux peuvent présenter une affinité pour des récepteurs type FcγRIIb présents sur les macrophages, les cellules dendritiques, et les polynucléaires neutrophiles entraînant des réactions d'inhibition sur le système immunitaire (Chames, 2009).
- De faibles capacités de diffusion dans les tissus limitent l'accessibilité aux tumeurs solides de taille importante (due notamment à leur haut poids moléculaire).
- Le développement de réactions inhibitrices type HAMA vis-à-vis de ces Ac par les patients.
- Enfin, leur utilisation en tant que sonde en imagerie a été réduite en raison de leur longue demi-vie sérique.

Ces limitations encouragent aujourd'hui au développement de nouvelles formes d'Ac capables de relever ces nouveaux défis. Les variants d'Ac qui diffèrent dans les sites de liaison d'antigène et la taille ont été générés. Ils représentent une des différentes solutions qui ont été proposées.

C. Les variants d'anticorps

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

1. Les fragments d'anticorps (Figures 7 et 8):

a. Les fragments scFv

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

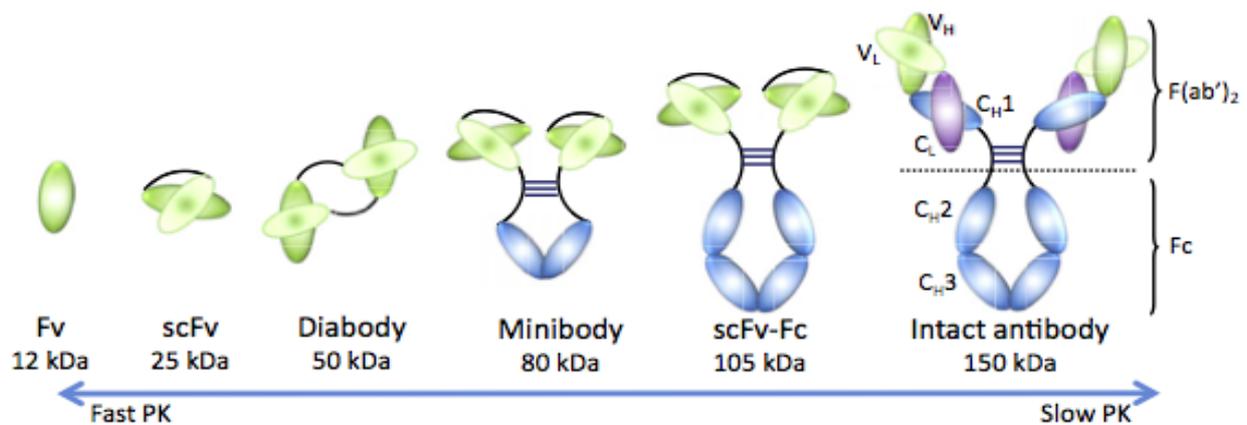


Figure 7 : Représentation schématique d'un Ac conventionnel (Intact antibody), et de fragments d'Ac

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

b. Les fragments multivalents scFvs (diabodies et triabodies)

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

c. Les Minibodies

Les fragments précédents de petits poids moléculaires ayant une clairance très importante, des molécules de poids moléculaire intermédiaire (80 kDa) appelées « minibodies » ont été conçues. Ils sont composés de fragments scFvs (un domaine variable de chaîne lourde et un domaine variable de chaîne légère) bivalents fusionnés au domaine CH3 d'une IgG1 humaine. La fusion est obtenue soit grâce à un « linker » de 2 acides aminés, on parle de LD minibody, qui forme un dimère non covalent, soit grâce à la région charnière de l'IgG1 associée à un peptide de liaison souple, on parle alors de FLEX minibody qui forme un dimère covalent. Ce sont des composés

stables notamment en raison de la forte interaction entre les scFvs et le domaine CH3. Hu et son équipe ont développé des « minibodies » LD et FLEX anti-ACE, qu'ils ont marqué à l'iode 123. En raison de leur temps de séjour plus long dans le sang, l'accumulation au niveau de la tumeur est plus élevée avec ces fragments, et les études d'imagerie ont montré des images de bonne qualité. Ils ont observé que la clairance des « minibodies » LD était plus rapide que celle des « minibodies » FLEX qui se trouve être intermédiaire entre celle des Ac entiers et celle des fragments. Ils ont montré qu'ils permettaient d'obtenir une fixation tumorale importante, celle des « minibodies » FLEX étant supérieure (33% ID/g pour les « minibodies » FLEX versus 17% pour les « minibodies » LD) (Hu, 1996).

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

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

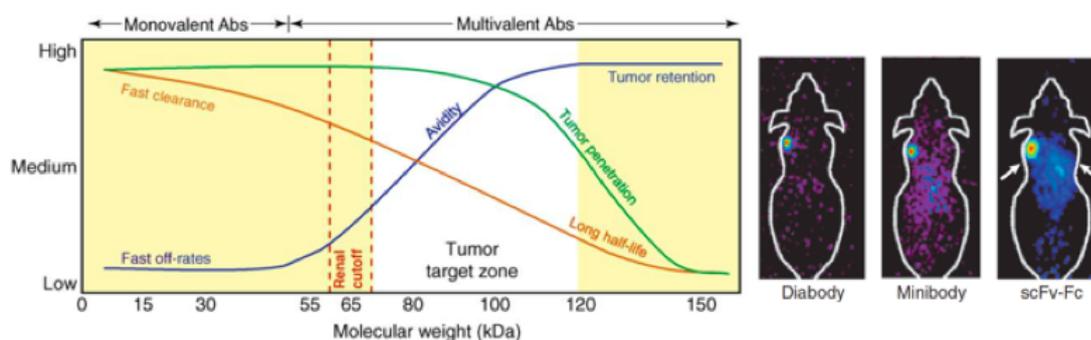


Figure 8 : Optimisation de la biodistribution intratumorale des anticorps.

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

2. *Les anticorps bispécifiques*

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

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

3. *Les nanobodies et intrabodies*

Les nanobodies sont des fragments dits de troisième génération. Ces fragments étant de petite taille sont capables de cibler des Ag cryptiques, inaccessibles aux Ac entiers comme les enzymes ou certaines protéines virales. Lorsque ces nanobodies possèdent une bonne solubilité, on parle d'intrabodies car il serait possible de cibler des Ag pathologiques intracellulaires et de neutraliser ces cibles dans des compartiments comme le cytosol, le noyau, les mitochondries (Weisser, 2009).

D. L'immunoglobuline A

1. Caractéristiques structurales des IgA

a. Généralités

L'immunoglobuline de classe A est découverte, à la fin des années 50, par les équipes de Gugler et d'Heremans (Gugler, 1958), lors de l'isolement dans des échantillons de lait et de sérum humain d'une protéine de type β -globuline en électrophorèse possédant une glycosylation importante (Heremans, 1959). Chez l'homme, l'IgA est l'Ac le plus abondamment synthétisé dans l'organisme : production approximative de 3 à 5 g par jour.

Il existe deux sous-classes d'IgA, IgA1 et IgA2 avec deux types de chaînes lourdes α 1 et α 2 (Figure 9). L'IgA2 existe sous deux formes dites allotypiques A2m (1) et A2m (2).

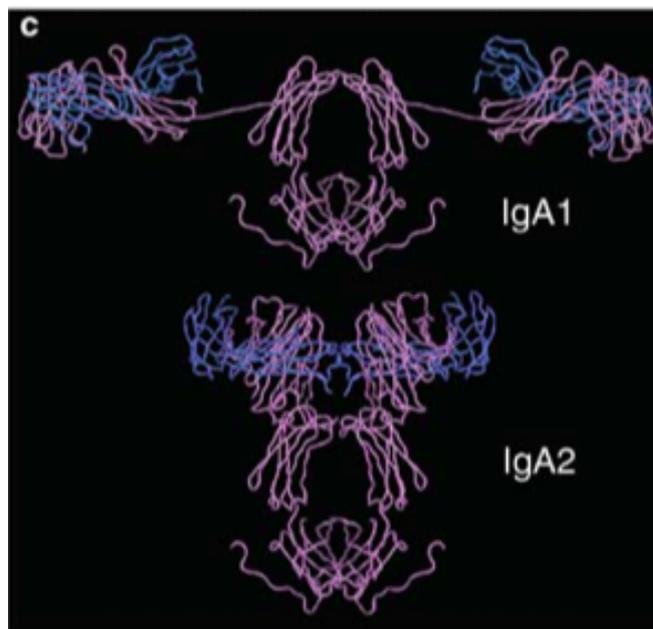


Figure 9 : Modèle moléculaire des IgA1 et des IgA2m(1) humaines.

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

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

Les IgA représentent aussi la classe d'Ig prédominante dans les sécrétions muqueuses. Ici, la proportion d'IgA2 est beaucoup plus importante. Elles sont essentiellement sous forme dimérique associée à une autre protéine, le composant sécrétoire, pour constituer l'IgA

sécrétoire. L'IgA sécrétoire est l'Ig principale des sécrétions nasales, bronchiques, gastro-intestinales et urogénitales, de la salive et du lait, elle semble ainsi être l'Ig dominante dans l'immunité humorale des muqueuses.

Les IgA sont rencontrées sous trois formes que nous allons maintenant détailler (Figure 10).

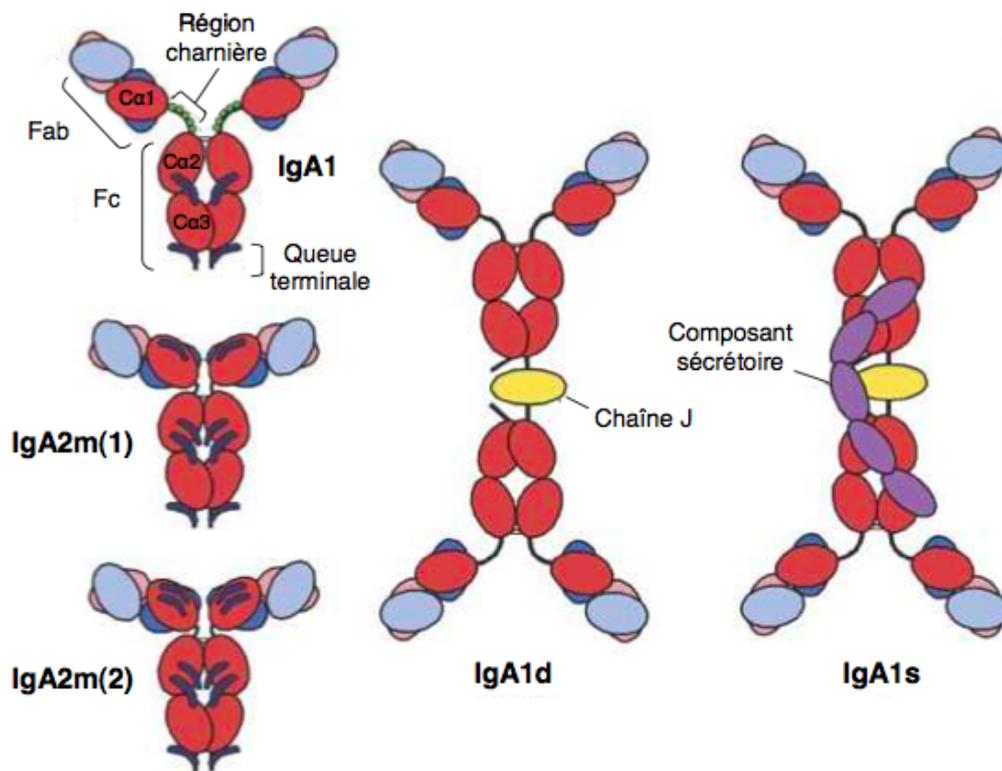


Figure 10 : Représentation schématique des différentes formes monomériques, dimériques (IgA1d) et sécrétoires (IgA1s) d'IgA humaine.

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

b. Structure des IgA

i. IgA monomérique (IgAm)

Les IgA sous forme monomérique ont un poids moléculaire de 160 kDa et une constante de sédimentation de 7S (Svedberg). Comme pour les autres Ig, les IgAm sont constituées de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères identiques entre elles, disposées en deux régions Fab et une région Fc, séparées par une région charnière. Chez l'homme, comme précisé dans les généralités, deux sous-classes d'IgA existent qui diffèrent notamment par le nombre d'acides aminés qui constituent la région charnière : 26 pour IgA1 (région très riche en proline) et 13

pour IgA2. Les chaînes lourdes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ possèdent trois domaines constants et un domaine variable. Les chaînes lourdes et légères des IgA1 sont reliées par des ponts disulfures. Les ponts disulfures permettent de distinguer deux variants allotypiques d'IgA2 : en effet, le variant A2m(1) ne possède pas de pont disulfure, l'association entre les chaînes lourdes et les chaînes légères est assurée par des liaisons non covalentes (Woof, 2006). Les IgAm représentent la forme majoritaire dans le sérum produite par la moelle osseuse (Kerr, 1990). En comparaison aux IgG, les IgA présentent un fort niveau de glycosylation, qui est d'ailleurs une limite à leur production.

ii. IgA dimérique (IgAd)

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

iii. IgA sécrétoire (IgAs)

Les IgAd peuvent être sécrétées vers la lumière des organes, en se liant spécifiquement au récepteur d'Ig polymériques (pIgR), exprimé au pôle basal des cellules épithéliales des muqueuses (Figure 11). Le complexe pIgR/IgAd traverse la cellule par endocytose et est sécrété au pôle apical dans la lumière de l'organe par exocytose. Cette libération s'accompagne du clivage protéolytique du récepteur. La partie extracellulaire du récepteur est clivée et reste associée à l'IgA relarguée et prend le nom de pièce sécrétoire. Ce peptide supplémentaire et l'IgAd forme l'IgA sécrétoire (IgAs) (Mostov, 1994).

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

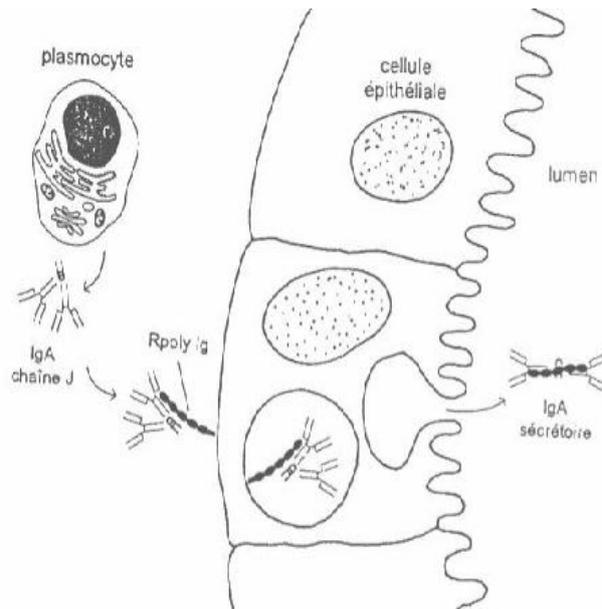


Figure 11 : Synthèse des IgA sécrétoires

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

2. Production des IgA

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

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

b. Technologie HAMIGA

L'une des méthodes exploitées pour la production des Ac humanisés est la production par des lymphocytes B provenant de souris génétiquement modifiées, dans le génome desquelles, ont été intégrés des gènes codants pour des parties constantes des Ac humains. Cependant, même si les IgA s'avèrent être les Ac les plus produits chez l'homme et la deuxième classe d'Ac dans le sang en quantité, les lymphocytes B les sécrétant sont peu nombreux. Il est ainsi difficile d'isoler

un lymphocyte B sécrétant une IgA et, à plus forte raison, un lymphocyte sécrétant une IgA spécifique d'une cible donnée. Ce verrou technologique, concernant l'isolement, la caractérisation, les propriétés et la production des IgA (Woof, 2005) est ainsi la raison pour laquelle les IgA ont largement été délaissées au profit d'autres classes d'Ig notamment les IgG. C'est pour lever ce verrou technologique que le modèle de souris HAMIGA (Humanised Antibody Made Up Of Monoclonal Immunoglobulin A) a été développé et fait l'objet d'un Brevet (Cogné, 2005). Cette souris permet la production de lymphocytes B sécrétant uniquement des Ac monoclonaux IgA chimériques humains.

Les IgA spécifiques sont obtenus selon les étapes suivantes :

- Immunisation des souris HAMIGA
- Détection des IgA spécifiques
- Immortalisation des cellules B
- Sélection, entretien et suivi des hybridomes
- Purification par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) et titrage des IgA

3. Propriétés

a. Récepteurs aux IgA (Table 3)

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

i. Récepteurs des immunoglobulines polymériques (pIgR)

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

- un signal de sensibilisation initiée par la liaison des IgAd à la surface basolatérale des cellules de la muqueuse. La transcytose peut se produire en l'absence d'IgA, cependant la

liaison des IgAd au pIgR a pour effet de stimuler ce phénomène.

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

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

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

ii. Récepteur Fc α RI (CD89)

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

Fc α RI ou CD89 est un médiateur clé de la fonction effectrice Fc des IgA. Il est capable de lier aussi bien l'IgA1 que l'IgA2. De façon surprenante, ce récepteur est retrouvé comme étant un récepteur de basse affinité pour les monomères d'IgA alors qu'il paraît être un récepteur de haute affinité pour les formes polymériques et les IgA avec un complexe immunitaire (Monteiro, 2010). En effet, des molécules d'IgA (en clusters) fixés à la surface d'agents pathogènes peuvent déclencher des processus d'élimination par leur fragment Fc en se liant au récepteur Fc α RI présent sur les neutrophiles, monocytes, éosinophiles, les cellules dendritiques et quelques macrophages. Ces mécanismes comprennent la phagocytose, la libération de cytokines et

d'espèces oxygénées activées, et la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (Woof, 2011).

iii. Les autres récepteurs d'IgA

- Le récepteur Fc/ μ R

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

- Le récepteur de la transferrine (TfR)

Le TfR appelé aussi CD71 est un homodimère de 180 kDa. Il est maintenant connu pour se lier aux IgA1, mais pas aux IgA2. Le CD71 se lie préférentiellement aux IgA1 polymériques plutôt qu'aux monomères d'IgA1, cependant l'interaction provoquée avec l'IgA1 est beaucoup moindre qu'avec la transferrine. En dépit de son expression difficilement détectable, le CD71 est trouvé sur des cellules hématopoïétiques dans le foie foetal et la moelle osseuse et sur certaines lignées de cellules lymphocytaires et myéloïdes. Cependant, le CD71 est présent sur les cellules mésangiales, avec une forte expression chez les patients présentant une néphropathie à IgA ce qui suggère que ce récepteur pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de la néphropathie à IgA notamment son implication dans les dépôts d'IgA au niveau des reins. Le CD71 a également été identifié sur les cellules dendritiques de type interstitiel, où il a été montré qu'il pouvait médier l'internalisation des complexes IgA (Woof, 2005).

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

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

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

Table 3 : Les différents récepteurs des IgA

b. Fonctions effectrices de l'IgA (Figure 12)

i. Mécanismes effecteurs directs médiés par l'IgA

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

Ces Ac muqueux inhibent efficacement l'adhésion de micro-organismes pathogènes à la surface des muqueuses. En effet, les IgAs recouvrent les micro-organismes d'une charge négative et hydrophile qui va avoir pour objectif de repousser leur attachement et provoquent une

agglutination des bactéries qui facilite leur élimination. Cette agglutination est médiée par des glycanes. Les IgAs et IgA polymériques peuvent interagir avec les virus, les enzymes et les toxines et neutraliser leurs activités biologiques. L'activité de neutralisation est associée à la partie Fab des molécules d'Ac.

ii. Mécanismes effecteurs indirects de l'IgA

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

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

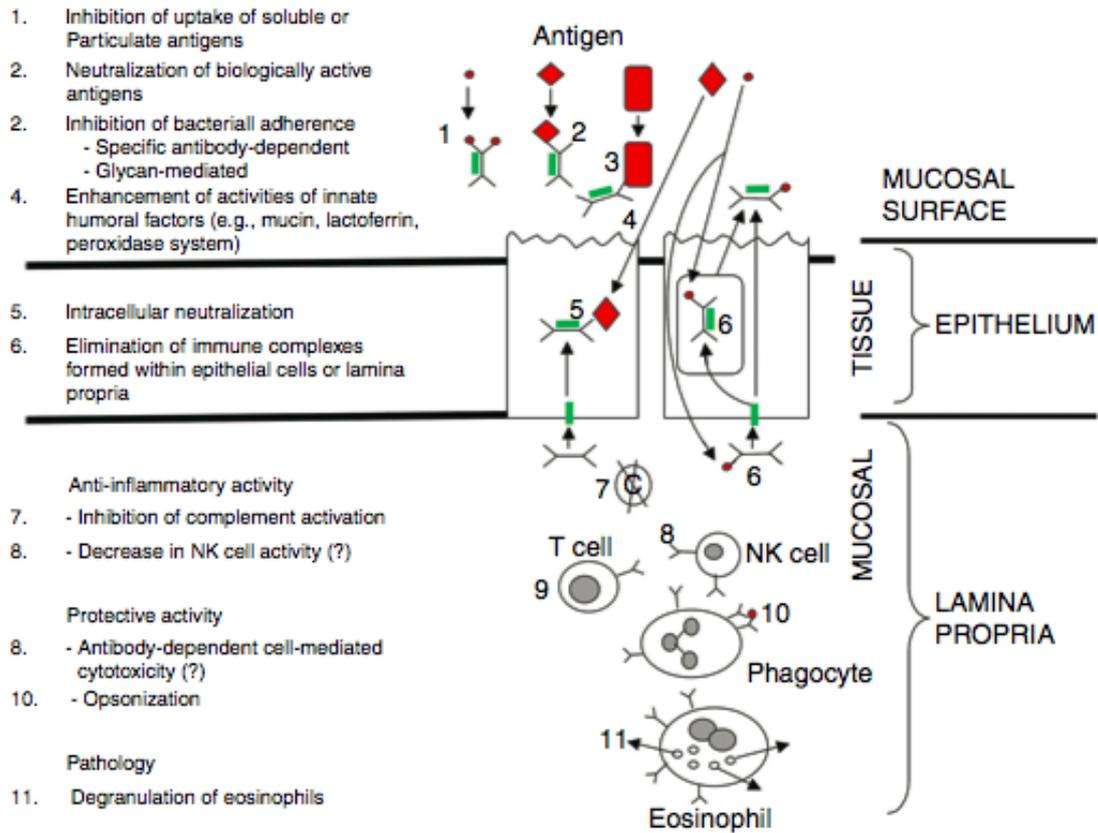


Figure 12 : Rôle des IgA dans la protection des muqueuses. (D'après Woof, 2005)

Les IgA peuvent au niveau de la surface des muqueuses :

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

Les IgA peuvent au niveau de l'épithélium :

5. Impliquer une neutralisation intracellulaire
6. Eliminer des complexes immuns formés dans les cellules épithéliales ou dans la lamina propria

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

4. Apports potentiels

Les connaissances sur les IgA sont plus restreintes que sur les IgG. Aucun anticorps monoclonal de classe IgA n'est en développement pour une application clinique. Ce contraste avec la situation des IgG, résulte certainement de divers verrous technologiques concernant les IgA aussi bien dans leur isolement, caractérisation, propriétés que dans leur production en

particulier sur les formes dimériques et sécrétoires. La technologie HAMIGA a permis de lever ces verrous et ainsi de produire les différentes formes d'IgA.

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

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

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

II. Les cibles

Nous avons choisi d'étudier les antigènes CD20 et ACE ciblant les deux cancers suivants :

- les lymphomes car l'IgG anti-CD20 est déjà très appliquée en Immunothérapie et en RIT et a fait preuve de son efficacité.
- les cancers colorectaux car les IgA ont un tropisme préférentiel pour les muqueuses.

A. Les Lymphomes non Hodgkiniens

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

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

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

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

1. Epidémiologie

Le LNH est la plus fréquente des hémopathies, il recouvre plus de 25 types histologiques. Ces derniers peuvent être divisés en formes agressives (65% des cas) et formes indolentes. Il est en constante augmentation depuis plusieurs années, son taux d'incidence ayant doublé entre 1975 et 1995. Plus répandu chez l'homme que chez la femme, son taux d'incidence est de 13,7 cas pour 100 000 habitants. Environ 10 800 nouveaux cas de LNH auraient été diagnostiqués, en 2010, en France. Ils occupent le 7^e rang des cancers les plus fréquents chez l'homme et le 6^e rang chez la femme, et représentent 3% de l'ensemble des cancers. L'âge médian de survenue d'un LNH est de 60 ans (64 ans chez l'homme, 70 ans chez la femme). L'augmentation d'incidence porte actuellement sur les lymphomes de haut grade de l'adulte jeune. Il varie selon les types histologiques, certains pouvant présenter des pics d'incidence chez l'adulte jeune ou l'enfant (lymphome de Burkitt par exemple).

Le pronostic global est très variable selon les formes histologiques. Par exemple, pour les deux formes histologiques les plus fréquentes, la survie relative à 5 ans se situe aux alentours de 50%

pour les lymphomes diffus à grandes cellules B et de 76% pour les lymphomes folliculaires (HAS, 2012).

2. *Histoire naturelle de la maladie*

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

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

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

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

Table 5: Lymphomes Non Hodgkiniens de l'adulte.

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

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

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

Table 6 : Classification cytologique des Lymphomes Non Hodgkiniens.

3. Diagnostic

a. Circonstances de découverte

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

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

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

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

b. Démarche diagnostique

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

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

- Biologie :

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

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

- Confirmation du diagnostic : examen anatomopathologique

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

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

4. *Prise en charge thérapeutique*

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

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

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

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

également été radiomarqués avec un émetteur β^+ , l'iode 124, à des fins d'utilisation en imagerie TEP (Chopra, 2004).

5. Antigène CD20

L'antigène CD20 est une protéine transmembranaire identifiée au début des années 1980 comme un marqueur des lymphocytes B (Stashenko, 1980). Le CD20 est une phosphoprotéine non glycosylée, hydrophobe de 35 kDa, composée de quatre domaines membranaires, deux domaines N et C-terminaux intracytoplasmiques et d'une double boucle extracellulaire dont la structure tridimensionnelle est stabilisée par un pont disulfure (Ernst, 2005). L'expression de cette molécule dépourvue de ligand dépend du stade de maturation du lymphocyte B. Il n'est pas exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques et sur les précurseurs les plus précoces de la lignée B alors que le stade pré-B et le lymphocyte B mature, en sont richement pourvus. Les plasmocytes, quant à eux se délestent du CD20 puisqu'il ne reste que 20% des plasmablastes à IgM qui l'expriment (Renaudineau, 2009). Bien que le rôle du CD20 ne soit pas encore clairement établi, il est considéré que son rôle principal est celui d'un régulateur des flux de calcium. Il intervient dans la transduction d'un signal au cours de l'activation et de la différenciation du lymphocyte B (Bosly, 2006). En réponse à la liaison d'un Ac, le CD20 devient phosphorylé, il subirait une lente modulation ou une internalisation, ce mode d'activation en fait alors une cible idéale pour les thérapies par Ac monoclonal (Kraeber-Bodéré, 2011).

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

B. Le Cancer colorectal

1. Épidémiologie

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

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

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

2. Description

60 à 80% des cancers colorectaux se développent à partir d'un adénome, généralement sous la forme d'un polype ou plus rarement sous une forme plane, plus difficile à détecter. Le risque de transformation d'un adénome en cancer varie en fonction de la taille, de l'importance de la composante villositaire au sein de l'adénome et du degré de dysplasie (Figure 13). La transformation se fait sur quelques mois à plusieurs années.

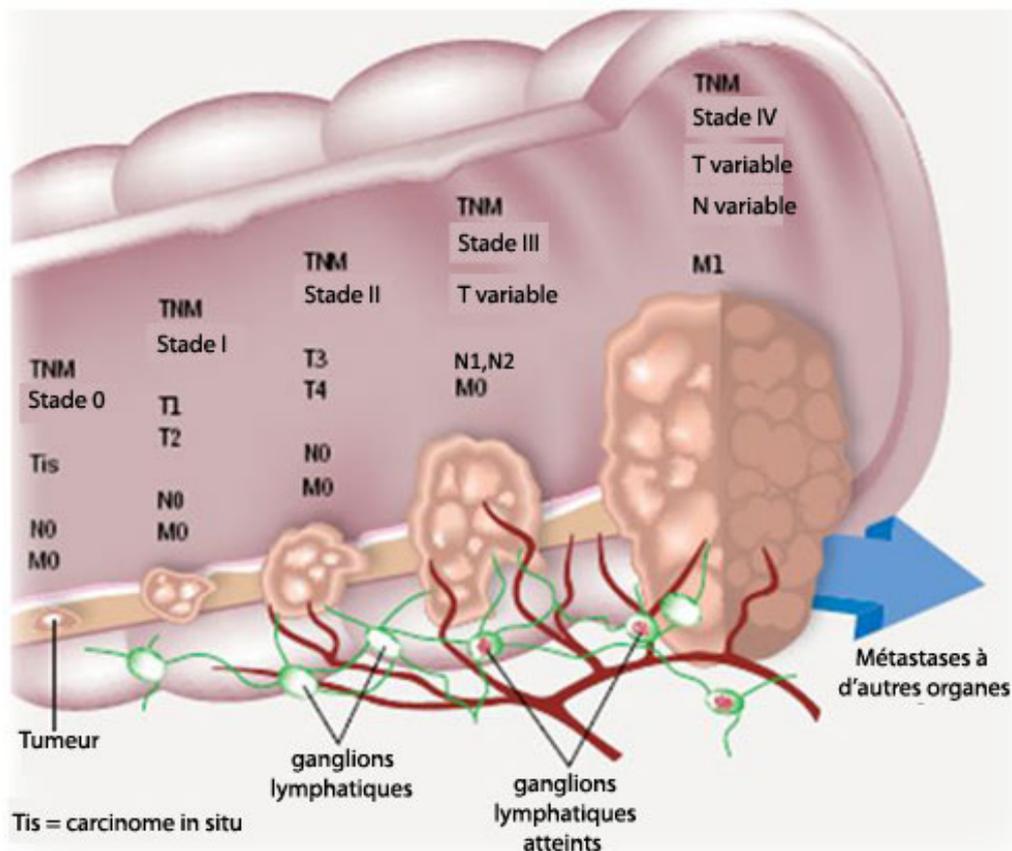


Figure 13 : Les divers stades du cancer colorectal (D'après L'association canadienne du Cancer Colorectal)

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

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

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

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

Stade III : Le cancer a atteint les ganglions lymphatiques.

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

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

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

Des facteurs de risque d'apparition de cette pathologie ont été clairement identifiés comme l'alimentation et l'exercice physique insuffisant, le tabagisme, un antécédent de cancer, les

maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique), l'âge.

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

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

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

3. *Diagnostic*

a. Circonstances de découverte

Les signes cliniques devant évoquer un cancer colorectal sont :

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

b. Démarche diagnostique

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

qu'après discussion pluridisciplinaire.

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

4. *Prise en charge thérapeutique*

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

En situation adjuvante (stade III) les protocoles proposés peuvent être le FOLFOX associant 5-FluoroUracile (5FU) et oxaliplatine ou le XELOX associant 5FU et capécitabine. En situation métastatique, les protocoles de chimiothérapie proposés en 1^{ère} ligne pourront être le FOLFOX ou le XELOX ou encore du raltitrexed. Le protocole proposé en 2^{ème} ligne sera par exemple le FOLFIRI associant 5FU et irinotécan. L'arsenal thérapeutique dans la prise en charge par chimiothérapie du cancer colorectal métastatique s'est enrichi en 2004 du cétuximab Erbitux®, Ac monoclonal chimérique de type IgG1, ciblant le domaine extracellulaire de l'EGFR (Epidermal Growth Factor), puis en 2005 du bevacizumab Avastin®, Ac monoclonal humanisé de type IgG1, se fixant spécifiquement au VEGF circulant (Vascular Endothelial Factor) et en 2007 du panitumumab Vectibix®, Ac recombinant entièrement humanisé de type IgG2 ciblant l'EGFR. L'Erbitux® et le Vectibix® sont réservés aux patients présentant des cancers colorectaux métastatiques, en association à une chimiothérapie ou en monothérapie dans les cancers résistants à la chimiothérapie. L'Avastin® est quand à lui toujours indiqué dans les traitements des cancers colorectaux métastatiques en association à une chimiothérapie. L'Erbitux® ainsi que le Vectibix® doivent être administrés chez des patients ne présentant pas de mutation K-RAS (protéine servant à la transmission du signal cellulaire) qui empêche leur action (CNHIM, 2008). Deux constatations concernant les thérapies ciblées de ce cancer, peuvent être faites. Aujourd'hui, la prise en charge des cancers colorectaux est dépourvue d'Ac ciblant l'ACE, malgré l'expression de cet antigène dans les cancers colorectaux. Ensuite les Ac utilisés sont tous de classe IgG, aucun de classe IgA qui présente un tropisme muqueux, n'est en développement. Ces possibilités d'amélioration de l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques sont à prendre en considération et donc à étudier.

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

Table 7 : Prise en charge thérapeutique des cancers colorectaux (Chimiothérapie adjuvante : 5FU, oxaliplatine, capécitabine)

5. Antigène ACE

L'Antigène CarcinoEmbryonnaire est une glycoprotéine de poids moléculaire 180-200 kDa comportant 60% de glucides qui a été isolée par Gold et Freedman en 1965 (Gold et Freedman, 1965). Il appartient à la superfamille des immunoglobulines et comporte sept domaines extracellulaires.

L'antigène ACE est un Ag oncofoetal présent dans l'intestin, le foie, le pancréas d'embryons ou de fœtus humains au cours des deux premiers mois de grossesse (Benchimol, 1989). A la naissance, sa synthèse s'effondre et il est donc quasiment absent des tissus sains adultes. Il peut être présent à des taux très faibles dans la muqueuse du côlon et dans les glandes mammaires, et être

déTECTABLE dans le sérum de sujets sains en particulier chez les fumeurs. Il est au contraire, retrouvé dans la plupart des adénocarcinomes tels ceux du tube digestif, du sein, du poumon et dans le sérum des patients développant ces cancers (Mohamed, 2010).

Ainsi il s'agit d'un des marqueurs tumoraux les plus anciens et l'un des plus répandus en étant certainement le plus fréquemment utilisé sous forme protéique comme marqueur dans les cancers gastro-intestinaux, en particulier dans le cancer colorectal (Goldstein, 2005) et dans d'autres cancers comme celui du sein, et du poumon. Ce marqueur est utilisé dans le diagnostic mais aussi dans le suivi des cancers colorectaux.

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

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

Des modifications dans l'adhérence cellulaire étant impliquées dans le développement de métastases, il a été montré *in vitro* que l'ACE peut jouer un rôle dans les processus de dissémination et d'invasion (Duffy, 2001).

III. Stratégie de radiomarquage des anticorps

A. Rappels de radioactivité

1. Définition et unités de mesure

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

a. Constante radioactive λ et décroissance radioactive

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

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

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

λ s'exprime en s^{-1} .

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

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

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

N_0 = nombre d'atomes radioactifs à t_0

Δt = temps écoulé entre t et t_0

b. Période physique

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

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

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

c. L'activité

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

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

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

A_0 = activité de la source à t_0

Δt = temps écoulé entre t et t_0

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

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

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

d. Le transfert linéique d'énergie

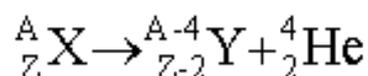
Le transfert linéique d'énergie ou TEL est la quantité d'énergie en keV (kiloélectronvolt) transférée par une particule ionisante traversant la matière par unité de distance (en μm). Il varie en fonction de la nature et de l'énergie du rayonnement ionisant. Il est utilisé pour quantifier l'effet du rayonnement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

2. Rayonnements

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

a. Emetteurs α

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



Ce rayonnement est très ionisant. Son énergie délivrée est importante (5 à 10 MeV), sur une très courte distance (Table 8). Par contre, il est peu pénétrant, il est absorbé par de faibles épaisseurs de matière (Figure 14); par exemple son parcours dans les tissus mous est de l'ordre de 0,03 mm.

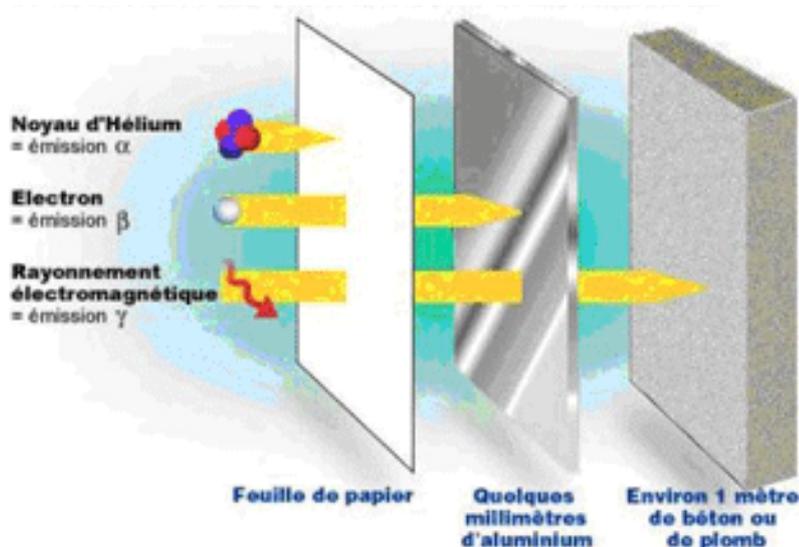


Figure 14 : Pouvoir de pénétration des différents rayonnements ionisants.

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

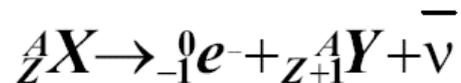
Rayonnement	Parcours		TEL
	Air	Eau et tissus	
α	5 à 10 cm	Quelques μm	+++
β	1 m	1 mm	++
γ	100 m à 1 km	10 cm	+

Table 8 : Parcours et TEL des différents rayonnements ionisants.

b. Emetteurs β

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

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



Les émetteurs β^- ont un TEL (Table 8) plus faible que les émetteurs α et ont un pouvoir pénétrant plus important (Figure 14), allant de quelques micromètres à une dizaine de millimètres. Ils sont utilisés en radiothérapie interne métabolique.

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



Les émetteurs β^+ sont utilisés en imagerie TEP. Les positons qui sont émis vont après avoir perdu leur énergie dans la matière interagir avec des électrons du milieu, et s'annihiler en émettant deux photons γ de 511keV. Ces photons émis de façon antiparallèle sont détectables par des capteurs placés en couronne, le signal est pris en compte uniquement s'il y a une détection simultanée sur les scintillateurs opposés (Figure 15). La désintégration β^+ est en compétition avec la capture électronique

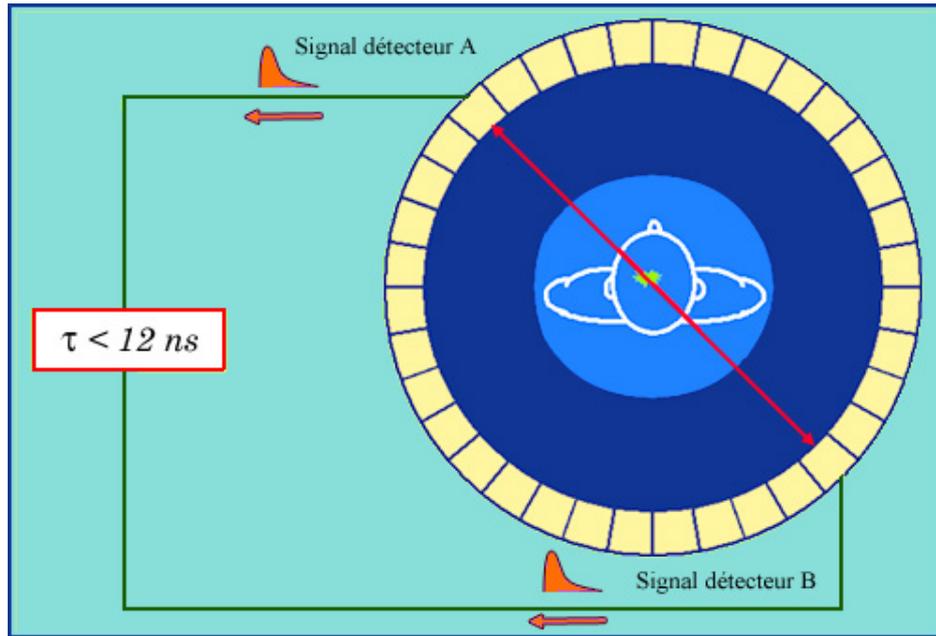


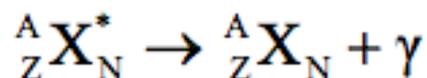
Figure 15 : Principe de fonctionnement d'une caméra TEP (site laradioactivite.com)

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

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

c. Emetteurs γ

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



Ces photons sont des rayonnements constitués d'ondes électromagnétiques de courte longueur d'onde et d'énergie très variable. Les photons γ , particule sans masse, ni charge, ont un fort pouvoir pénétrant et un TEL faible. Ces rayonnements interagissant peu avec la matière, peuvent traverser des épaisseurs importantes de matière et sont par conséquent utilisés en imagerie. Ils sont détectés par une gamma-caméra constituée de capteurs couplés à des collimateurs (canaux en plomb) permettant de sélectionner les rayonnements uniquement perpendiculaires aux collimateurs (Figure 16). Les émetteurs γ sont très souvent couplés à une

molécule appelée traceur. L'image obtenue appelée scintigraphie, représente le devenir du traceur dans l'organisme.

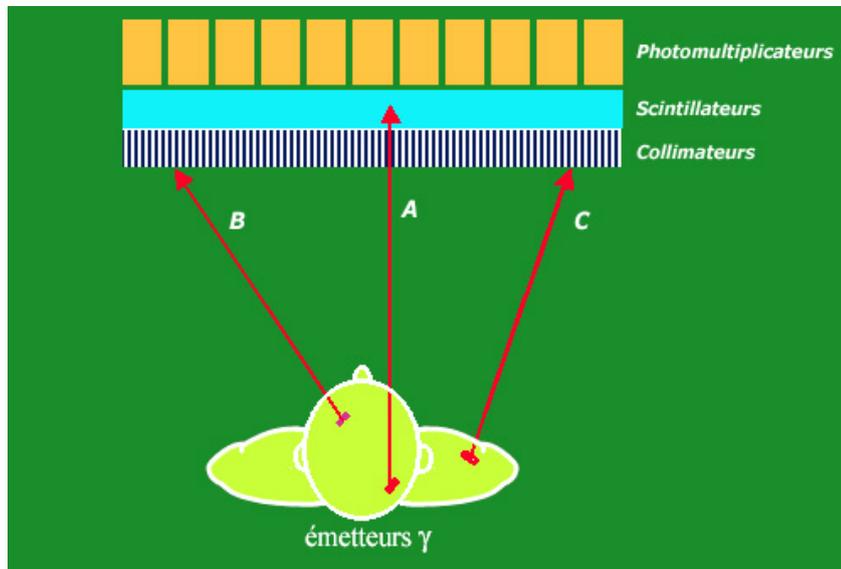


Figure 16 : Principe de fonctionnement d'une gamma caméra (site laradioactivite.com)

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

Les deux techniques d'imagerie décrites ci-dessus présentent individuellement des avantages et des limites en terme de sensibilité et de résolution (Table 9).

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

Table 9 : Comparaison clinique et préclinique des propriétés de l'imagerie TEP et TEMP (D'après Jansen, 2007)

Le développement de nouveaux radiopharmaceutiques, les améliorations techniques et la combinaison à d'autres techniques d'imagerie comme le scanner ou l'IRM ont pour but de diminuer ces limites. Ainsi, l'utilisation de TEMP-TDM (ou SPECT + computed tomographie), et TEP-TDM (ou PET + computed tomographie) permet d'obtenir de bien meilleures résolutions et

une amélioration des diagnostics en associant des informations fonctionnelles et morphologiques.

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

B. Applications des radioisotopes en Médecine Nucléaire

1. En thérapie

La Radiothérapie Interne Vectorisée (RIV) est définie comme l'utilisation de médicaments radiopharmaceutiques associant une molécule biologique à un isotope radioactif émetteur β - ou α dans un but thérapeutique. Aujourd'hui ce sont les émetteurs β - qui ont le plus d'application. Les plus utilisés sont l'yttrium 90 (^{90}Y), l'iode 131 (^{131}I) et de plus en plus, le rhénium 186 ou 188 (^{186}Re ou ^{188}Re).

La RIV utilise un radionucléide seul ou fixé sur des agents de vectorisation variés comme un peptide, ou encore un Ac monoclonal. Des peptides analogues de la somatostatine (octréotide, lanréotide par exemple) ont été marqués dans le cadre de traitement de tumeurs neuroendocrines, avec différents isotopes émetteurs β - comme l' ^{90}Y ou le lutétium 177 (Kraeber-Bodéré, 2011). Différentes études ont démontré leur efficacité, cependant en termes de dosimétrie aux tissus sains, le lutétium 177 semble plus favorable que l' ^{90}Y (Cremonesi, 2011).

Dans le cas où il s'agit d'Ac monoclonaux utilisés comme agent de vectorisation, la RIV est appelée RadioImmunoThérapie. L'Ac monoclonal reconnaissant un Ag exprimé par les cellules tumorales est couplé à un radionucléide. L'efficacité de ce radioimmunoconjugué provient essentiellement de la radioactivité qui provoque une irradiation à bas débit de dose, déposant une dose d'irradiation de façon hétérogène, selon une exponentielle décroissante, mais aussi de l'Ac monoclonal qui peut stimuler les mécanismes entraînant un effet tumoricide. L'effet antitumoral de ce radioimmunoconjugué peut être augmenté car les mécanismes immunologiques se conjuguent aux mécanismes de toxicité radiobiologique. Les cellules non directement ciblées par les Ac monoclonaux peuvent être détruites par le mécanisme dit du « feu croisé » (Bodet-Milin, 2009). L'un des meilleurs exemples d'application de la RIT est l'ibritumomab tiuxétan (Zevalin®) marqué à l' ^{90}Y qui est indiqué dans le traitement des lymphomes folliculaires CD20 positifs chez les adultes réfractaires ou rechutant après traitement par rituximab.

La dernière technique de RIV est l'approche dite de pré-ciblage. Le principe consiste à administrer dans un premier temps un Ac non radioactif dit « froid », afin qu'il se fixe à l'Ag à

cibler et dans une seconde étape une molécule radiomarquée qui est capable de se fixer à l'Ac. L'Ac froid peut être capable de reconnaître en premier l'antigène cible et ensuite une petite molécule radiomarquée comme un haptène. L'Ac froid est bispécifique et monovalent pour chaque antigène. L'haptène est choisi pour ses propriétés pharmacocinétiques. Cette méthodologie porte le nom de « Affinity Enhancement System » ou AES et a pour objectif de réduire l'irradiation des tissus sains. Des essais cliniques ont par exemple été menés chez des patients atteints de cancer médullaire de la thyroïde avancé. Ces patients ont reçu un anticorps bispécifique anti-ACE et anti-diéthylentriamine pentaacétate (DTPA) suivi quatre à cinq jours après, par l'injection d'un haptène, le DTPA bivalent marqué à l'¹³¹I et à l'indium 111. L'émetteur à visée thérapeutique est ici l'¹³¹I (Kraeber-Bodéré, 2006).

Pour ce qui est des émetteurs α , ils ont été longtemps délaissés au profit des émetteurs β -. Ils vont aujourd'hui trouver une application en radiothérapie interne, puisque leurs hautes énergies délivrées et leurs faibles parcours vont permettre d'administrer une forte dose au niveau du tissu ciblé et ce en diminuant la toxicité au niveau des tissus sains (Elgqvist, 2011). C'est le cas notamment de l'Alpharadin (radium-223 chlorure) radiopharmaceutique en essai clinique de phase III en traitement des patients atteints d'un cancer de la prostate métastasé résistant à la castration (Cheetham, 2012).

2. En diagnostic

Pour la réalisation de scintigraphie, les critères de choix du radioisotope à visée diagnostique sont avant tout le type de rayonnement (β^+ ou γ) et sa période. Mais d'autres éléments sont à prendre en compte, l'isotope de décroissance, son mode de production et la méthode de radiomarquage.

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

Le mode de production de l'isotope radioactif est à prendre en compte car la disponibilité de celui-ci et le coût vont en dépendre. Tous les isotopes utilisés en Médecine Nucléaire sont obtenus à partir de trois grands modes de production : cyclotron (Iode 123 ¹²³I, Fluor 18), réacteurs nucléaires (¹³¹I), ou générateurs (Technétium 99 métastable ^{99m}Tc). Ce dernier mode est très avantageux puisqu'il permet de produire l'élément radioactif désiré sur le site même, avec une activité spécifique importante et à un moindre coût.

La méthode de radiomarquage est un des critères prépondérants, valable en diagnostic comme en thérapie. Elle doit être simple, en une ou deux étapes maximum et doit permettre d'obtenir une pureté radiochimique supérieure à 90%. Les radiopharmaceutiques obtenus doivent être

stables dans le milieu circulant (détection de la radioactivité) et la présence du radioélément ne doit pas perturber les propriétés ciblantes du vecteur. Deux stratégies de marquage des radiopharmaceutiques existent : par liaison covalente ou par complexation. Un dernier critère à ne pas négliger est celui de la radioprotection du personnel manipulant ce radioélément.

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

La TEP au [^{18}F]-Fluorodésoxyglucose (Figure 15), analogue fluoré du glucose représente la principale avancée de l'imagerie radioisotopique des tumeurs. Ce radiotraceur va s'accumuler dans les cellules en fonction de leur consommation en glucose, et va donc se concentrer dans les tumeurs présentant un métabolisme accru. Cette imagerie par marquage métabolique est très sensible et résolutive mais a peu de spécificité, toutes les cellules métaboliquement actives fixant ce MRP (Montravers, 2009). Un autre émetteur β^+ qui fait l'objet de nombreuses recherches est l'iode 124, de demi-vie 4.2 jours. Ce radioisotope serait intéressant pour marquer des Ac.

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

C. Isotopes utilisés pour le radiomarquage d'anticorps

Les Ac monoclonaux sont des molécules biologiques spécifiques. Cette spécificité est exploitée aujourd'hui dans de nombreux domaines cliniques notamment en oncologie et en hématologie pour l'immunociblage des tumeurs. Certains Ac monoclonaux peuvent être marqués à l'aide d'isotopes radioactifs choisis en fonction de l'application recherchée, diagnostique RIS ou

thérapeutique RIT. Nous détaillerons principalement les émetteurs utilisés en diagnostic puisque notre étude porte sur le radiomarquage d'IgA et d'IgG dans un but diagnostique.

- En diagnostic (Table 10):

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

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

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

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

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

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

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

Table 10 : Principaux radionucléides utilisés en RIS

La table 10 décrit les principaux radioéléments utilisés en RIS avec leur période, l'énergie de leurs rayonnements γ (en keV) et/ou β^+ (en MeV) et enfin leur utilisation en imagerie TEMP ou TEP.

- En thérapeutique (Tables 11 et 12) :

En thérapeutique deux types d'émetteurs peuvent être employés :

- Les émetteurs β^-

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

Table 11 : Principaux radionucléides β^- utilisés en RIT

La table 11 décrit les principaux radioéléments émetteurs β^- utilisés en RIT avec leur période, l'énergie de leurs rayonnements β^- en MeV et de leurs rayonnements γ en keV le cas échéant. Elle montre également la pénétration maximale de ces rayonnements dans les tissus.

- Les émetteurs α

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

Table 12 : Principaux radionucléides α utilisés en RIT

La table 12 décrit les principaux radioéléments émetteurs α utilisés en RIT avec leur période, l'énergie de leurs rayonnements α en MeV et de leurs rayonnements γ en keV le cas échéant. Elle montre également la pénétration maximale de ces rayonnements dans les tissus.

D. Radiomarquage au technétium 99m

1. Le technétium

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

2. Propriétés physiques et production du technétium 99m

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

Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ présente ces propriétés, puisqu'il s'agit d'un émetteur γ pur, présentant une énergie de 140 keV, de période courte ($T_{1/2} = 6,02$ h) permettant d'administrer aux patients des activités suffisamment importantes pour avoir de bonnes images scintigraphiques tout en évitant une irradiation excessive. De plus, il est facilement obtenu à partir d'un générateur de molybdène

$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ permettant sa production quotidienne dans les services de Médecine Nucléaire, à un coût raisonnable. Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ provient de la désintégration β^- du ^{99}Mo . Le ^{99}Mo peut être produit soit par activation neutronique du ^{98}Mo en réacteur nucléaire, soit par fission de l'Uranium 235. Le ^{99}Tc , élément fils de période longue ($2,1 \cdot 10^5$ ans) est obtenu à partir du ^{99}Mo par voie directe à 13% et par voie indirecte à partir du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ suivant le schéma présenté en Figure 17.

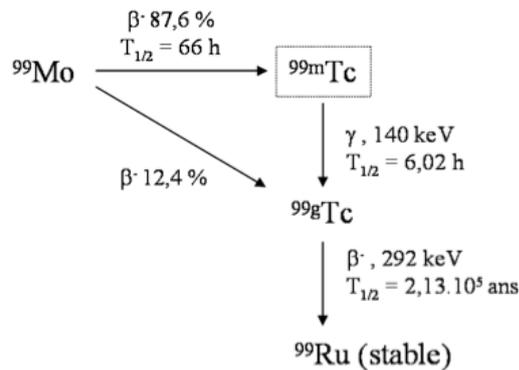
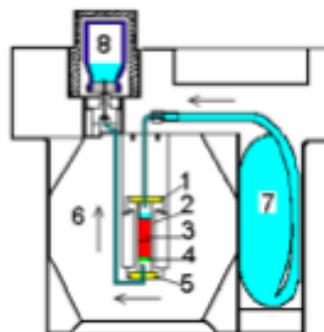
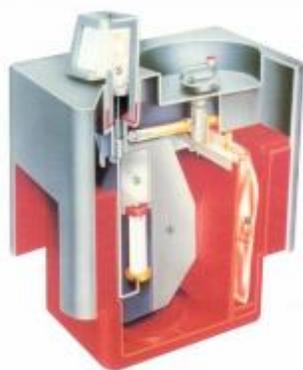


Figure 17 : Schéma de désintégration du ^{99}Mo

Le générateur de molybdène $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Figure 18), est constitué de molybdate $^{99}\text{MoO}_4^-$ adsorbé sur une colonne d'alumine échangeuse d'ions. Le ^{99}Mo décroît continuellement en $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et ^{99}Tc . La colonne est éluée par une solution stérile de chlorure de sodium 0,9% qui va permettre d'entraîner les ions technétium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et ^{99}Tc , sous forme de pertechnétate (TcO_4^-) faiblement fixés alors que le ^{99}Mo est lui retenu. L'éluat est alors composé de chlorure de sodium 0,9% contenant l'espèce $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- \text{Na}^+$ en concentration inférieure à 10^{-6} M.



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

Figure 18 : Générateur de molybdène $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

3. Chimie du technétium

Le technétium est un métal artificiel de la deuxième série des éléments de transition qui appartient au groupe VIIB comme le manganèse et le rhénium. Il possède sept électrons « s » et « d » sur sa couche de valence. Sa configuration électronique est la suivante : $[\text{Kr}] 4d^5 5s^2$. La

chimie du technétium, est dominée par la formation de complexe métal (accepteur d'un ou de doublets électroniques)/ligand (donneur de doublet).

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

- Les complexes métalliques très stables qui possèdent les propriétés biologiques «technétium-essentiels» dans lesquels le complexe chélatant fait partie intégrante de la structure active et complète le vecteur. Le complexe formé ne doit pas être métabolisé dans l'organisme. Sans le métal, la molécule ne serait pas délivrée à sa cible. Ce sont principalement des traceurs de débit, utilisés pour les explorations des fonctions rénale et cardiaque, et de la perfusion cérébrale.
- Les complexes métalliques «technétium-non essentiels» où l'atome de ^{99m}Tc est ajouté à une molécule biologiquement active. Ces composés biologiquement actifs peuvent être préparés en tant que «technétium-non essentiels» car ils se lient à leur cible avec ou sans l'inclusion du métal. La fixation de l'isotope se fait par l'intermédiaire d'un chélate bifonctionnel.

Le technétium possède neuf degrés d'oxydation de Tc (-I) à Tc (+VII). En solution aqueuse, le diagramme potentiel-pH du technétium montre que seuls les degrés d'oxydation +VII, +IV voire +III sont stables en présence d'eau (Figure 19). Les autres degrés d'oxydation ne sont stabilisés que par des ligands hétéroatomiques différents de H_2O .

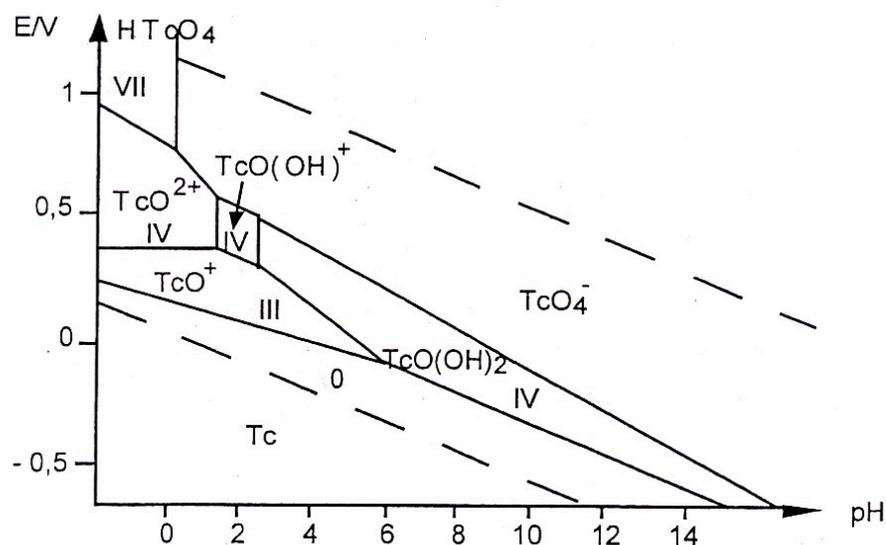


Figure 19 : Diagramme potentiel-pH du technétium dans l'eau à 25°C.

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

a. Réduction du pertechnétate

Pour pouvoir former des complexes, le technétium doit être réduit à des degrés d'oxydation inférieurs à VII, ce qui forme des orbitales « d » vides, qui vont lui permettre de se lier à des ligands donneurs d'électrons (N, S, P, carboxylates) avec un nombre de coordination allant de 4 à 9. Le contrôle de l'état d'oxydation du technétium va dépendre de nombreux paramètres comme la nature du réducteur, le pH et la température de réaction, et la nature des ligands et des coligands (Verbeke, 2003). Les formes réduites doivent être complexées par le ligand dès leur formation car elles peuvent réagir avec des molécules d'eau et d'oxygène pour aboutir à des complexes inertes. La stabilité des complexes technétiés injectés est primordiale, sans quoi c'est la biodistribution de TcO_4^- qui est observée.

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

b. Structure générale des complexes technétiés

La structure générale des complexes technétiés peut être représentée par $[Tc X_n L_m]$ avec TcX le cœur du complexe, où X = oxygène, soufre ou azote et L le ligand. Selon la nature de X et la valeur de n, on distingue par exemple (Figure 20) :

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

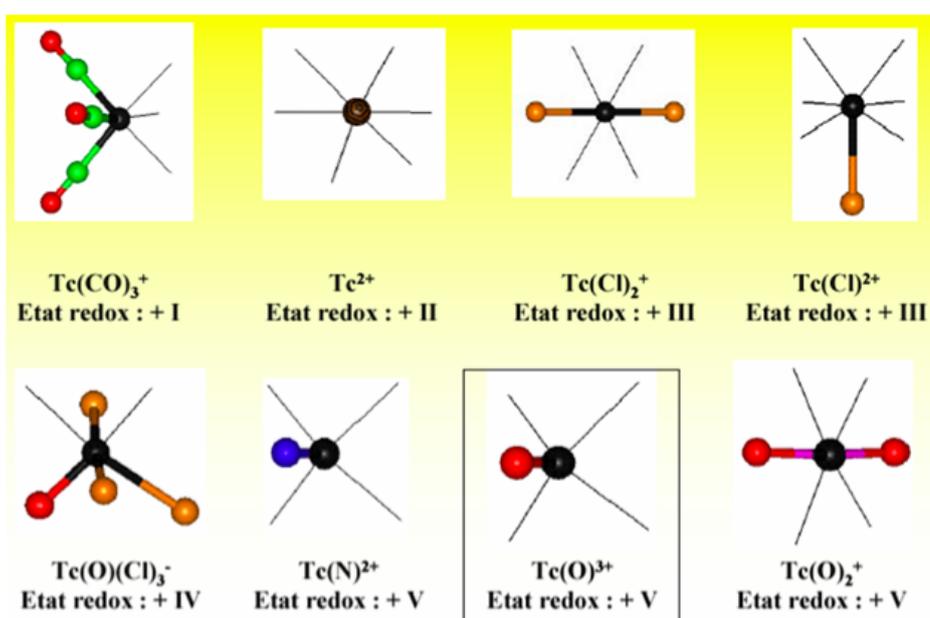


Figure 20 : Principaux cœurs de technétium et état d'oxydation du cœur métallique

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

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

Les complexes de degré d'oxydation +V sont les plus rencontrés en Médecine Nucléaire. Les cœurs les plus représentatifs de cet état d'oxydation sont le monoxotechnétium $[\text{TcO}]^{3+}$, le dioxotechnetium $[\text{TcO}_2]^+$ et le nitrurotechnétium $\text{Tc}(\text{N})^{2+}$. Le cœur $[\text{TcO}]^{3+}$ est le plus répandu et se forme facilement au cours de la réduction du pertechnétate en milieu aqueux légèrement acide. Le métal est, dans ces complexes, considéré comme pentacoordonné, le métal étant situé au-dessus du plan contenant les quatre ligands (Figure 21). Les thiolates peuvent représenter des ligands donneurs stabilisant ce cœur.

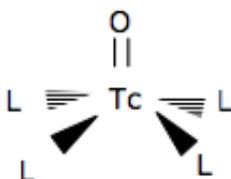


Figure 21 : Cœur monoxotechnétium

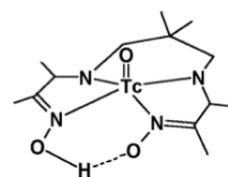


Figure 22 : Structure du ^{99m}Tc -HMPAO

Le radiopharmaceutique le plus connu avec ce cœur technétié est l'examétazine (HMPAO) Ceretec® (Figure 22) indiqué dans la scintigraphie cérébrale ou le marquage des polynucléaires neutrophiles.

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

Ce sont les premiers complexes à avoir été synthétisés en Médecine Nucléaire pour les scintigraphies osseuses. Les complexes les plus fréquents de ce degré d'oxydation sont l'oxyde ($\text{TcO}_2, x\text{H}_2\text{O}$) et les hexahalogénotechnétates (TcX_6^{2-}). Généralement, ces composés sont hexacoordonnés et sont formés lors des réactions de synthèse en milieu acide et en présence de réducteur comme le chlorure stanneux. Des réactions de marquage avec des ligands alkyldiphosphonates comme l'HMDP Osteocis® permettent d'avoir des radiopharmaceutiques à tropisme osseux qui vont se fixer aux cristaux d'hydroxyapatite de l'os en formation.

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

Ces complexes de bas degré d'oxydation ont suscité peu d'intérêt jusqu'à la description du $[\text{MIBI}]_6^+$, composé stable et hydrosoluble, par Trop et al. en 1980. Ce radiopharmaceutique

appelé sestamibi Cardiolite® est aujourd'hui très employé et indiqué dans les explorations myocardiques, et les scintigraphies des parathyroïdes (Figure 23).

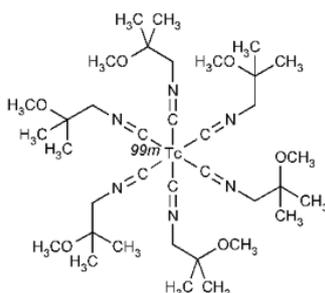


Figure 23 : Structure du ^{99m}Tc -MIBI

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

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

L'équipe de Alberto et al. en 1998 a créé un nouveau complexe dans ce degré d'oxydation dans lequel le technétium est lié à trois molécules de monoxyde de carbone et à trois ligands donneurs. Il s'agit du cœur tricarbonyl, aujourd'hui utilisé comme complexe intermédiaire échangeant des ligands avec un synthon bifonctionnel (qui sera développé dans le paragraphe III. C. 5. c.).

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

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

- a. Approche par voie directe : complexation rapide (Figure 24)

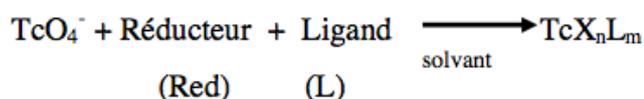


Figure 24 : Réaction de marquage par voie directe (X = oxygène)

Dans le cas de protéine, cette méthode directe de complexation d'un radiométal met à profit les groupements chélatants libres des chaînes latérales des acides aminés. Lors du radiomarquage des Ac monoclonaux par voie directe, la stabilité du complexe est corrélée avec la densité des groupements thiol, cela révèle le rôle déterminant de ces groupes dans la complexation (Comet, 1999).

Le solvant est généralement de l'eau si le ligand est hydrophile ou un mélange alcool/eau.

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

b. Approche intégrée

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



Figure 25 : Stratégie de marquage de peptide par approche intégrée (en rouge : le métal et en bleu : le motif de chélation)

L'approche intégrée (1) a été par exemple exploitée par Aufort et al. en assemblant deux entités A_i et B_j capables de coordonner un cœur métallique M pour former un complexe $[A_i.M.B_j]$. Cette méthode (Figure 25) a été développée pour obtenir une chimiothèque de traceurs assemblés par coordination du ^{99m}Tc qui miment la séquence peptidique RGD (Arginine-Glycine-Asparagine) reconnue par l'intégrine $\alpha V\beta 3$, première intégrine associée à l'angiogenèse tumorale (Aufort, 2008).

c. Marquage indirect : Approche bifonctionnelle

Le marquage indirect est effectué avec dans un premier temps la fonctionnalisation de la protéine par un synthon bifonctionnel (BiFunctional Chelate Agent BFCA), et dans un second temps la complexation du ^{99m}Tc . Un BFCA est un ligand possédant à une extrémité les propriétés de ligand multidenté permettant la coordination du métal et à une deuxième extrémité, un groupe fonctionnel permettant une liaison covalente avec la molécule à marquer (Figure 26).



Figure 26 : Réaction de marquage par l'intermédiaire d'un chélate bifonctionnel

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

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

- La première approche implique la formation du chélate technétié, puis la conjugaison de celui-ci à une biomolécule, dans une étape séparée. Cette approche a été utilisée avec succès pour le marquage de fragments d'Ac spécifiques du mélanome avec du ^{99m}Tc par Fritzberg et al. (Fritzberg, 1988). Dans cette voie, la chimie est mieux définie, et la biomolécule cible n'est pas exposée à des conditions difficiles dans l'étape de complexation. Cependant, cette technique est longue et nécessite de nombreuses étapes de synthèse chimique complexes.
- La deuxième approche implique d'abord la fixation du BFCA à la biomolécule pour former un conjugué. Une fois que le conjugué est préparé, le radiomarquage peut être réalisé soit par réduction directe de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ en présence d'une quantité suffisante du conjugué soit par

échange de ligand avec un complexe intermédiaire du ^{99m}Tc , tel que le $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ glucoheptonate (Ozker, 2002). Cette approche combine la facilité du marquage direct et la chimie de l'approche par chélate préformé. Il s'agit de la plus pratique pour la formulation de kit et pour le développement de produits commerciaux (Liu, 2008).

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

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

L'HYNIC ou 2-hydrazinonicotinamide est un agent bifonctionnel, qui possède à une extrémité une fonction acide qui se lie aux amines primaires des vecteurs, et à l'autre extrémité une fonction hydrazine qui se complexe au technétium pour donner un cœur diazotechnétium. Il a été décrit pour la première fois par l'équipe d'Abrams pour marquer des Ac (Abrams, 1990). L'HYNIC est aujourd'hui un BFCA utilisable pour marquer de nombreuses biomolécules, comme des analogues de la somatostatine (Decristoforo, 1999), des liposomes (Laverman, 1999), des protéines (Figure 27) comme l'annexine V (Biechlin, 2008).

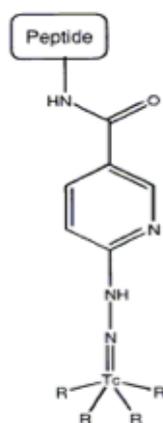


Figure 27 : Structure du complexe ^{99m}Tc -HYNIC-peptide

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

- Le synthon MAG3

Le MAG3 Mertiotide (mercaptoacetyltriglycine) est un ligand tétradente de la famille des chélatants du type $N_xS(4-x)$ (Figure 28). Il a l'avantage d'avoir une petite taille et une bonne stabilité. Ce ligand est utilisé pour la coordination du cœur monooxotechnétium TcO^{3+} , le ^{99m}Tc peut lier des atomes de soufre et d'azote. La molécule marquée peut présenter différents états intermédiaires : liaison à 4 soufres donc 4 MAG3, puis liaison à 2 soufres et 2 azotes soit 2 MAG3, et liaison à 1 soufre et 3 azotes soit 1 MAG3.

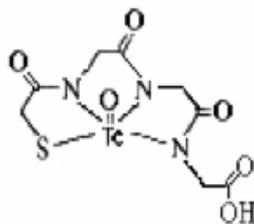


Figure 28 : ^{99m}Tc -Mertiotide

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

- Le complexe tricarbonyl

Le cœur tricarbonyl (Figure 29), a été développé pour la première fois par Alberto et al. en 1998 en présence de monoxyde de carbone gazeux et d'un réducteur soluble et fort mais qui ne se coordine pas avec le technétium réduit (Alberto, 1998). Ce chélate technétié peut maintenant être obtenu plus aisément à l'aide de pertechnétate de sodium ($^{99m}TcO_4^-$), et d'un kit commercial (Isolink®), dans lequel le boranocarbonate est utilisé comme source de monoxyde de carbone.

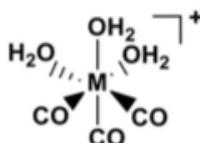


Figure 29 : Cœur tricarbonyl. M correspond à l'atome de ^{99m}Tc

Le complexe technétié obtenu, $[^{99m}Tc(OH)_3(H_2O)_3]^+$, est un semi-aquaion stable, dont les molécules d'eau très réactives peuvent facilement être substituées par un ligand donneur d'électron. Le pertechnétate $^{99m}TcO_4^-$, doit être réduit de l'état VII à l'état I car il est stabilisé à l'état d'oxydation I, il est alors difficilement oxydable par l'oxygène et ne nécessite pas la présence d'un coligand (Liu, 1999). Pour cela, un agent réducteur fort mais qui ne se coordine

pas au métal réduit et qui est soluble dans les solvants comme le NaBH_4 est nécessaire (Alberto, 1999). Dans le kit d'Isolink®, le borocarbonate de sodium ($\text{Na}_2\text{BH}_3\text{CO}_2$) est présent et permet ainsi à la fois la production de CO et la réduction du technétium.

La réaction est réalisée à pH 10-11 afin de stabiliser le réactif réducteur. A l'état I, en milieu aqueux, 3 sites de coordination sont occupés par le monoxyde de carbone CO et les sites restants sont occupés par des molécules d'eau. Le tricarbonyl précurseur est stable dans l'eau à pH basique mais il échange rapidement ses molécules d'eau avec une grande variété de ligands donneurs qui sont des ligands plus forts et plus mous que l'eau. Ces ligands qui se fixent facilement au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -aquaion peuvent être des thioéthers, thiolates et N-hétérocycles (Egli, 1999). Ce sont des fonctions qui correspondent aux chaînes latérales de la méthionine, cystéine et histidine. L'utilisation de ce cœur a permis notamment de marquer des peptides préparés avec de l'histidine en position N-terminale et des fragments d'Ac avec de bons rendements (Waibel, 1999). Cette méthode de marquage est donc particulièrement intéressante pour marquer des protéines comme des Ac. Des études sur l'influence de la denticité des ligands sur la stabilité des complexes de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et sur leur comportement *in vivo* ont suggéré que les chélateurs bidentés sont moins stables avec les molécules biologiques telles que l'histidine ou la cystéine par rapport aux ligands tridentés (Schibli, 2000). D'autre part, il a été démontré que les ligands aqueux de $[\text{Tc}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ sont facilement substitués par des ligands tridentés contenant l'amine comme les ligands donneurs N-hétérocyclo aromatiques et/ou carboxyliques pour produire des complexes basés sur le cœur $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ (Pak, 2003).

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

5. Méthode choisie pour le radiomarquage des IgA

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

Un complexe technétié dans un faible degré d'oxydation (+I) tel que le cœur tricarbonyl $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ a été choisi pour notre travail du fait de sa grande stabilité cinétique. Dans un travail de Biechlin et al., il a été montré que le marquage utilisant le cœur tricarbonyl était d'une

stabilité supérieure et apportait de meilleurs rendements que celui utilisant la méthode HYNIC (Biechlin, 2008). Ce complexe est petit et hydrophile et devrait peu modifier les propriétés physico-chimiques et biologiques de la molécule bioactive.

Bien que la fixation du ^{99m}Tc -tricarbonyl soit possible directement, nous avons choisi de fonctionnaliser l'Ac avec du 2-Iminothiolane (2-IT) ou Traut's Reagent qui représente dans le cas de ce radiomarquage, le synthon bifonctionnel. Ce « spacer » facilite la liaison de l'ion métallique au conjugué (Meares, 1990). L'objectif est de greffer des résidus thiol libres sur les Ig (Ig-SH). Cette réaction, décrite pour la première fois en 1989 par Goedemans et al., peut permettre d'augmenter la réactivité des Ig greffées vis-à-vis du complexe ^{99m}Tc -tricarbonyl et d'améliorer les rendements de marquage (Goedemans, 1995). Les travaux de Biechlin et al., ont montré que cette technique peut être appliquée aux IgG et donne de très bons rendements (Biechlin, 2005). Le gain de rendements obtenus par ce greffage nous intéresse tout particulièrement pour les IgA, car les quantités d'IgA pouvant être utilisées restent limitées. Il s'agit d'une réaction entre les groupements amine libres des protéines et le 2-IT produisant un groupe mercaptobutyrimidyl (MBG) (Figure 30). Le 2-IT présente l'avantage de permettre une réaction dans des conditions non dénaturantes et d'être disponible commercialement. Le cœur tricarbonyl joue quant à lui le rôle de complexe technétié préformé.

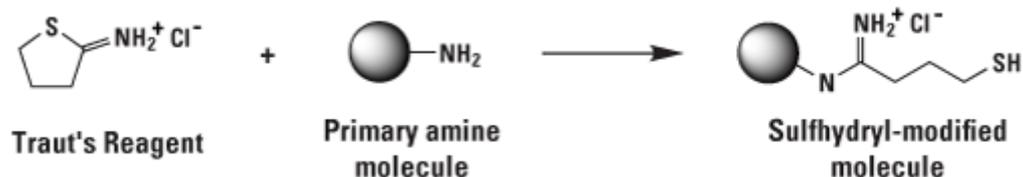


Figure 30 : Réaction des acides aminés avec le 2-IT. Formation du groupe MBG.

IV. Présentation du travail

Nous avons détaillé dans la revue bibliographique l'intérêt que peuvent présenter les Ac monoclonaux dans la prise en charge des cancers en thérapie (Immunothérapie, RIT) et en diagnostic. Nous avons précisé qu'à l'heure actuelle, la majorité des Ac monoclonaux sont des Ig d'isotype G ou des fragments de celles-ci. Cependant, avec le recul de leur utilisation, ils ont montré des limitations persistantes. Notre projet est de nous intéresser à une nouvelle classe d'Ac jusque là peu étudiée et délaissée au profit des IgG : les IgA.

En collaboration avec la société B Cell Design qui dispose d'un brevet permettant la production d'IgA, nous avons pour objectif de radiomarquer ces IgA, puis d'évaluer leur intérêt par des études *in vitro*, tout en comparant leurs propriétés pharmacocinétiques aux IgG. Au vu des résultats de celles-ci, des études *in vivo* sur petit animal pourront être envisagées et nous permettrons d'estimer si ces « nouveaux » Ac présentent des avantages en terme d'imagerie.

Pour cela, nous avons choisi deux antigènes, le CD20 et l'ACE, antigènes d'intérêt dans le Lymphome Non Hodgkinien et le Cancer Colorectal respectivement, tous deux décrits dans la revue bibliographique. Le LNH a été sélectionné car l'IgG anti-CD20 a fait preuve de son efficacité dans cette pathologie et va représenter dans notre travail l'Ac de référence. Le CCR a été retenu en raison du tropisme pour les épithéliums muqueux des IgA et de la résistance enzymatique particulière des IgA sécrétoires grâce à la pièce sécrétoire. Cette dernière propriété des IgA permet d'envisager une administration par voie orale.

Parmi les techniques d'imagerie moléculaire existantes, nous avons présenté les avantages des radiopharmaceutiques marqués au ^{99m}Tc . Le ^{99m}Tc est le radioisotope que nous avons choisi pour radiomarquer les IgA et les IgG par radiomarquage indirect :

- Fonctionnalisation des Ig par un synthon bifonctionnel (le 2-Iminothiolane)
- Complexation du ^{99m}Tc à un groupe chélatant (le cœur tricarbonyl)
- Complexation du chélate technétié préformé avec la protéine greffée

Nous avons ensuite voulu vérifier la stabilité du radiomarquage et la conservation des propriétés des Ig radiomarquées en étudiant *in vitro* leur intégrité et leur immunoréactivité.

Dans le cadre de ce travail, les études ont été réalisées sur l'IgG anti-CD20 et l'IgA anti-ACE, l'IgA anti-CD20 et l'IgG anti-ACE étant en cours de synthèse.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

I. Matériel

A. Les immunoglobulines

- Les IgA ont été produites par la Société B-Cell Design (Limoges, France). Les échantillons sont un mélange de monomères, dimères et chaînes lourdes d'IgA en tampon Phosphate Buffer Alkaline (PBS). Les IgA utilisées sont de différentes antigénicités :
 - IgA anti-ovalbumine (anti-OVA) avec lesquelles nous avons mis au point le radiomarquage
 - IgA anti-ACE ciblant l'Antigène Carcino-Embryonnaire : IgA pertinente. Trois clones d'IgA anti-ACE ont été produits par B Cell Design. Le clone 15B3 a été choisi car il s'est montré le plus affin en ELISA.
 - IgA anti-ARA (anti-Arachide) : IgA irrelevante
- Les IgG utilisées sont des IgG commercialisées. Les IgG pertinentes pour le CD20 sont les IgG anti-CD20 qui proviennent de la spécialité Mabthera® (rituximab à 10 mg/ml) et les IgG irrelevantes pour cette cible sont les IgG anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) provenant de la spécialité Vectibix® (panitumumab à 20 mg/ml).

B. Le technétium 99m et le cœur tricarbonyl

La solution de pertechnétate de sodium [$\text{Na}^+ \text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$] est obtenue par élution d'un générateur de Technétium Elumatic III (CisBio, Saclay, France) disponible dans le service de Médecine Nucléaire.

Le cœur $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricarbonyl nécessaire au radiomarquage des Ig est produit grâce à une trousse d'Isolink® gracieusement fournie par Covidien (Petten, Pays Bas). La trousse d'Isolink® contient un mélange de sodium boranocarbonate ($\text{Na}_2\text{BH}_3\text{CO}_2$; 4,5 mg), de sodium carbonate (Na_2CO_3 ; 7,15 mg), de sodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 2,85 mg) et de sodium tartrate ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$; 8,5 mg).

C. Les réactifs et les cellules

Le 2-Iminoéthanol, la [D, L] Cystéine, le réactif d'Ellman (ou DTNB), l'HEPES (hydroxyéthyl piperazineethanesulfonic acid), la BSA (Albumine from Bovine Serum) et les réactifs utilisés pour les tampons PBS et NaH_2PO_4 , ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Le kit de dosage des protéines utilisé est le Micro BCA Protein Assay Kit (Fisher Scientific, Illkirch, France).

Les tampons de transfert, les tampons de migration pour le Western Blot, ont été réalisés à partir de réactifs achetés chez Sigma-Aldrich. Le Goat Anti-Human IgA-HRP ou IgG-HRP (Horse Raddish Peroxydase), et le substrat de l'enzyme, Chemiluminescent HRP substrate proviennent de Beckman Coulter (Villepinte, France). Le marqueur de poids moléculaire a été acheté chez Biorad (Hercules, Etats Unis).

Les antigènes pour immunoaffinité ELISA sont l'antigène ACE provenant de Abcys SA (Les Ulis, France) et l'antigène CD20 provenant de Millegen (Toulouse, France). Le Goat Anti-Human IgA-UNLB (Unlabelled) et le Goat Anti-Human IgA-AP (couplé à la Phosphatase Alcaline) ont été achetés chez Clinisciences pour Southern Biotech (Montrouge, France). Le Goat Anti-Human IgG-UNLB, le Goat Anti-Human IgG-AP et le para-Nitrophényl Phosphate proviennent de Sigma-Aldrich.

Les milieux de culture des différentes lignées cellulaires étudiées proviennent tous de In Vitrogen (Fisher Scientific, Illkirch, France). Le G-418 ou Néomycine a été acheté chez PAA Laboratories (Pasching, Autriche).

Les solvants comme le méthanol, l'acide chlorhydrique de qualité HPLC proviennent de Sigma-Aldrich.

Plusieurs lignées cellulaires ont été employées pour l'étude de l'immunoaffinité sur cellule. Les cellules EL4 CD20 et EL4 WT (pour Wild Type) nous ont été fournies par le Laboratoire B Cell Design qui les a obtenues du Professeur Hervé Watier de l'Université de Tours. Les lignées cellulaires de cancer colorectal WiDr, DLD1 et HT29 nous ont été fournies par notre équipe d'accueil EA3842, elles proviennent initialement de l'ATCC (American Type Culture Collection).

D. Les consommables et les instruments pour les études analytiques

Les Ig sont dialysées par centrifugation dans une Mégafuge 16R, sur Amicon 4 ou 15 avec un cut-off de 30-kDa (Millipore, Molsheim, France).

Les tubes Low Adsorption proviennent de chez Fisher Scientific (Illkirch, France).

La purification des Ig greffées par le 2-IT est réalisée par centrifugation, à l'aide de colonne de dessalage Zeba Desalt Spin Columns pour des échantillons compris entre 200 et 700 μ L (Fisher Scientific).

Les Puretés Radiochimiques (PRC) sont déterminées par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) à l'aide de bandelettes ITLC-SG (Instant Thin-Layer Chromatography-Gel de Silice)

(Varian, Les Ulis, France) ou Baker-Flex (J.T.Baker Inc). Le radiochromatographe est un lecteur Bioscan®.

Les premiers essais de Western Blot ont été effectués avec des gels que nous avons coulés puis ensuite à partir de gel précoulé Mini-Protean®TGX 4-15% (BioRad). La membrane de PVDF (Polyviylidène Fluoride) provient de BioRad. Le papier Whatman a été acheté chez Millipore.

La filtration nécessaire pour séparer les Ac fixés de ceux non fixés à la cible est réalisée par des filtres Millipore 0,45 µm (Millipore) à l'aide d'un Manifold model 1225 (Millipore). La radioactivité est déterminée par un compteur gamma Packard Cobra 5003.

Les microplaques 96 puits sécables et non sécables sont des Maxisorb (VWR) mise à part celle utilisée pour l'immunoaffinité des IgG anti-CD20 qui sont des Immulon 2 High Binding (Thermo-Fisherscientific).

Le spectrophotomètre mesurant l'absorbance est un Multiskan Fc (Thermo-Fisherscientific).

II. Méthodes

L'ensemble des manipulations impliquant de la radioactivité a été fait en respectant les consignes de radioprotection.

La manipulation de la radioactivité nécessite de travailler en dépression et en zone surveillée afin de limiter l'irradiation du personnel. Les préparations avec le ^{99m}Tc s'effectuent dans une boîte à gants en dépression. Les manipulations ont été effectuées avec un tablier plombé.

Une gestion des déchets radioactifs appropriée et rigoureuse est nécessaire, elle est fonction du type de déchets (liquide, solide, gazeux) et de la demi-vie de l'isotope. Les déchets gérés par décroissance, ayant une $T_{1/2}$ inférieure à 100 jours, sont conservés sur une période équivalente à 10 fois la $T_{1/2}$ du radioélément concerné et sont ensuite éliminés en conformité avec la législation en vigueur.

A. Mise au point du radiomarquage des immunoglobulines G et A

1. Fonctionnalisation de l'immunoglobuline par BFCA

Cette étape a pour objectif de greffer des groupements thiol (SH) sur les Ig (Ig-SH) par réaction avec le 2-Iminothiolane (2-IT ou Traut's Reagent) qui est un BFCA (Figure 31).

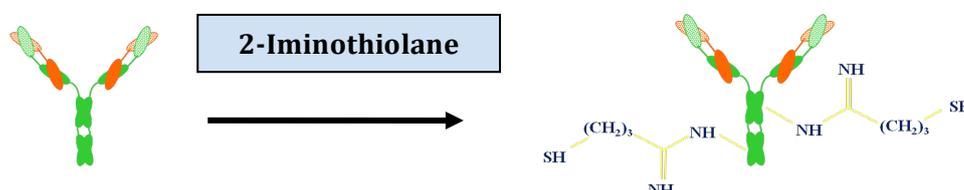


Figure 31 : Fixation du 2-IT sur un anticorps

Pour chaque radiomarquage, nous avons dû synthétiser des Ig greffées avec des groupements SH, les IgA ne pouvant être conservées à -20°C , contrairement à ce qui avait été fait dans les travaux de radiomarquage de Biechlin (Biechlin, 2005 ; Biechlin, 2008). Cette problématique a considérablement alourdi notre étude, obligeant à chaque fois à greffer des SH et rendant plus difficile la comparaison des résultats (variation de la fixation de SH, variation de la concentration en Ig après greffage, variation du volume obtenu après lavage, et en ce sens du volume réactionnel).

a. Greffe des groupements thiols

- Préparation du tampon PBS (pH = 7,4)

- Préparation des échantillons d'IgA et d'IgG en PBS. Les IgG anti-CD20 et anti-EGFR provenant de spécialités commerciales sont dialysées en PBS en centrifugeant sur Amicon pour se placer dans les mêmes conditions que les IgA.
- Préparation des solutions de 2-IT diluées en PBS à différentes concentrations (0,62 M, 0,31 M, 0,124 M et 0,062 M)
- Incubation des Ig avec le 2-IT : des aliquots d'Ig (0,5 à 4 nmol pour les IgG et 0,25 à 3,3 nmol pour les IgA) dilués en PBS pour un volume final de 210 à 480 µl sont incubés avec du 2-IT (volume correspondant à 6,67% du volume d'Ig) pendant 2h à température ambiante sous agitation lente en tube Low Adsorption.
- Lavage en PBS des Ig-SH (et des contrôles) pour éliminer le 2-IT non fixé:
 - Les premiers essais ont été réalisés en Amicon. En Amicon 4 : pour les IgG et en Amicon 15 : pour les IgA, car elles s'agrègent à des concentrations supérieures à 2 mg/ml (il est impératif de ne pas trop les concentrer). Le volume dans les Amicon 4 et les Amicon 15 est respectivement réajusté en PBS à 4 ml et 10 ml. La centrifugation est de 4000 tours par min pendant 10 min, à 4°C. Le volume final est au maximum de 1,5 ml. L'opération est répétée deux fois.
 - Une méthode de lavage plus adaptée et permettant de perdre moins d'Ac a été mise au point. Les Ig greffées sont lavées en colonne de dessalage Zeba Desalt Spin Columns, où le volume ne nécessite pas d'être réajusté et où le volume après centrifugation est équivalent au volume mis à centrifuger. Après préparation des colonnes par centrifugation à 2250 tours par min pendant 2 min, à 4°C, les échantillons sont déposés. Une nouvelle centrifugation, avec les mêmes paramètres, est effectuée. Les échantillons lavés sont alors récupérés dans le culot.

b. Quantification des groupements thiol fixés sur les Ig par spectrométrie

- Préparation extemporanée d'une solution étalon de cystéine en PBS (solution mère à 100 µM).
- Incubation (30min, à température ambiante) sur microplaque de 90 µl de la solution standard de cystéine (gamme 2,5-100 µM) ou des échantillons d'Ig avec 60 µl de solution de DTNB (acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque ou réactif d'Ellman)
- Lecture de la plaque par spectrophotométrie UV (405nm)

La gamme étalon faite grâce à la solution standard de cystéine, permet de quantifier les groupements SH fixés sur les Ig. Seules les Densités Optiques (DO) se trouvant dans la partie linéaire de la courbe seront utilisées.

2. Complexation du technétium à un groupe chélatant

Le cœur tricarbonyl est préparé à partir d'un kit d'Isolink® reconstitué avec du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (Figure 32).

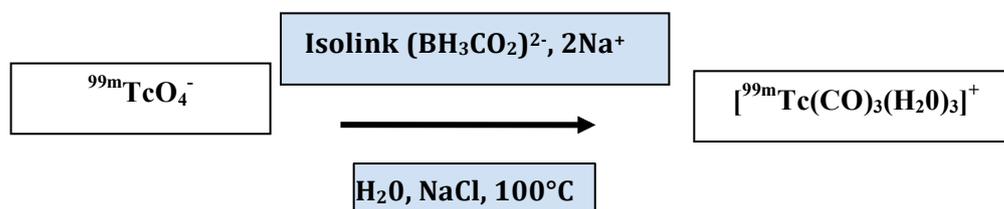


Figure 32 : Formation du cœur tricarbonyl.

a. Préparation du cœur tricarbonyl $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$

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

0,8 à 1 ml de solution de pertechnétate de sodium [$\text{Na } ^{99m}\text{TcO}_4$] d'activité comprise entre 2220 et 3700 MBq (soit 60 et 100 mCi) est ajouté au flacon d'Isolink® sans mettre de prise à air. Le flacon est agité par retournement, mis à incuber à 100°C (bain-marie sec) pendant 20 à 30 min, et refroidi dans de l'eau froide pendant 10 min. Une fois préparé, le cœur tricarbonyl est stable pendant 4h.

b. Contrôle de la Pureté Radiochimique du $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$

La PRC est déterminée par CCM : après dépôts de l'échantillon (4 μl) sur la plaque de chromatographie, celle-ci est placée dans une cuve fermée contenant le solvant approprié. Lorsque le front du solvant atteint le « haut » de la plaque (0,5 cm du bord), celle-ci est lue à l'aide du radiochromatographe.

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

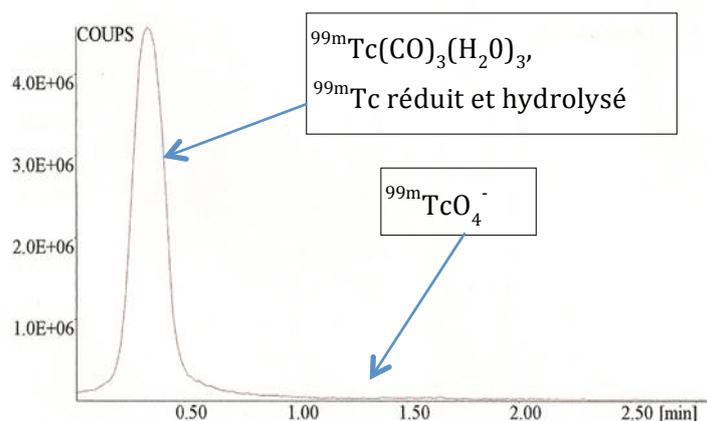
La PRC du $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ est déterminée par 2 CCM :

- 1^{ère} méthode : support d'oxyde d'aluminium Baker Flex, solvant méthanol/HCl en quantité 95/5 v/v. Avec cette méthode, le $^{99m}\text{TcO}_4^-$ migre avec le front du solvant, le cœur $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ et le technétium réduit et hydrolysé restent au point de dépôt.

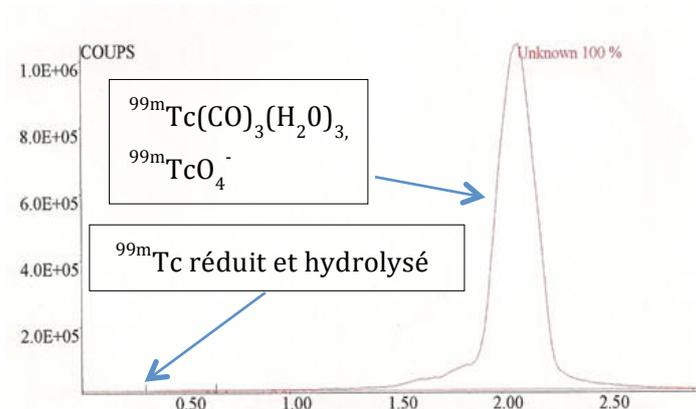
- 2^{ème} méthode : support ITLC gel de silice, solvant méthanol. Avec celle-ci, le technétium libre et le $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ migrent avec le front du solvant, alors que le technétium réduit et hydrolysé reste au point de dépôt.

Les Rapports Frontaux (Rf) en CCM (permettant d'obtenir les PRC) des différentes espèces chimiques sont présentés dans la table 13. Des exemples de radiochromatogramme relatifs à ces PRC se trouvent sur la figure 33.

Le rendement de marquage du ^{99m}Tc -Isolink[®] a été vérifié avant et après réajustement du pH nécessaire pour la complexation des Ig.



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



B. Support : ITLC-SG
Phase mobile : Méthanol

Figure 33 : Radiochromatogrammes du ^{99m}Tc -Isolink[®]

- A.** Support Baker Flex en phase mobile Méthanol/HCl (95/5 v/v) : Rf $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+=0$
B. Support ITLC-SG en phase mobile Méthanol: Rf $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+=1$

	Baker Flex avec Méthanol/HCl	ITLC SG avec Méthanol	ITLC SG avec NaCl
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Rf=0,5	Rf=1	Rf=1
^{99m}Tc réduit et hydrolysé	Rf=0	Rf= 0	/
$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ à pH7	Rf= 0	Rf=1	Rf=1
$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ à pH11	Rf= 0	Rf=1	Rf=1
^{99m}Tc -Anticorps	/	/	Rf = 0

Table 13 : Rapports Frontaux (RF) en CCM de chaque espèce chimique pouvant être présente dans le " ^{99m}Tc -Isolink[®]" et dans le " ^{99m}Tc -Ig"

3. Complexation du chélate technétié avec les immunoglobulines greffées SH

Les Ig-SH sont complexées avec le chélate technétié $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (Figure 34).

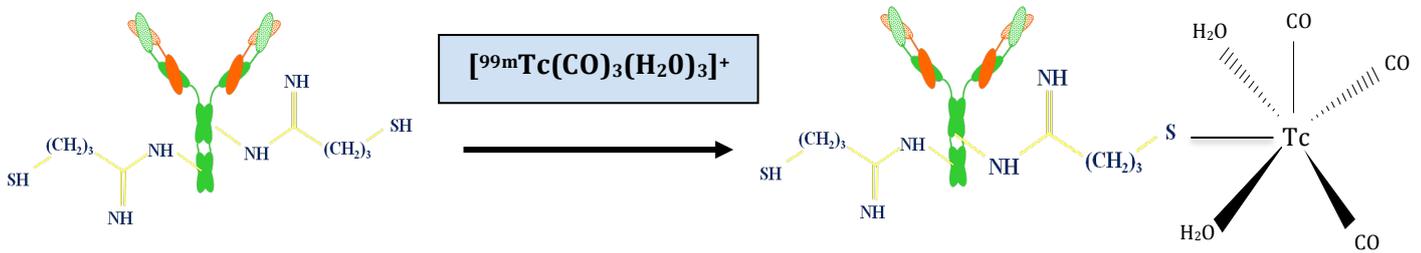


Figure 34 : Radiomarquage de l'Ig-SH par le ^{99m}Tc -Isolink®

a. Radiomarquage des immunoglobulines greffées SH

Pour effectuer le marquage dans des conditions non altérantes pour les Ig, le pH de l'Isolink® marqué, initialement de 11, est réajusté entre 7 et 8 avec 280 μl d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,5 M (mol/l).

Pour chaque échantillon (Ig greffées en groupements thiol ou non) des volumes de 160 à 450 μl sont mis à incuber, après mélange par retournement, avec des activités de 148 à 370 MBq (soit 4 à 10 mCi) de ^{99m}Tc -Isolink (150 μl) pendant 2 h à température ambiante, sous agitation lente en tube Low Adsorption.

b. Contrôle de la Pureté Radiochimique des immunoglobulines radiomarquées

Ce contrôle est réalisé par CCM sur plaque ITLC gel de silice et avec comme solvant du NaCl 0,9%. Les impuretés radiochimiques majoritaires pouvant être présentes sont le ^{99m}Tc -Isolink® non fixé aux Ac et le technétium non complexé dit « libre » $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Dans la table 13, les Rf en CCM de chaque espèce chimique pouvant être présente dans le « ^{99m}Tc -Ig » sont répertoriés. Des exemples de radiochromatogrammes relatifs à ces PRC se trouvent sur la figure 35.

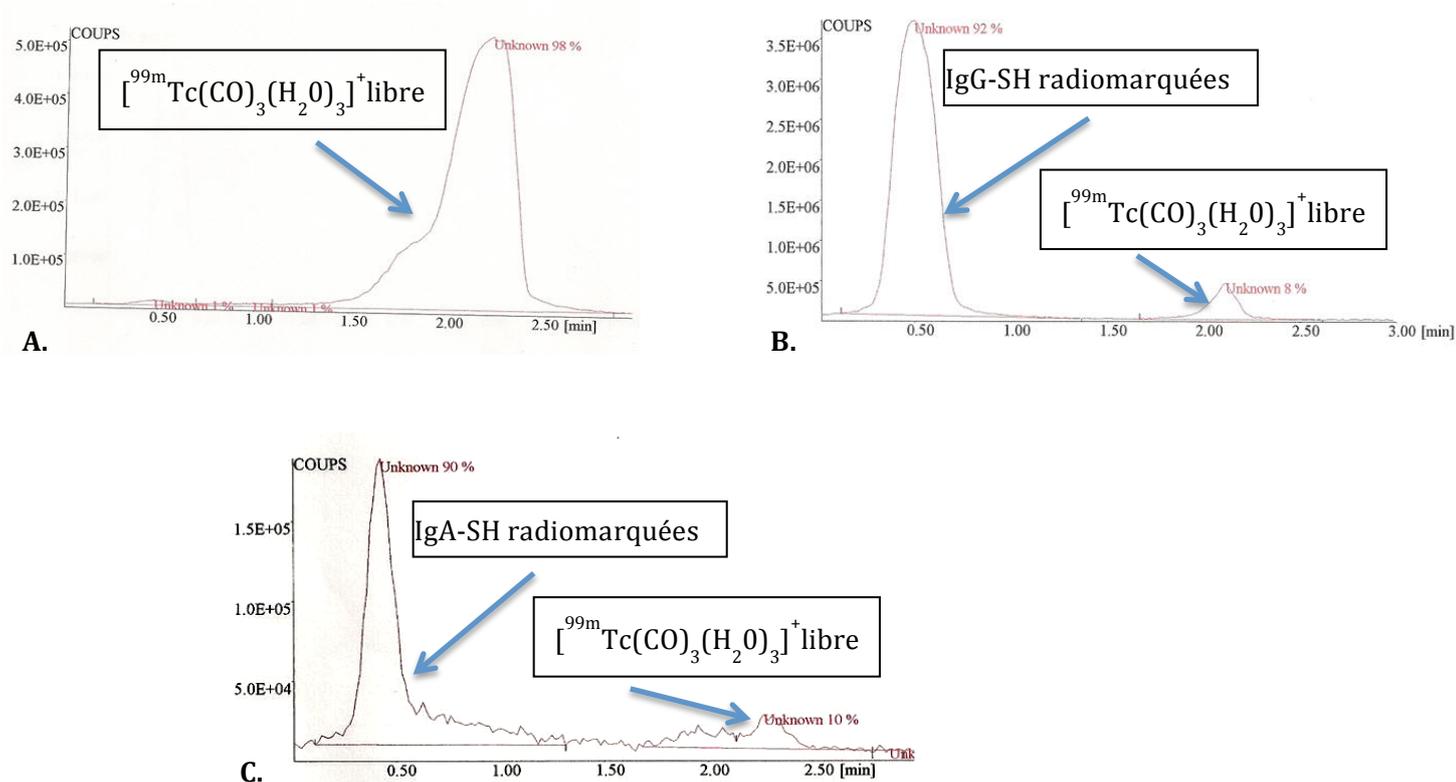


Figure 35 : Radiochromatogrammes sur support ITLC-SG en phase mobile NaCl 0,9%

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

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

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

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

4. Dosage des immunoglobulines avant et après radiomarquage

Des dosages des Ig par méthode ELISA ou BCA sont réalisés pour comparer les concentrations en Ac après marquage aux concentrations initiales.

a. Dosage par ELISA

ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est une technique immunologique destinée à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique. Il s'agit d'un immunodosage utilisant un marqueur enzymatique associé à un anticorps secondaire : le catabolisme du substrat approprié est mesuré par absorbance à 405 nm et est proportionnel à la quantité de complexes immuns (Antigène-Anticorps-Anticorps secondaire) formés. L'ELISA est une méthode dite en phase hétérogène car c'est une technique qui nécessite la séparation des complexes formés des entités non complexées.

Pour doser les Ig qui ont été greffées ou marquées, il a été utilisé un ELISA Sandwich avec un Ac de capture capable de lier spécifiquement les Ig recherchées.

- Coating de la plaque ELISA

Lors de cette opération, l'Ac de capture est mis à incuber à 4°C pendant une nuit dans les puits d'une microplaque « Maxisorb », ce qui permet sa fixation au plastique des puits par interaction électrostatique. La solution de coating composée de cet Ac primaire (10 µg/ml) et du tampon de fixation carbonate/bicarbonate pH 9,2 (2 plaques différentes sont coatées : 1 pour IgA et 1 pour IgG) est diluée au 1/1000 en PBS :

- Pour les IgA : Goat Anti-Human IgA UNLB (Unlabelled : non associé à une enzyme)
- Pour les IgG : Goat Anti-Human IgG UNLB

- Blocage des sites aspécifiques

Après élimination de la solution de coating, les sites de fixation non spécifiques sont bloqués avec 200 µl d'une solution composée de PBS 1x et gélatine 2%. La plaque est incubée pendant 1h à 37°C.

- Liaison de l'Ig à doser ou à détecter

Les échantillons d'Ig à tester (après dilution en PBS 1x-gélatine 0,2% si nécessaire) sont ensuite déposés dans les puits de la microplaque.

Une gamme est faite à partir d'un sérum dosé par néphélémétrie à 2,7 g/l d'IgA et à 9,1 g/l d'IgG. Une solution à 200 ng/ml constitue le premier point de gamme, puis est diluée de 2 en 2 (1,56 à 200 ng/ml). Des dilutions en série sont également effectuées sur les solutions d'Ac.

La plaque est mise à incuber pendant 2 h à 37°C.

- Liaison de l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline

Après lavages en PBS-Tween (0,1%) et PBS, dans chaque puits 100 µl d'Ac secondaire couplé à la phosphatase alcaline (-AP) sont ajoutés :

- Pour les IgA : solution Goat Anti-Human IgA-AP
- Pour les IgG : solution Goat Anti-Human IgG-AP

La solution d'Ac secondaire (1 mg/ml) est préalablement diluée au 1/1000 en PBS 1x-Gélatine 0,2%. La plaque est mise à incuber pendant 1h30 à 37°C.

- Révélation par le substrat de la phosphatase alcaline : le para-Nitrophényl Phosphate

Après lavages en PBS-Tween (0,1%) et PBS, dans chaque puits, 100µl de solution de révélation composée de pNPP : p-Nitrophényl Phosphate, substrat de la phosphatase alcaline, dosé à 1mg/ml final et de tampon TRIS à 0,2 M final.

La plaque est recouverte de papier aluminium (substrat sensible à la lumière) pendant la révélation qui dure environ 15-20 min. Celle-ci est stoppée par l'ajout de 30 µl de soude 3 M dans chaque puits.

- Détection par spectrophotométrie à 405 nm

La gamme ELISA (Figure 36) sera utilisée dans sa partie linéaire (les DO conservées seront celles inférieures à 1). Seules les DO des échantillons se trouvant dans la partie linéaire de la courbe seront utilisées, pour pouvoir extrapoler les résultats.

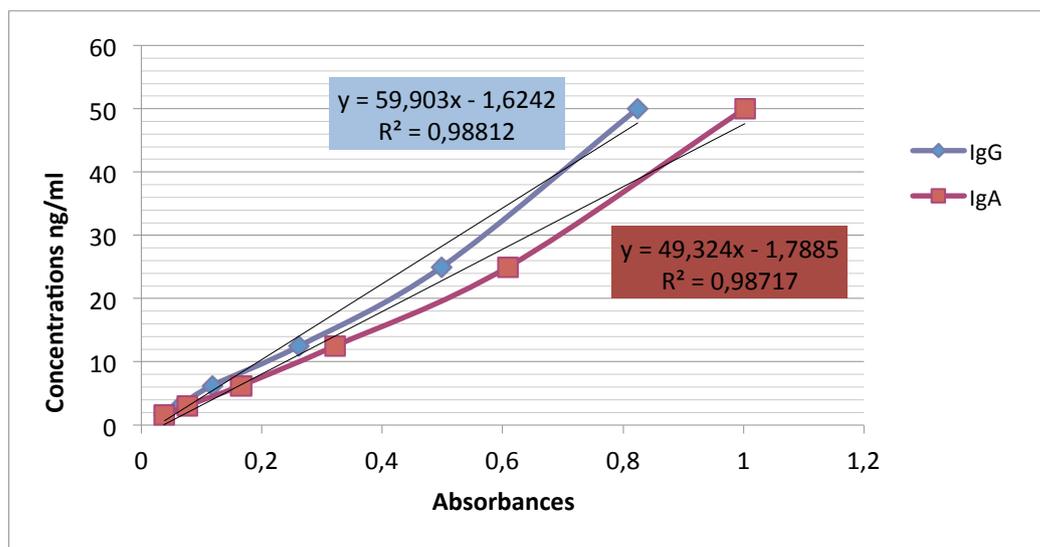


Figure 36 : Gammes ELISA utilisées pour doser les IgG et les IgA.

Les données correspondent aux gammes utilisées pour calculer la concentration (ng/ml) en IgG (◆) ou en IgA (■) en fonction de l'absorbance mesurée.

b. Dosage des protéines totales par BCA

La méthode BCA, ou BC Assay (BiCinchoninic Acid Assay), inventée par Paul Smith en 1985 est une alternative aux méthodes de dosage des protéines de Lowry et Bradford. Il s'agit d'un dosage colorimétrique des protéines, utilisant l'acide bicinchoninique. Celui-ci est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cuivre (I). En milieu alcalin, les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu(II) en ion cuivreux Cu(I), l'acide bicinchoninique va former un complexe pourpre possédant une absorption optimale à 562 nm. L'absorbance est alors proportionnelle à la concentration en protéines.

Pour réaliser un BCA, une gamme étalon d'albumine est effectuée allant de 2,5 µg/ml à 100 µg/ml à partir d'une solution de BSA : Bovine Serum Albumine à 1mg/ml.

- Les échantillons à doser sont dilués dans du PBS 1x si besoin.

- Les échantillons à doser et les différents points de gamme sont déposés dans les puits d'une plaque 96 puits (V=150 µl/puits).
- Le mélange de réactifs du kit c'est-à-dire 50% de micro reagent A (MA), 48% de MB et 2% de MC est ajouté (V=150 µl/puits).
- La plaque est incubée 2h à 37°C.
- La lecture des absorbances (violette) est réalisée à 562 nm.

Cette méthode de dosage des protéines totales est beaucoup plus rapide qu'un dosage ELISA mais moins spécifique. Elle a été cependant utilisée en routine car nous devons connaître la concentration des Ig radiomarquées pour les études *in vitro* que nous réalisons à la suite du radiomarquage.

B. Etude de la conservation des propriétés des immunoglobulines radiomarquées

1. Stabilité du radiomarquage

Après administration à l'animal, seule la radioactivité est détectée. Il est donc nécessaire de s'assurer que le radioélément artificiel reste fixé sur la protéine donc que la stabilité du radiomarquage est satisfaisante.

La stabilité sur 24h est évaluée par détermination de la PRC par CCM sur plaque ITLC gel de silice, et en solvant NaCl 0,9% (Figure 35). Elle est étudiée en PBS à +4°C et +25°C puis à 37°C en présence de plasma murin par dilution au 1/10^e des échantillons radiomarqués dans le plasma.

2. Intégrité des immunoglobulines radiomarquées par Western Blot

Le Western Blot est une technique de Biologie Moléculaire, permettant de séparer à l'aide d'un gel, les protéines en fonction de leur masse, celles-ci ayant été dénaturées (SDS-page : conditions dénaturantes) au préalable. Le dodécyl sulfate de sodium ou SDS est un détergent qui se fixe aux protéines. A pH 7, en présence de SDS 1% p/v et de 2-mercaptoéthanol, les protéines se dissocient en sous unités et fixent de grandes quantités de détergent. Dans ces conditions, la charge naturelle de la protéine est complètement masquée et lui donne une charge constante par unité de masse. Plus les molécules sont volumineuses, plus la charge est importante. La mobilité électrophorétique dépendant de la taille (masse moléculaire) de la protéine, plus la charge est grande moins la protéine migre.

a. Préparation des gels d'électrophorèse

Le polyacrylamide est le plus récent des supports utilisés pour l'électrophorèse et possède un effet de tamisage. La gamme de masses moléculaires pouvant être séparées sur un gel dépend de la taille des pores du gel (appelée réticulation), cette dernière peut donc être contrôlée. L'importance de la réticulation peut être modifiée simplement en faisant varier la quantité d'acrylamide. Le polyacrylamide est préparé par polymérisation d'acrylamide en présence d'une faible quantité d'agent de réticulation, le méthylènebisacrylamide, d'un catalyseur, le persulfate d'ammonium et d'un inducteur, le tétraméthylènediamine (TEMED). La taille des pores du gel peut être modifiée en faisant varier la concentration du monomère. Pour travailler sur ces Ac, il a été préparé à partir d'une solution mère à 30% de mélange acrylamide/bisacrylamide (37,5/1) le gel suivant :

- Resolving gel : gel de résolution 7%
- Stacking gel : gel de concentration 4%

La polymérisation du gel nécessite plusieurs heures, et il doit être préparé la veille de l'électrophorèse. Lors de la polymérisation, des puits pour déposer les échantillons seront formés à l'aide d'un « peigne ».

b. Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés à partir des Ig auxquelles des groupements thiol ont été greffés et à partir des Ig marquées radioactivement. Du tampon de charge (dithiothreitol, bleu de bromophénol et beta-mercaptoéthanol) est ajouté, pour dénaturer les protéines, et du PBS si besoin (si dilution nécessaire).

c. Electrophorèse sur gel

Les échantillons sont déposés un par un dans les "puits" formés dans le gel, à raison de 1,5 à 25 µg de protéine par puits. Le générateur de courant est connecté : 200 Volts, 250 Ampères. La migration se fera pendant 1h. Les protéines vont traverser le gel du haut vers le bas et sont séparées par masse en "bandes" dans chaque "couloir" formé sous les puits. Un puits est réservé à un "marqueur" ou "échelle standard", mixture de protéines possédant des poids moléculaires définis disponibles dans le commerce.

d. Transfert sur membrane

Une détection directe des protéines sur le gel est possible par coloration au Bleu de Coomassie. Pour une détection par hybridation primaire à l'aide d'un Ac, il est nécessaire de transférer les

protéines depuis le gel sur une membrane de PVDF. Après la migration, le gel est démoulé, rincé en tampon de transfert 1X et coupé si deux types d'Ig doivent être détectés. En parallèle, une membrane de PVDF (de la taille du gel) est régénérée en méthanol pendant 10 secondes puis ensuite rincée en tampon de transfert. Sur l'appareil de transfert (après humidification des plaques par du tampon de transfert) seront déposés le gel d'électrophorèse et la membrane de PVDF entourés de papiers Whatman.

Le transfert est lancé en branchant les 2 électrodes avec 1 courant et 1 voltage qui dépendent de la surface de la membrane (0,8 Volts/cm²) pendant 2 h.

e. Blocage des sites aspécifiques

La membrane est saturée pendant 1h avec du PBS-lait 5% pour éviter des hybridations aspécifiques.

f. Détection par hybridation primaire

Celle-ci se fait à l'aide d'anticorps Goat Anti-Human IgA ou IgG HRP (anticorps marqué par une enzyme : la Horse Raddish Peroxydase) en incubant pendant 1h.

La révélation est faite en utilisant le substrat de l'enzyme qui est mise à incuber avec la membrane pendant un temps dépendant de la protéine : Chemiluminescent HRP substrate par Chimiluminescence. Le catabolisme du substrat émet de la lumière après exposition au déclencheur présent sur l'Ac primaire. La lumière émise sert à impressionner un film photographique, ou plus récemment, est détectée par des caméras dites CCD qui restituent une image numérique du transfert de Western.

3. Immunoaffinité des immunoglobulines radiomarquées

La solution d'Ig après radiomarquage peut être considérée comme un mélange d'Ig « froide », non radiomarquée et d'Ig radiomarquée. En effet, seulement 2 à 4% des Ig sont radiomarquées au ^{99m}Tc dans l'échantillon. Il est donc intéressant de déterminer l'affinité de l'Ig radiomarquée en étudiant l'immunoaffinité par comptage de radioactivité. Pour cela, nous avons mis au point deux méthodes d'évaluation de l'immunoaffinité, une dite « sur plaque » et une « sur cellules » se rapprochant du modèle *in vivo*. Ces techniques permettent de déterminer des paramètres caractéristiques des Ac radiomarqués : le pourcentage de fixation de l'Ac radiomarqué, la constante de dissociation (Kd), le nombre total d'Ag Bmax en nmol/l. Ces paramètres sont déterminants pour les applications *in vivo* futures, car une fraction d'Ac radiomarqués non

réactifs entraîne des problèmes en terme de bruit de fond en diagnostic et d'irradiation inutile en thérapie.

a. Immunoaffinité des immunoglobulines radiomarquées sur plaques

L'immunoaffinité sur plaque est une méthode dérivée d'un ELISA classique. L'immunoaffinité sur plaque doit permettre de comparer l'affinité de l'Ac radiomarqué à l'affinité de l'Ac froid avant radiomarquage.

- Coating de la plaque ELISA

Les puits d'une microplaque « Maxisorb » ou « Immulon » à puits amovible sont tapissés avec l'antigène cible (ACE ou CD20). La solution d'Ag (CD20 à 10 mg/ml et ACE à 1 mg/ml) est diluée au 1/1000 dans du PBS pour coater la plaque. Cette dernière sera mise à incuber à 4°C pendant une nuit.

- Blocage des sites aspécifiques avec le même protocole que précédemment (II. A. 4.a)

- Liaison de l'anticorps radiomarqué ou non

Les échantillons à tester (après dilution en PBS 1x-Gélatine 0,2%) sont déposés dans les puits de la première ligne de la microplaque. Un Ac spécifique et un Ac irrelevant sont généralement utilisés :

- Pour les IgG : Ac spécifique = IgG anti-CD20 et Ac irrelevant = IgG anti-EGFR
- Pour les IgA : Ac spécifique = IgA anti-ACE et Ac irrelevant = IgA anti-ARA

Plusieurs conditions pour chaque Ac ont été étudiées :

- La mesure de la liaison totale : Ac radiomarqué en PBS 1x-Gélatine 0,2% seulement (2 séries)
- La mesure de la liaison non spécifique : saturation des sites spécifiques (Ag cible) par l'Ac froid. L'Ac radiomarqué est incubé avec une solution contenant l'Ac froid à concentration finale de 500 µg/ml
- L'Ac non radiomarqué dilué en PBS 1x-Gélatine 0,2% seulement pour déterminer une perte d'affinité éventuelle par rapport à la molécule de départ.

Des dilutions sériées sont ensuite effectuées.

La plaque est mise à incuber pendant 2h à 37°C.

Des lavages en PBS-Tween (0,1%) et un lavage en PBS 1x sont effectués.

- Comptage de la radioactivité

Les puits concernés (une série d'Ac radiomarqué incubée en PBS-gélatine et une série d'Ac radiomarqué incubée avec l'Ac froid) sont détachés de la plaque 96 puits et sont insérés dans des tubes à hémolyse.

La radioactivité retenue dans les puits est déterminée à l'aide du compteur gamma :

Mesure de la liaison totale : radioactivité dans les tubes en l'absence d'Ac froid

Mesure de la liaison non spécifique : radioactivité dans les tubes en présence d'Ac froid

- Liaison de l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline

Les puits concernés sont les puits contenant l'Ac radiomarqué en PBS-gélatine et ceux contenant l'Ac de départ. Dans chaque puits 100 µl d'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (-AP) sont ajoutés, de la même façon que pour un ELISA classique.

- Révélation par le substrat de la phosphatase alcaline : le para-Nitrophényl Phosphate

- Détection par spectrophotométrie à 405 nm et analyse des résultats. L'immunoaffinité sur plaque nous a permis d'avoir une première idée du Kd et du Bmax et du pourcentage de fixation de l'Ac radiomarqué. Les résultats trouvés par cette méthode sont confirmés par la technique d'immunoaffinité sur cellules que nous décrivons dans le prochain paragraphe. Les outils de calcul du Kd seront décrits dans ce paragraphe.

b. Immunoaffinité des immunoglobulines radiomarquées sur cellules

Il s'agit de méthodes de RadioImmunoAssay (RIA) décrites par Lindmo et al. en 1984 (Lindmo, 1984) et Lindmo et Bunn en 1986 (Lindmo et Bunn, 1986) utilisant des cellules exprimant un antigène de surface cellulaire. Dans ces expériences, un excès d'Ag est supposé, pour considérer que la concentration en Ag libre se rapproche de la concentration totale de l'Ag.

i. Culture et préparation des cellules exprimant ou non l'Ag de surface à cibler

Les cellules EL4 CD20 et EL4 WT sont cultivées dans un milieu composé de DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium) High Glucose tamponné en HEPES, de sérum de veau fœtal, d'acides aminés non essentiels, de pyruvate de sodium, de pénicilline-streptomycine et de béta-mercaptoéthanol. Le milieu de culture des EL4 CD20 contient également de la néomycine nécessaire au maintien de la transfection de ces cellules. L'expression de l'antigène CD20 est régulièrement vérifiée par cytométrie en flux.

Les cellules WiDr sont cultivées dans un milieu composé de MEM + Earles + L-Glutamine, de sérum de veau fœtal, d'acides aminés non essentiels, de pyruvate de sodium, et de pénicilline-streptomycine. Les cellules DLD1 sont cultivées dans un milieu composé de RPMI + Glutamax et des mêmes réactifs que le milieu précédent.

→ Un culot de cellules de chaque lignée cellulaire est obtenu après centrifugation. Il est dans 1 ml de PBS. Généralement, nous travaillons sur 2 lignées cellulaires : 1 positive pour l'Ag cible et 1 négative.

→ Le nombre de cellules par millilitre est estimé par comptage sur lame de Malassez après dilution au 1/100 des cellules dans du Bleu Trypan.

→ Chaque lignée cellulaire est diluée dans du PBS-BSA 3% afin de bloquer les sites aspécifiques présents sur les cellules.

Selon l'antigénicité de l'Ig, plusieurs lignées cellulaires ont été testées (Table 14).

Ig étudiées	IgG anti-CD20	IgA anti-ACE
Cellules présentant l'Ag	EL4 CD20	WiDr
Cellules sauvages	EL4 WT	DLD1
Ig irrelevant	IgG anti-EGFR	IgA anti-ARA

Table 14 : Lignées cellulaires testées en fonction des Ig étudiées.

ii. Détermination de la fraction immunoréactive (IRF)

L'IRF représente la fraction d'Ac capable de se lier à l'antigène. Elle est déterminée en incubant des quantités croissantes d'antigènes (donc de cellules) avec une quantité fixe d'Ac. Une saturation de la fixation apparaît lorsqu'il y a suffisamment d'antigènes pour que l'ensemble des Ac capables de reconnaître l'antigène se soit fixé.

- Préparation des dilutions de cellules exprimant ou non l'Ag de surface à cibler

→ Chaque lignée cellulaire est diluée en série dans du PBS-BSA 3% en commençant à 3 millions de cellules et en poursuivant jusqu'à 62 500 cellules dans un volume de 250 µl. Chaque tube Eppendorf devra contenir : 250 µl de la dilution de cellules concernée.

→ Pour chaque lignée cellulaire, 2 conditions sont nécessaires afin d'obtenir :

- La mesure de la liaison totale : cellules en PBS-BSA 3% seulement

- La mesure de la liaison non spécifique : saturation des sites spécifiques (Ag cible) par le ligand (l'Ac) froid. Ces cellules sont incubées préalablement avec l'Ac froid pendant 1h à température ambiante sous agitation lente. La concentration finale en anticorps froid est de 100 µg/ml. Cette concentration est déterminée en utilisant des concentrations croissantes d'Ac froid à concentrations constantes en cellules et en Ac radioactif.

- Préparation de la ou des solutions d'anticorps radiomarqués
 - Les Ac choisis sont généralement : un Ac spécifique et un Ac irrelevant.
 - La concentration en mg/ml des solutions d'Ac radiomarqué est déterminée par BCA.
 - Les solutions d'Ac radiomarqué sont préparées en PBS-BSA 3% à deux concentrations : 40 ng/ml ou 800 ng/ml. Chaque tube Eppendorf devra contenir : 125 µl de la solution concernée.

- Liaison de l'Ac radiomarqué
 - Les tubes Eppendorf sont préalablement saturés avec 500 µl de PBS-BSA 3% pendant 1h30 à température ambiante sous agitation lente.
 - Les dilutions de cellules et les solutions d'Ac sont incubées en tube Eppendorf pendant 2h à température ambiante sous agitation lente. Chaque tube Eppendorf doit contenir : 250 µl de dilution de cellules + 125 µl de solution d'Ac.

- Séparation de la fraction libre et de la fraction liée
 - Les filtres Millipore sont préalablement saturés avec du PBS-BSA 3% pendant 2h à température ambiante sous agitation lente,
 - Le contenu de chaque tube Eppendorf est filtré à l'aide du Manifold, avec un rincage par 5 ml de PBS 1x,
 - Les filtres sont déposés dans des tubes à hémolyse.

- Comptage de la radioactivité
 - La radioactivité retenue sur les filtres contenus dans les tubes à hémolyse est déterminée à l'aide du compteur gamma :
 - Mesure de la liaison totale : radioactivité dans les tubes en l'absence d'Ac froid
 - Mesure de la liaison non spécifique : radioactivité dans les tubes en présence d'Ac froid
 - Pour chaque Ac : comptage de chaque point de dilution ajouté aux tubes Eppendorf

- Analyse des résultats
 - Les 3 types de liaison sont déterminés de la même manière que dans le protocole précédent.

→ Les représentations graphiques suivantes sont tracées :

- $BS/T = f(\text{Concentration en cellules})$
- $T/BS = f(1/\text{Concentration en cellules})$

Avec :

[LT] : concentration totale en ligand ajoutée : T

BS : fixation spécifique déduite par soustraction

Concentration en cellules : exprimée en million/ml

→ L'IRF est déduite du deuxième graphique par extrapolation, il s'agit de l'inverse de l'ordonnée à l'origine.

iii. Etude de Binding et détermination de la constante de dissociation (Kd)

Des expériences de saturation ont été conduites en se référant aux travaux de Lindmo (Lindmo, 1984). Ces études consistent à augmenter la quantité d'Ac radiomarqué en conservant une quantité fixe de cellules, en présence ou non d'Ac froid. Ces expériences de saturation permettent de mesurer le taux de fixation spécifique du radioligand d'intérêt (Ac radiomarqué) à l'équilibre en augmentant sa concentration. En mesurant le taux de radioactivité nécessaire pour saturer les sites antigéniques (présents à la surface des cellules), ces expériences sont utilisées pour déterminer le Kd et le nombre total de récepteurs Bmax exprimés sur les cellules (Bigott-Hennkens, 2008). Le Kd et le Bmax sont deux paramètres dépendants de l'IRF de l'Ac radiomarqués.

- Préparation des cellules exprimant ou non l'Ag de surface à cibler

→ Au final, chaque tube Eppendorf devra contenir : 1 million de cellules dans un volume de 250 μ l.

→ Pour chaque lignée cellulaire, 2 conditions sont nécessaires afin d'obtenir :

- La mesure de la liaison totale : cellules en PBS-BSA 3% seulement
- La mesure de la liaison non spécifique : saturation des sites spécifiques par l'Ac froid.

Ces cellules sont incubées préalablement comme précédemment.

- Préparation du ou des ligands (ici anticorps) radiomarqués

→ Les Ac choisis sont : un Ac spécifique et un Ac irrelevant

→ La concentration en mg/ml des solutions d'Ac radiomarqué est déterminée par BCA.

→ Les solutions d'Ac radiomarqué sont diluées en série en PBS-BSA 3%, en commençant à 30 μ g/ml. Chaque tube Eppendorf devra contenir : 125 μ l de la dilution concernée.

- Liaison de l'Ac radiomarqué

→ Les mêmes incubations que celles décrites précédemment sont appliquées.

→ Dans ce cas, chaque tube Eppendorf doit contenir : 250 µl de cellules + 125 µl de dilution d'Ac.

- Séparation de la fraction libre et de la fraction liée et comptage de la radioactivité

→ Le même protocole que celui décrit précédemment a été effectué.

- Analyse des résultats

→ La liaison spécifique est déduite par soustraction de la liaison non spécifique à la liaison totale

→ Les 3 types de liaison sont représentés graphiquement par $B = f(T)$

→ La représentation graphique $BS/F = f(BS)$ selon Scatchard est effectuée s'il y a lieu. Cette linéarisation des données obtenues expérimentalement permet de déduire le K_d (reflet de l'affinité du récepteur pour son ligand). L'équation de la droite de type $y = ax+b$ est calculée par régression linéaire, elle permet de déduire $a = -1/K_d$ donc $K_d = -1/a$ et B_{max} est le point à « l'intersection de la droite avec l'axe des abscisses ».

Avec :

[LT] : concentration totale en ligand ajoutée : T

[L] : concentration en ligand libre : F ou Free

[LR] : concentration en récepteurs occupés par le ligand : B ou Bound (fraction mesurée grâce à la liaison totale). B_{max} est la capacité maximale de liaison, elle s'exprime en nombre de sites de liaison/cellules en nM.

$$B = BNS + BS$$

BNS : fixation non spécifique mesurée

BS : fixation spécifique déduite

Chapitre 3 : Résultats et discussion

I. Mise au point du radiomarquage des Immunoglobulines G et A

Les IgA étant difficiles à produire en quantité importante, les techniques ont à chaque fois été mises au point et optimisées sur les IgG avant d'être transposées sur les IgA, de structure voisine, mais présentant des caractéristiques différentes, comme leur niveau de glycosylation qui pourrait gêner le radiomarquage. Des concentrations minimales ont été privilégiées, afin de limiter les quantités d'IgA consommées et d'éviter leur précipitation qui apparaît au-delà de 2 mg/ml.

A. Radiomarquage de l'Isolink® avec du pertechnétate de sodium [$\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$]

Les conditions optimales de préparation du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Isolink® ont été affinées au fur et à mesure des marquages, à partir des résultats de PRC déterminées par CCM. En particulier, une solution de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ élue depuis moins de 2h et provenant d'un générateur ayant été élué dans les 24h a été toujours utilisée. En effet, des radiomarquages réalisés avec des éluations de générateurs qui n'avaient pas été élués depuis 48h (week-end) ont montré une diminution importante des rendements de marquage (de l'ordre de 40%).

Une activité minimale de 2220 MBq (60 mCi) a été utilisée pour chaque marquage, des activités inférieures ayant donné des rendements inférieurs à 90%. De plus, il était primordial d'avoir ensuite pour le radiomarquage des Ig une activité volumique importante et donc un volume réactionnel minimal, ce volume étant un facteur critique comme nous le verrons.

Avec ces conditions, les rendements de marquage du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Isolink® étaient en moyenne de $98,8\% \pm 1,6\%$. Ces PRC sont de l'ordre de celles retrouvées par Satpati et al. lorsqu'ils comparent les réactions de radiomarquage effectuées à partir du kit d'Isolink® ou par la méthode de synthèse conventionnelle du cœur tricarbonyl (Satpati, 2004).

B. Radiomarquage des immunoglobulines G

- Les premiers essais de radiomarquage ont été réalisés, pour l'étape de fonctionnalisation des Ig, en conservant la concentration en 2-IT et la quantité d'IgG utilisées par Biechlin et al. ([2-IT] = 0,062M, 3,2 nmol d'Ig dans un volume de 150 μl incubé avec 10 μl de 2-IT) et un temps d'incubation de 2h, Biechlin et al. ayant montré que cette durée permettait d'obtenir le meilleur taux de fixation de groupe SH sur les Ig (Biechlin, 2005).

Afin d'optimiser les conditions de marquage tout en tenant compte des particularités des IgA, nous avons voulu :

- modifier le tampon de marquage utilisé. En effet, dans les travaux de Biechlin et al., la dérivation est effectuée en tampon NaH_2PO_4 et en présence de DMSO. Or les IgA sont conservées et sont stables en tampon PBS, alors que le DMSO pourrait les altérer. Nous avons transposé le greffage des groupes thiol en PBS.
- utiliser pour l'étape d'élimination du 2-IT des filtres Amicon 4 ou 15 ml permettant de préserver un volume de 300 μl à 1 ml et donc une concentration $< 2 \text{ mg/ml}$ nécessaire aux IgA (au lieu de Microcon d'1,5 ml aboutissant à des volumes de l'ordre de 10 μl).

• L'efficacité du greffage par le 2-IT a été évaluée par dosage des groupements SH (table 15). Nous constatons que, pour les IgG incubées en présence de 2-IT, des groupements SH sont quantifiés, alors que pour les IgG seules, aucun groupement SH n'est détecté. L'incubation avec le 2-IT permet donc bien une fonctionnalisation des protéines par des groupements SH. Cette fixation représente 3,06 nmol de SH dans l'échantillon, alors que nous avons mis à incuber 3,12 nmol d'IgG. Nous pouvons en déduire qu'en moyenne, il y a au moins un groupement SH fixé par IgG, la détermination exacte de ce ratio de fixation nécessite toutefois de doser la quantité d'Ig après purification.

Nous observons que le changement de tampon n'entraîne pas de différence de quantité de groupements SH greffés.

De plus, la réalisation d'un contrôle avec le 2-IT seul, montre l'absence de groupement SH dans le surnageant. La méthode de lavage avec les filtres Amicon permet donc une élimination efficace du 2-IT non greffé des échantillons d'Ig fonctionnalisés.

Nous avons travaillé par la suite en PBS et avec des filtres Amicon.

Echantillon	Concentration en groupements SH (μM)	
	Tampon NaH_2PO_4	Tampon PBS
IgG (n = 3,12 nmol) + 2-IT	8,5	7,87
2-IT	< LQ	< LQ
IgG (n = 3,12 nmol)	< LQ	< LQ

Table 15 : Comparaison des concentrations en groupements SH fixés sur les IgG en tampon NaH_2PO_4 et en tampon PBS. La LQ (Limite de Quantification) = 2,5 μM .

Dans ces conditions de fonctionnalisation des IgG, le radiomarquage des Ig-SH a ensuite été réalisé, en se basant sur les travaux de Biechlin (Biechlin, 2005) : Ig-SH (3,2 nmol) avec 148 MBq (4 mCi) d'Isolink® radiomarqué. Selon les auteurs, le rendement de marquage est plus important

à 37°C qu'à 25°C. Cependant, les IgA se conservant mieux à température ambiante, nous avons choisi de réaliser le marquage à 25°C afin de pouvoir transposer facilement le marquage aux IgA. Pour pallier à cette limite, le rendement s'améliorant en fonction du temps (30, 60 et 90 minutes), un temps d'incubation de 120 minutes a été choisi.

Les rendements de marquage obtenus dans ces conditions sont supérieurs à 95%, comparables à ceux obtenus par Biechlin et al.

- Le nombre de moles pouvant être utilisé pour le marquage avec les IgA étant plus faible que celui utilisé dans les travaux de Biechlin en IgG, nous avons étudié les rendements obtenus en fonction du nombre de moles d'IgG et de la quantité de groupements thiol greffés.

Les différents radiomarquages réalisés dans les conditions décrites précédemment mais avec des quantités décroissantes d'IgG montrent que lorsque le nombre de moles d'IgG à incuber diminue, la PRC diminue, et en particulier devient inférieure à 90% lorsque le nombre de moles est inférieur à 1- 1,2 nmol (Figure 37).

En parallèle, des radiomarquages ont été réalisés sur les IgG non fonctionnalisées et montrent que pour une quantité identique d'IgG, les rendements de marquage sont très supérieurs pour les IgG-SH (A 1 nmol : avec 2-IT PRC = 86% et sans 2-IT PRC = 45% / A 0,5 nmol : avec 2-IT PRC = 70% et sans 2-IT PRC = 20%). Sans fonctionnalisation, pour obtenir des rendements de radiomarquage de l'ordre de 90%, des quantités d'IgG supérieures à 4 nmol sont nécessaires. Ce résultat nous confirme la nécessité de greffer des groupements thiol, en particulier pour le radiomarquage des IgA, puisque nous souhaitons obtenir de bons rendements de marquage avec un nombre de moles d'Ig réduit. Les IgG anti-CD20 provenant de la spécialité Mabthera®, il est décrit dans la littérature qu'elles possèdent 26 résidus histidine, sur lesquels le radiomarquage pourrait intervenir. Seulement, comme expliqué par Dias et al., ces résidus ne sont pas accessibles au cœur tricarboxyl, ce qui limite le radiomarquage sans modifier la structure des Ig, c'est à dire sans faire apparaître des groupements thiol libres.

Pour un nombre de moles donné, nous constatons des variations de PRC assez importantes, de l'ordre de 10%. Il paraît intéressant de représenter les PRC obtenues lors de ces différents marquages en fonction du nombre de groupements SH (Figure 38). Nous observons une bonne corrélation entre ces deux paramètres, qui est même supérieure à celle entre la PRC et le nombre de moles d'IgG, montrant l'importance du greffage dans les rendements.

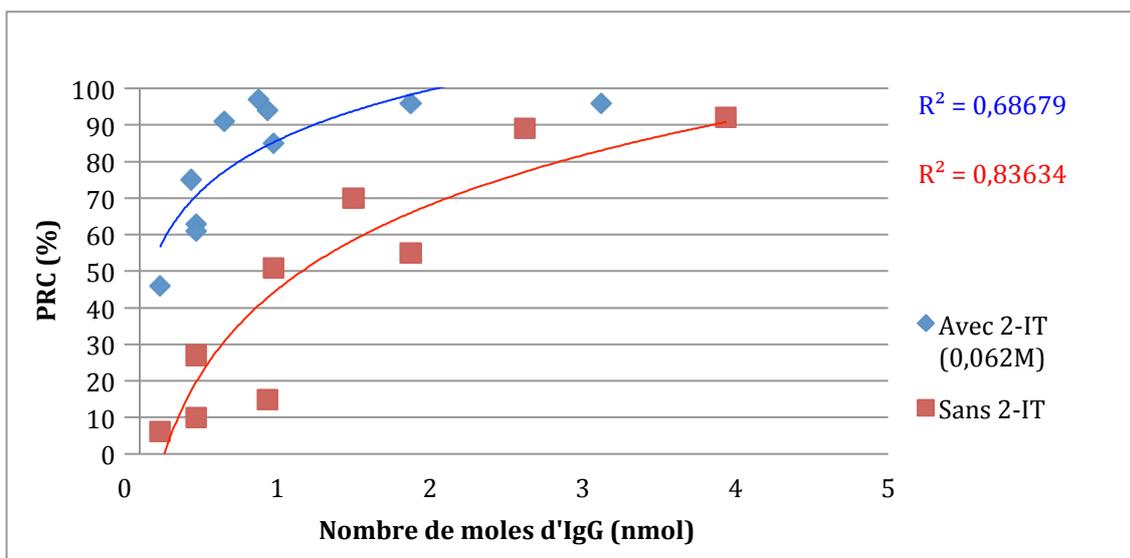


Figure 37 : Rendements des radiomarquages des IgG en fonction du nombre de moles d'IgG et de la greffe ou non de groupements thiol.

- ◆ : Représente les PRC des radiomarquages des IgG en présence de 2-IT
- : Représente les PRC des radiomarquages des IgG en absence de 2-IT

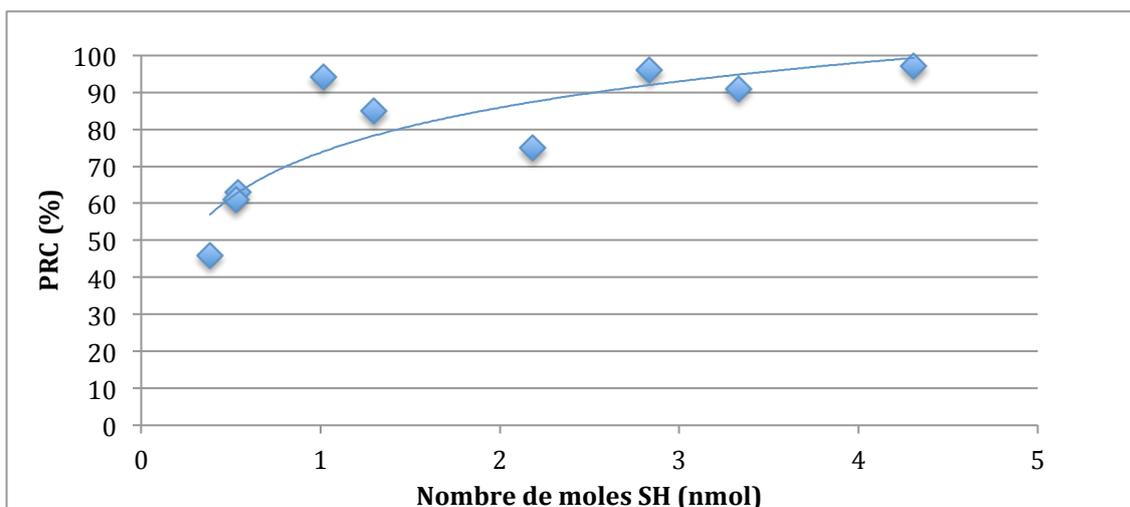


Figure 38 : Rendements de radiomarquage des IgG en fonction du nombre de moles de groupes thiol fixés

- ◆ : Représente les PRC en fonction du nombre de moles de SH des radiomarquages des IgG en présence de 2-IT

Ces résultats nous ont amenés à étudier l'effet d'une augmentation de la concentration en 2-IT sur les PRC. Trois concentrations ont été testées (0,062 M, 0,31 M, 0,62 M). Plus la concentration en 2-IT augmente, plus le nombre de moles de SH dans l'échantillon augmente (Table 16). Cet effet est observé aux deux concentrations en IgG testées et est associé à une augmentation des PRC (Figure 39) : à 0,5 nmol d'IgG, PRC de 10,7%, 38,7% et 64,7% en moyenne pour les

concentrations à 0,062 M, 0,31 M, 0,62 M, respectivement et à 1 nmol d'IgG, PRC de 49,3%, 57,0% et 86,0% pour les mêmes concentrations.

Concentration en 2-Iminothiolane	Nombre de moles SH fixées (nmol)	
	IgG 0,5 nmol	IgG 1 nmol
0,062 M	1,0	1,7
0,31 M	1,7	4,3
0,62 M	3,0	8,0

Table 16 : Rapport du nombre de moles de SH fixés sur le nombre de moles d'Ig en fonction de la concentration en 2-IT

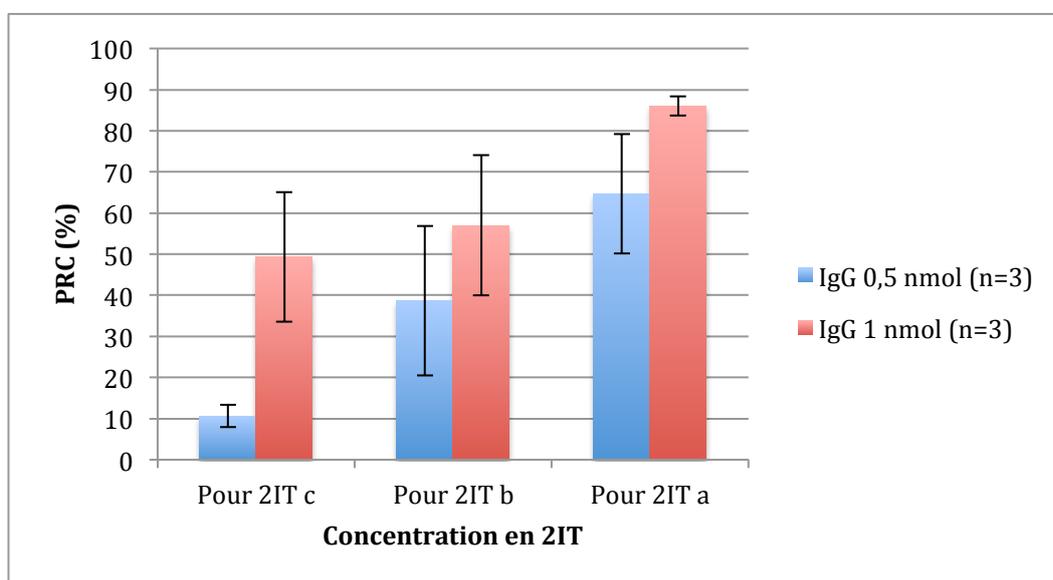


Figure 39 : Rendements des radiomarquages d'IgG avec 3 concentrations de 2-IT.

La concentration c est celle à 0,062 M, la concentration b à 0,31 M et la concentration a à 0,62 M.

Il est à noter que dans ces expériences, plus la concentration en 2-IT était importante, plus les volumes réactionnels après l'étape de purification étaient conséquents. Pour pouvoir comparer les différentes conditions, les volumes réactionnels ont tous été réajustés au volume le plus grand, augmentant ainsi d'un facteur 3 le volume réactionnel par rapport aux conditions des marquages présentés à la figure 38. Pour 0,5 et 1 nmol d'IgG à la concentration en 2-IT de 0,062 M, nous avons ainsi obtenu des PRC beaucoup plus faibles que celles obtenues dans la figure 38 (A 0,5 nmol PRC = 9% au lieu de 60% et à 1 nmol 54% au lieu de 90%). Le volume réactionnel est apparu comme un paramètre essentiel conditionnant la PRC : plus les volumes réactionnels sont petits, meilleurs sont les rendements à conditions équivalentes.

Ces résultats montrent qu'une augmentation de la concentration en 2-IT pourrait faciliter le radiomarquage des IgA en limitant le nombre de moles d'IgA utilisée.

Les optimisations de radiomarquage des IgG réalisées permettent d'obtenir de très bons rendements de marquage pour les IgG, mais également de se placer dans des conditions qui devraient être transposables pour les IgA tout en tenant compte de leurs particularités.

C. Radiomarquage des immunoglobulines A

En tenant compte des optimisations réalisées (tampon PBS, filtres Amicon, importance du nombre de SH) et de la quantité critique de 1 nmol d'IgG en-dessous de laquelle la PRC devient <90%, nous avons réalisé les premiers radiomarquages des IgA avec les trois concentrations de 2-IT précédemment étudiées et une quantité de 0,75 nmol d'IgA. En effet, les IgA, dont nous disposons comportant un mélange d'IgA monomériques et dimériques 50/50, cette quantité équivaut donc à une quantité d'Ig de 1 nmol.

Le dosage des groupements SH dans ces conditions a montré des fixations faibles : 0,4 ; 0,5 et 0,6 nmol pour les concentrations en 2-IT de 0,062 ; 0,31 et 0,62 M respectivement. Ces taux de SH fixés sont très inférieurs à ceux observés pour une quantité d'IgG équivalente (Table 16) :

à [2-IT] = 0,062 M, on obtient 0,4 et 1,7 nmol, respectivement pour les IgA et les IgG.

Les rendements de marquage retrouvés sont en accord avec ces résultats (Figure 40) : à [2-IT] = 0,062 M, un rendement inférieur à 40% est obtenu alors qu'à quantité équivalente en IgG, une PRC supérieure à 90% est attendue. Nous pouvons noter toutefois que l'augmentation des concentrations en 2-IT améliore sensiblement la PRC, même si la différence n'est pas statistiquement significative.

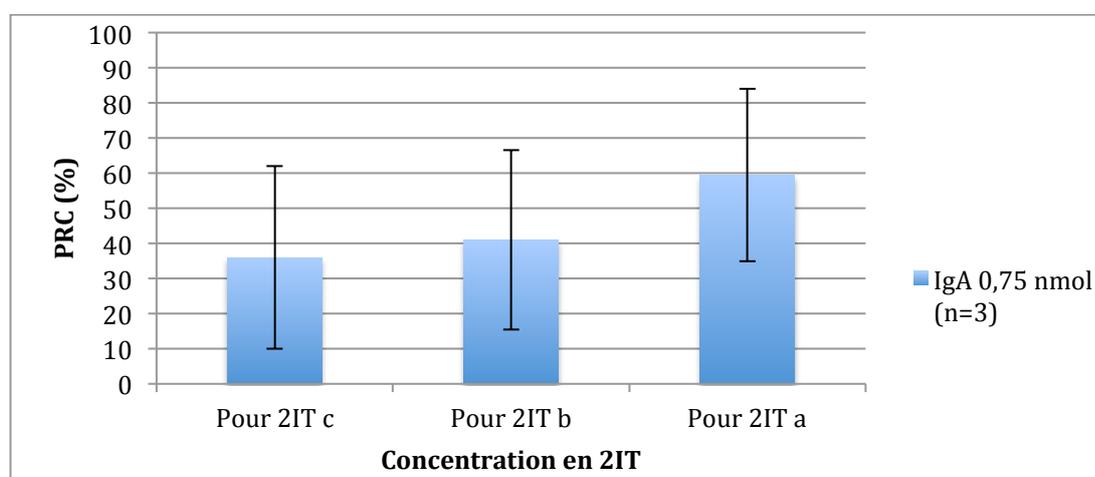


Figure 40 : Rendements des radiomarquages d'IgA avec 3 concentrations de 2-IT.

La concentration c est celle à 0,062 M, la concentration b à 0,31 M et la concentration a à 0,62 M.

Ces différences de résultats entre les 2 isotypes pourraient être dues à la plus grande fragilité des IgA. Pour s'assurer qu'elles ne sont pas dégradées au cours du marquage, et en particulier lors de l'étape de fonctionnalisation qui est l'étape la plus susceptible d'endommager les molécules, nous avons réalisé des dosages protéiques par ELISA. Les échantillons d'IgG et d'IgA lavés après incubation avec le 2-IT (aux 3 concentrations étudiées) ont été dosés (Table 17). Il apparaît qu'après lavage, seule une petite fraction d'Ig est retrouvée. Cette perte est d'autant plus importante que la concentration en 2-IT est élevée. Alors que la perte est de 33% pour les IgG en l'absence de 2-IT, elle est supérieure à 80% en présence de 2-IT. Cette perte est encore plus importante pour les IgA : 78% en l'absence de 2-IT et > 95% en présence de 2-IT.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette perte d'Ig :

- Masquage des paratopes reconnus par l'Ac secondaire, dû au traitement par 2-IT
- Fragmentation des Ig
- Adsorption des Ig greffées SH aux tubes et aux Amicon

Conditions de fonctionnalisation	Concentration théorique après purification (µg/ml)	Dosage des Ig en ELISA (µg/ml)	Dosage des protéines totales (µg/ml)
IgG 1 nmol	211		
[2-IT]=0,62M		6	10
[2-IT]=0,31M		7	26
[2-IT]=0,062M		34	63
Sans 2-IT		140	160
IgG 2 nmol	239		
[2-IT]=0,62M		12	42
[2-IT]=0,31M		25	49
[2-IT]=0,062M		78	109
IgA 0,75 nmol	366		
[2-IT]=0,62M		< LQ	< LQ
[2-IT]=0,31M		1,8	< LQ
[2-IT]=0,062M		14,6	25
Sans 2-IT		84	91

Table 17 : Comparaison des concentrations d'Ig obtenues par 2 méthodes : ELISA et dosage des protéines totales, avec la concentration théorique après traitement ou non par 2-IT.

Le dosage des protéines totales a une limite de quantification LQ de 2,5 µg/l et l'ELISA de 1,5 µg/l

Pour répondre plus précisément sur l'origine de cette perte, nous avons réalisé des dosages de protéines totales et des Western-Blots sur ces échantillons. La diminution observée de quantité d'Ig est retrouvée en BCA et comparable à celle observée en ELISA, qui semble toutefois, donner des concentrations légèrement inférieures à celles du BCA (Table 17). Il est difficile de savoir si cette différence est en partie due à un masquage des paratopes par le greffage de SH, puisque une différence est aussi retrouvée pour les Ig non greffées. Cette perte est également confirmée en Western-Blot où le signal retrouvé est très faible, avec néanmoins une absence de dégradation en chaînes légères.

Ces résultats montrent que la perte observée pourrait principalement être due à une forte adsorption des Ig aux différents supports utilisés (tubes réactionnels, filtres Amicon). Cette perte est plus importante pour les Ig-SH. L'hypothèse la plus probable est que le changement induit par le greffage des groupements SH modifie la charge des Ig qui s'adsorbent d'autant plus qu'il y a de groupes thiol fixés sur l'Ig. Cette hypothèse pourrait aussi expliquer les différences de volumes observés pour des concentrations importantes de 2-IT, les filtres devant se colmater d'autant plus que l'adsorption est importante.

Au vu de ces résultats, des mesures ont été prises concernant les tubes réactionnels et les filtres Amicon, afin de limiter la quantité d'Ig perdue, qui est particulièrement pénalisante pour les IgA (> 95%). Nous avons décidé de travailler en tubes Low Adsorption pour la fonctionnalisation. Concernant l'étape d'élimination du 2-IT après incubation, nous avons opté pour une nouvelle méthode de purification utilisant des colonnes de dessalage Zeba Desalt Spin Columns. Cette méthode fait intervenir le principe d'exclusion de taille.

Nous avons réitéré les dosages des protéines totales après incubation en tubes Low Adsorption et lavage sur colonnes Zeba. Ces dosages montrent que ces modifications nous ont permis de limiter les pertes en Ig (Table 18) :

- Pour les IgA non fonctionnalisées : la perte est de 15,5% au lieu de 78%
- Pour les IgA-SH, elle est de 11% au lieu d'être supérieure à 95%
- Pour les IgG non fonctionnalisées : elle est de 40,5% au lieu de 33%
- Pour les IgG-SH, elle est de 31% au lieu d'être supérieure à 80%

Contrairement aux filtres Amicon, avec les colonnes de dessalage, la perte est plus importante pour les IgG que pour les IgA, mais reste toutefois modérée. De plus, cette perte est moins importante en présence de 2-IT, alors qu'au contraire elle était supérieure avec les filtres Amicon. Il a été vérifié, comme pour la filtration en Amicon que le 2-IT était bien éliminé par cette méthode de lavage. Ces adaptations semblent donc intéressantes.

Nombre de moles d'Ig	En présence de 2-IT	En absence de 2-IT
IgG		
1 nmol	23,3%	44,0%
2 nmol	42,0%	48,0%
4 nmol	28,0%	29,6%
IgA		
1 nmol	13,0%	21,0%
2 nmol	8,0%	11,0%
3 nmol	11,0%	14,5%

Table 18 : Pourcentage de perte en Ig après lavage en colonne Zeba. Dans la 1^{ère} colonne, les Ig ont été incubées en présence de 2-IT et dans la 2^{ème} colonne sans 2-IT.

Les nouveaux essais de radiomarquage ont été réalisés à l'aide de ces supports et avec une concentration en 2-IT de 0,124 M au lieu de 0,062 M, afin d'augmenter le greffage de SH.

Des quantités croissantes d'IgA ont été utilisées, tout en conservant une concentration inférieure à 2 mg/ml, concentration au-delà de laquelle les IgA précipitent (Figure 41). Ces modifications nous ont permis d'obtenir des rendements de radiomarquage intéressants pour les IgA (de l'ordre de 90% pour 1 nmol). Comme nous l'avions constaté pour les IgG, plus le nombre de moles d'IgA à incuber augmente, plus la PRC augmente. Une quantité minimale de 1,25 nmol est nécessaire pour obtenir des rendements > 90%. Pour une quantité identique d'IgA, les rendements de marquage sont supérieurs lorsque les IgA sont greffées avec des groupes thiol : à 1 nmol, 85% pour les IgA-SH / 30 % pour les IgA. Ces expériences confirment l'importance de fonctionnaliser les IgA pour obtenir des rendements corrects.

Nous retrouvons également, comme pour les IgG, une bonne corrélation entre le nombre de groupements thiol fixés et la PRC, confirmant une nouvelle fois l'intérêt du greffage (Figure 42).

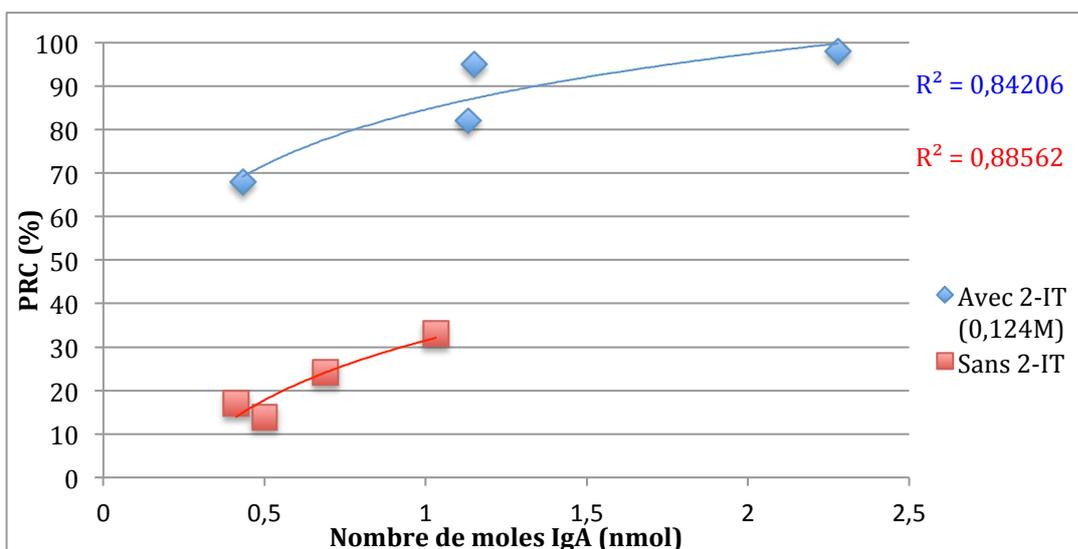


Figure 41 : Rendements des radiomarquages des IgA en fonction du nombre de moles d'IgA et de la greffe ou non de groupements thiol.

- ◆ : Représente les PRC des radiomarquages des IgA en présence de 2-IT
- : Représente les PRC des radiomarquages des IgA en absence de 2-IT

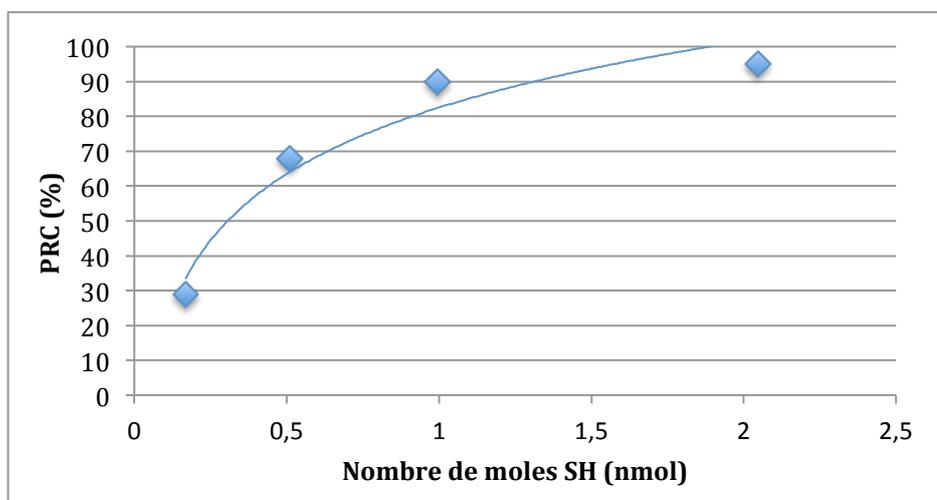


Figure 42 : Rendements des radiomarquages des IgA en fonction du nombre de moles de groupements thiol fixés.

- ◆ : Représente les PRC en fonction du nombre de moles de SH des radiomarquages des IgA en présence de 2-IT

En conclusion de la mise au point du radiomarquage, les dernières adaptations ayant permis d'atteindre des PRC importantes, les conditions de marquage retenues sont les suivantes :

- **Incubation pour la fonctionnalisation et le radiomarquage en tubes Low Adsorption**
- **Volume de 2-IT = 10 μ l. [2-IT]=0,124 M**
- **Volume d'Ig = 150 μ l. Quantité minimale d'Ig : Pour les IgG, 1,5 nmol afin de garantir des PRC supérieures à 95%. Pour les IgA, la concentration de production étant limitée (0,75 à 1,9 mg/ml soit 3,3 à 8,4 nmol/ml) et variable, pour garder un volume de 150 μ l, le volume étant un facteur critique pour la PRC, nous avons parfois été contraints d'utiliser des quantités inférieures à 1,25 nmol (0,5 à 1,26). Lorsque les quantités étaient faibles et entraînaient des rendements inférieurs à 90%, une étape de purification supplémentaire a été nécessaire. Elle a été réalisée sur les colonnes Zeba de façon identique au lavage lors de l'étape de fonctionnalisation. Des rendements de plus de 98% sont alors obtenus.**
- **Lavage sur colonnes de dessalage Zeba**

Ces conditions nous ont permis d'obtenir de bons rendements de radiomarquages : pour les IgA (anti-ACE et anti-ARA) de 95,0% \pm 4,3% et pour les IgG (anti-CD20 et anti-EGFR) de 93,9% \pm 4,8%.

Avec ces conditions, il est à noter que nous avons obtenu un nombre de moles de groupements thiol fixés par moles d'Ig (estimé par dosage BCA après lavage) de 1,5 à 3 pour les IgG et de 1,3 à 1,8 pour les IgA. Ces résultats sont intéressants, même si la fixation de groupements SH que nous avons atteinte est un peu plus faible que celle de Biechlin et al., qui obtenait un rapport de 3. L'équipe de Gano a travaillé, en 1998, sur le radiomarquage d'IgG polyclonales par le ^{99m}Tc après réduction par le 2-IT. Ils ont réalisé le greffage avec [2-IT]=0,07 M, [IgG]= 10 mg/ml, ratio molaire 2-IT/IgG = 260/1, soit une concentration finale en 2-IT correspondant à 0,012 M, comme lors de notre marquage (10 μ l de 2IT à 0,124 M dans 150 μ l d'Ig). Ils ont atteint des taux de fixation de groupements SH de 11,2 par molécule d'IgG et des rendements de 98%. La différence peut provenir de la concentration plus importante en IgG.

Dias et al. ont mis au point une autre méthode de radiomarquage des IgG (rituximab) par le ^{99m}Tc . Ils ont réduit préalablement les IgG par traitement avec du 2-mercaptoéthanol et les ont ensuite complexées avec un cœur tricarbonyl. Des taux de fixation de SH de 5 ± 1 groupes par molécule d'IgG ont été atteints, et des PRC supérieures à 98% ont été obtenues après incubation à 37°C pendant 3h (Dias, 2011).

Même si les taux de fixation de groupements SH que nous avons atteints sont inférieurs, les PRC que nous avons obtenues sont comparables à celles des autres auteurs.

Au moment du radiomarquage, l'activité est en moyenne de 240 MBq. Compte tenu des conditions d'élution, cette activité correspond à environ 30 pmole de ($^{99m}\text{Tc} + ^{99}\text{Tc}$), soit 9,73 pmole de ^{99m}Tc . Pour une quantité de 1 nmole d'Ig dans le milieu, il y a donc 3% des Ig complexées au technétium et seulement 1% à du technétium radioactif. Ce pourcentage est conforme à ce qui a lieu dans la plupart des radiomarquages, et c'est pourquoi il sera important dans l'étude de l'affinité de s'assurer que cette faible fraction radiomarkuée a gardé les mêmes propriétés que la majorité des Ac, non radiomarkués, présents dans l'échantillon.

II. Etude de la stabilité et de la conservation des propriétés des immunoglobulines radiomarquées

A. Stabilité du radiomarquage

La stabilité du radiomarquage des IgG et des IgA a été évaluée *in vitro* en PBS à +4°C et à +25°C, et en présence de plasma murin à +37°C (Tables 19 et 20).

PRC (%)	Anticorps	T0	T0 + 18h à +4°C	T0 + 18h à +25°C	T0 + 24h à +4°C	T0 + 24h à +25°C
En PBS	IgG	96,0	95,5	96,7	96,0	96,0
	IgA	95,0	90,0	93	92,0	87,0

Table 19 : Etude de la stabilité du radiomarquage des Ig en PBS

PRC (%)	Anticorps	T0	T0 + 24h à +37°C
En plasma murin	IgG	98,5	78,0
	IgA	92,2	65,3

Table 20 : Etude de la stabilité du radiomarquage des Ig en présence de plasma murin

Ces résultats montrent que le radiomarquage des IgG est stable en PBS aussi bien à +25°C qu'à +4°C, puisque la PRC reste constante à 18 et 24h. En présence de plasma murin, une diminution de PRC de 20% est observée à 24h, cependant la stabilité reste tout de même convenable.

Pour les IgA, le radiomarquage est également stable en PBS, même si une petite diminution de la PRC est observée. Cette diminution est plus importante à +25°C qu'à +4°C, mais reste inférieure à 10% à 24h. En présence de plasma murin, une baisse de PRC plus importante est obtenue. Elle est plus marquée que celle observée pour les IgG. Pour étudier plus précisément la stabilité du radiomarquage des IgA, un suivi a été réalisé avec des prélèvements à 2, 4, 8, 18 et 24h (Figure 43). Nous pouvons remarquer que la diminution de PRC en présence de plasma murin est surtout importante durant les premières heures, puis se stabilise.

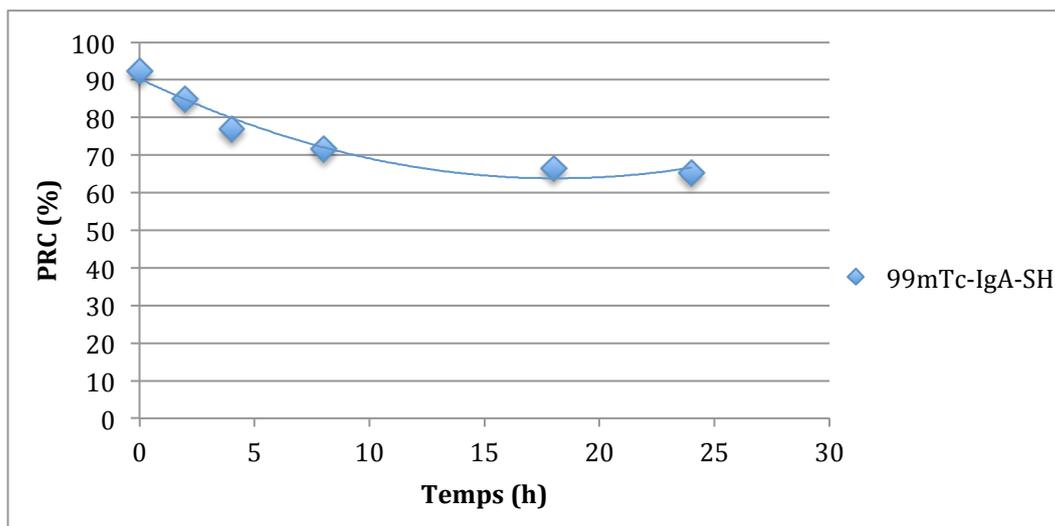


Figure 43 : Cinétique de la stabilité du radiomarquage des IgA en présence de plasma murin à 37°C

Pour les deux isotopes, une différence de stabilité entre les deux milieux est observée. Une des explications à ce processus de dégradation pourrait être les phénomènes de transchélation. En effet, Dias et al. (Dias, 2011) ont observé, lors de leurs essais de stabilité du radiomarquage du rituximab par le ^{99m}Tc -tricarbonyl, qu'en présence de cystéine ou d'histidine une altération du marquage $>80\%$ et $>30\%$, respectivement, était observée après 4h d'incubation à 37°C . Le marquage par le cœur tricarbonyl d'Ig fonctionnalisées par le 2-IT est normalement plus stable. Biechlin et al. ont montré dans des conditions similaires (4h à 37°C) que le cœur tricarbonyl n'était pas déplacé et que les ^{99m}Tc -IgG-SH étaient beaucoup plus stables. Pour déterminer si l'altération provient de processus de transchélation, nous pourrions tester la stabilité des Ig radiomarquées en les incubant avec de la cystéine ou de l'histidine.

Dias et al. ont également étudié la stabilité des radiomarquages en présence de plasma humain. Leurs essais ont montré une diminution plus faible (de l'ordre de 10%) qu'en présence de cystéine ou d'histidine et également plus faible que celle que nous avons observée. Cependant, ils ont réalisé leur étude avec des dilutions dans le plasma au tiers, alors que nos dilutions étaient au 1/10, donc dans des conditions plus drastiques et plus proches des conditions physiologiques. Stopar et al. (2006) ont obtenu des résultats similaires à Dias, avec des conditions d'incubation dans le plasma semblables (dilution au quart), lors du radiomarquage après photo-activation du rituximab, au ^{99m}Tc .

Les études de conservation montrent donc que le radiomarquage des IgG, comme des IgA, est stable en PBS à 4°C et à 25°C . Cette stabilité est par contre moins bonne dans le plasma, en particulier pour les IgA, ces résultats étant comparables à ceux obtenus dans d'autres études.

B. Intégrité des immunoglobulines radiomarquées

L'intégrité des Ig a été vérifiée avant et après radiomarquage par Western Blot.

Le Western Blot réalisé sur les IgG (Figure 44) montre une bande principale à 150 kDa pour les Ig non marquées (3 et 5). Cette bande est également la bande prédominante retrouvée après marquage, mais avec une intensité plus faible. Nous constatons que les IgG radiomarquées ont tendance à « traîner » au niveau des poids moléculaires plus importants, avec des bandes à 200 kDa et au-delà. Il est possible que cela provienne de la formation de polymères. De plus, les bandes sont étalées, ce qui peut provenir de la variation de leur poids moléculaire due aux groupements thiol et au cœur tricarbonyl pouvant s'être greffés une ou plusieurs fois. Nous avons constaté que la révélation des IgG est plus difficile lorsqu'elles sont radiomarquées. Les paratopes reconnus par l'Ac secondaire pourraient être masqués par le greffage avec le 2-IT ou par le cœur tricarbonyl. Nous n'avons par contre pas mis en évidence de fragmentation après radiomarquage, en chaîne légère, en chaîne lourde ou en peptides, ni par Western-Blot (l'Ac secondaire étant polyclonal), ni par coloration au Coomassie.

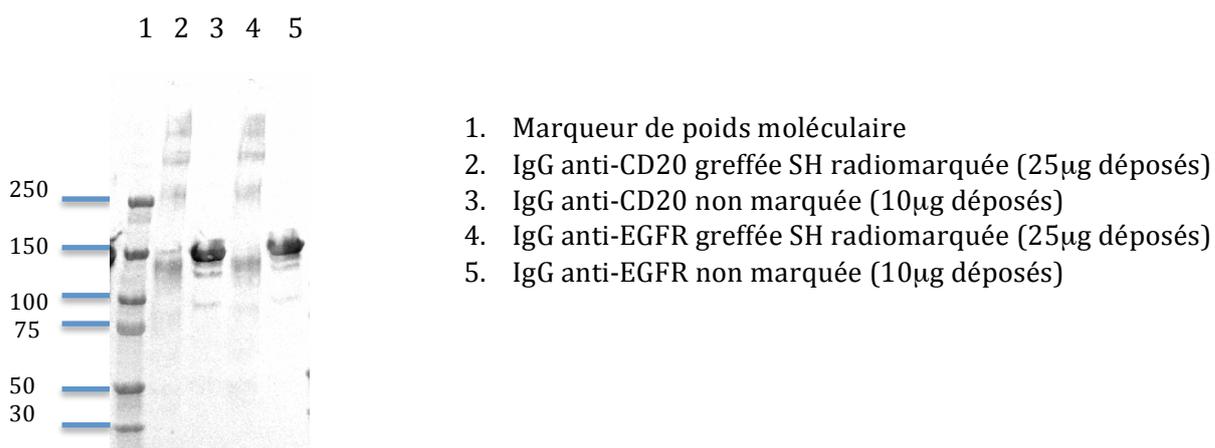


Figure 44 : Western Blot des IgG avant et après radiomarquage. Les poids moléculaires en kDa sont spécifiés à gauche de la membrane et les numéros des puits en haut de celle-ci. Les volumes déposés étaient pour les solutions d'IgG avant radiomarquage de 3 μ l et après radiomarquage de 15 μ l.

Le Western Blot des IgA non marquées (2 et 3) montre une bande à 150 kDa, une bande à 250 kDa et une bande à 300-350 kDa, correspondant aux IgA monomériques, dimériques et polymériques respectivement (Figure 45). Après radiomarquage, les mêmes bandes sont retrouvées, avec une intensité plus faible. Cette diminution correspond à une baisse de la reconnaissance des paratopes par l'Ac secondaire à une perte d'Ig (normalement compensée par un dépôt plus important). Comme pour les IgG, ces Western Blots nous ont permis d'observer qu'il n'y avait pas de fragmentation des IgA après radiomarquage.

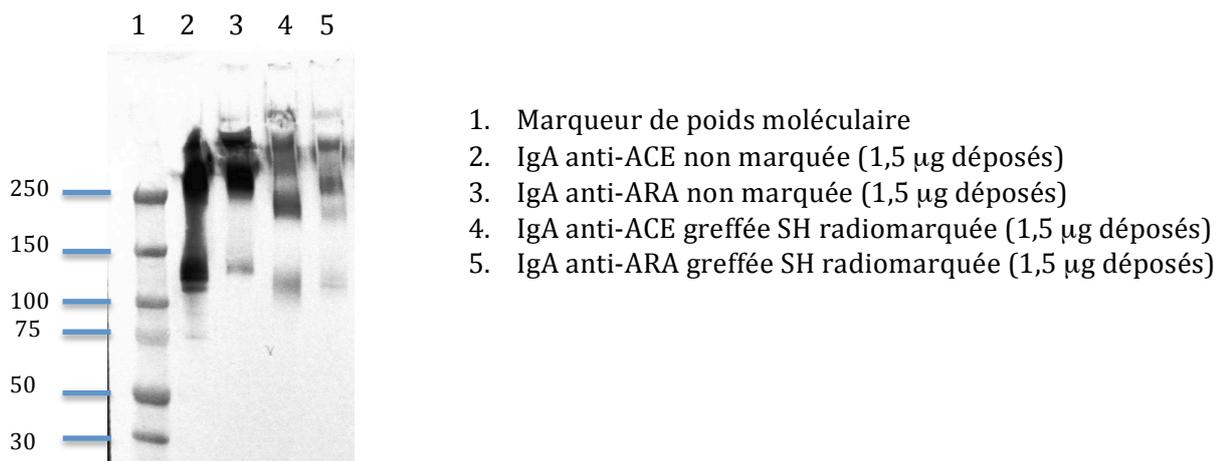


Figure 45 : Western Blot des IgA avant et après radiomarquage. Les poids moléculaires en kDa sont spécifiés à gauche de la membrane et les numéros des puits en haut de celle-ci. Les volumes déposés pour les IgA étaient de 1 µl avant radiomarquage et 2 µl après radiomarquage.

Les études d'intégrité par Western Blot ont montré qu'après radiomarquage, les IgG et les IgA conservent leur structure, bien qu'une fraction importante des Ac est perdue, ce qui est retrouvé dans les dosages protéiques, et que les Ac présentent une diminution de la reconnaissance par l'Ac secondaire.

C. Immunoaffinité des immunoglobulines radiomarquées sur plaques

L'immunoaffinité a été déterminée séparément pour les IgG et les IgA, les antigènes ciblés étant différents.

1. Cas des ^{99m}Tc-Immunoglobulines G

L'Ac étudié est l'IgG anti-CD20 et l'Ac contrôle est l'IgG anti-EGFR. Ces Ac radiomarqués ont été testés sur des plaques préalablement coatées avec l'Ag CD20.

La quantité d'Ac radiomarqué fixée par puits (µg) et la concentration d'Ac ont été représentées en fonction de la concentration totale en Ac ajoutée (Figures 46 et 47). Pour l'IgG anti-CD20, nous observons, que plus la concentration en Ac déposé augmente, plus la fixation totale augmente, alors que pour l'IgG anti-EGFR, aucune fixation n'est présente. De plus, la liaison spécifique, déterminée à partir de la liaison non spécifique obtenue par déplacement avec de l'IgG anti-CD20 non radiomarquée, augmente de façon parallèle. La fixation spécifique est supérieure à la liaison non spécifique, même si nous pouvons noter que la liaison non spécifique reste importante. Nous n'avons pas pu atteindre le plateau de saturation pour la liaison spécifique. Ces deux derniers résultats peuvent s'expliquer par la quantité d'Ag fixée sur le support qui est très grande et ne nous permet pas de saturer les sites ou de déplacer totalement

par l'Ac froid. Cette étude nous a permis d'observer que les IgG anti-CD20 conservaient une bonne affinité pour l'Ag CD20 après radiomarquage avec une liaison totale et une liaison spécifique importantes.

La représentation de ces résultats, selon Scatchard $BS/F = f(BS)$, nous a ainsi permis de déterminer un $K_d = 35 \text{ nM}$ et un $B_{max} = 2,86 \text{ } \mu\text{g/ml} = 19 \text{ nM}$.

Il est à noter que ce B_{max} confirme que, dans la gamme de concentration en Ac où nous avons travaillé, nous n'avons pas atteint la saturation et nous nous trouvons dans la partie linéaire de la courbe de fixation spécifique. Ce nombre de site B_{max} correspond à 1,9 pmoles/puits. Il peut être comparé à la quantité d'Ag déposée dans chaque puits déterminée par le calcul suivant : la solution de coating en Ag CD20 à 10 mg/ml est diluée au 1/1000^e, elle contient 7% de CD20. Nous avons donc déposé 2 pmoles/puits d'Ag CD20. Le nombre de site B_{max} que nous avons trouvé est tout à fait concordant avec la quantité déposée. Ce résultat montre de plus que le support Immulon a permis une adsorption très forte des Ag CD20. Il est à noter que, lors des premiers essais effectués sur un support différent dit Maxisorb, l'adsorption était beaucoup moins grande, ces essais avaient donné des taux de fixation spécifiques très faibles, inférieurs à ceux de la liaison non spécifique. L'importance de la quantité adsorbée explique aussi que nous n'avons pas réussi à saturer tous les sites antigéniques déposés. Il pourrait être intéressant de renouveler ces expériences avec une quantité d'Ag déposée plus faible.

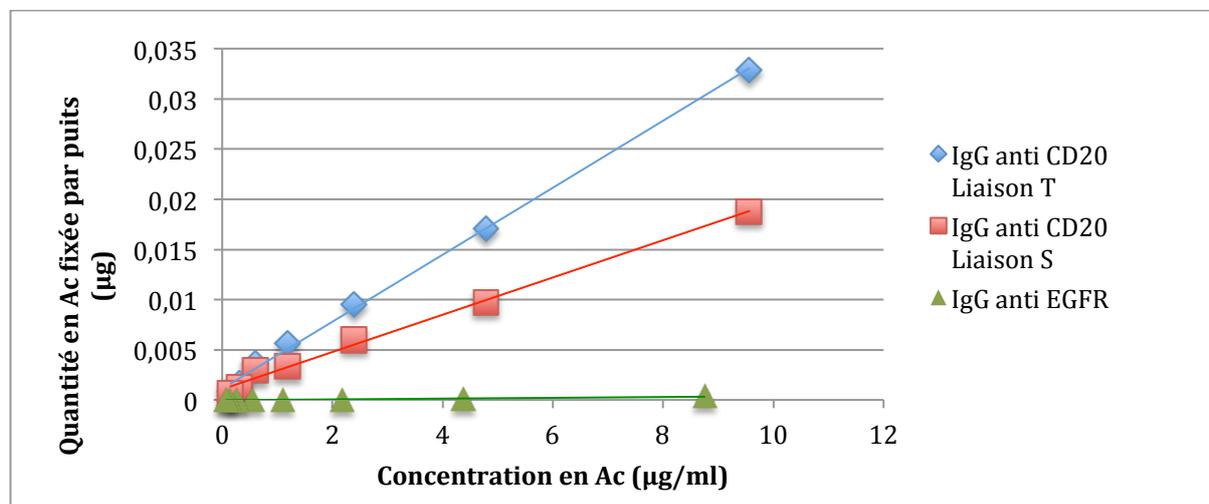


Figure 46 : Quantité en Ac fixée par puits des IgG après radiomarquage en fonction de la concentration en Ac ajoutée par ELISA avec Ag CD20.

- ◆ : Représente la fixation totale des IgG anti-CD20 radiomarquées (BT)
- : Représente la fixation spécifique des IgG anti-CD20 radiomarquées (déterminée par BT-BNS)
- ▲ : Représente la fixation totale des IgG anti-EGFR radiomarquées

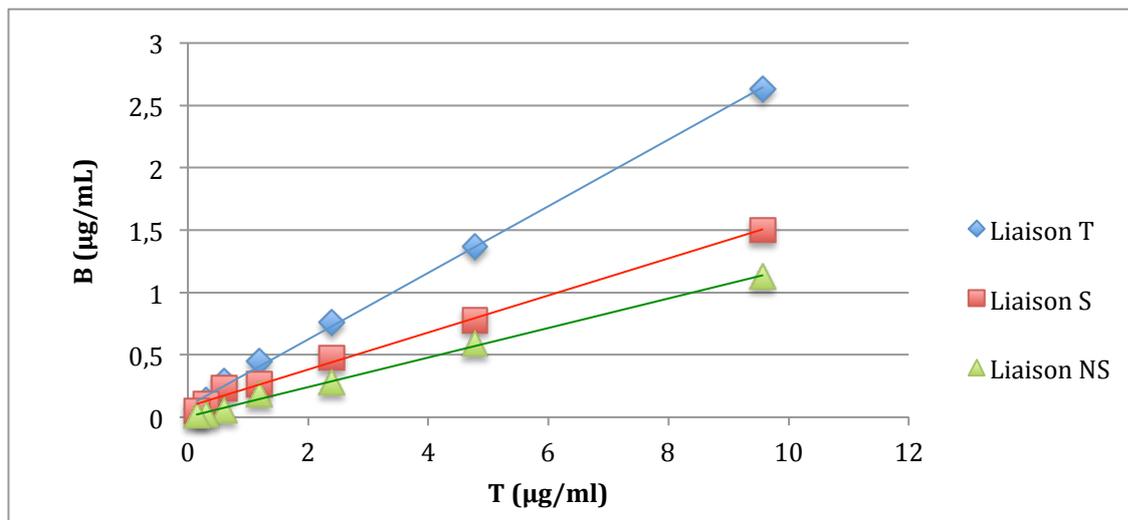


Figure 47 : Détermination de l'immunoaffinité des IgG anti-CD20 radiomarquées par ELISA

Détermination de la liaison des IgG anti-CD20 radiomarquées en fonction des concentrations totales d'Ac ajouté $B = f(T)$

◆ : Représente la fixation totale des IgG anti-CD20 radiomarquées (BT)

■ : Représente la fixation spécifique des IgG anti-CD20 radiomarquées (déterminée par BT-BNS)

▲ : Représente la fixation non spécifique des IgG anti-CD20 radiomarquées. Fixation des IgG radiomarquées en présence d'excès d'Ac froid.

2. Cas des ^{99m}Tc -Immunoglobulines A

L'Ac spécifique étudié est l'IgA anti-ACE et l'Ac contrôle est l'IgA anti-ARA. La plaque a été préalablement coatée avec l'Ag ACE.

Les différents essais réalisés ont montré que les IgA anti-ACE présentent une fixation importante sur des plaques coatées avec l'Ag ACE, avec une liaison spécifique très supérieure à la liaison non spécifique (Figure 48). Comme dans le cas des IgG anti-CD20, nous n'avons pas obtenu de saturation pour la liaison spécifique et nous nous trouvons dans une gamme de concentration correspondant à la partie linéaire. La représentation de ces résultats, selon Scatchard $BS/F = f(BS)$ nous a permis de déterminer un $K_d = 42 \text{ nM}$ et un $B_{\text{max}} = 1,31 \text{ µg/ml} = 5,8 \text{ nM}$. Nous trouvons un B_{max} à $5,8 \text{ pmoles/puits}$, qui est concordant avec la quantité en Ag ACE déposée de $5,2 \text{ pmoles/puits}$ (Solution de coating constituée d'Ag ACE à 1 mg/ml diluée au $1/1000^e$).

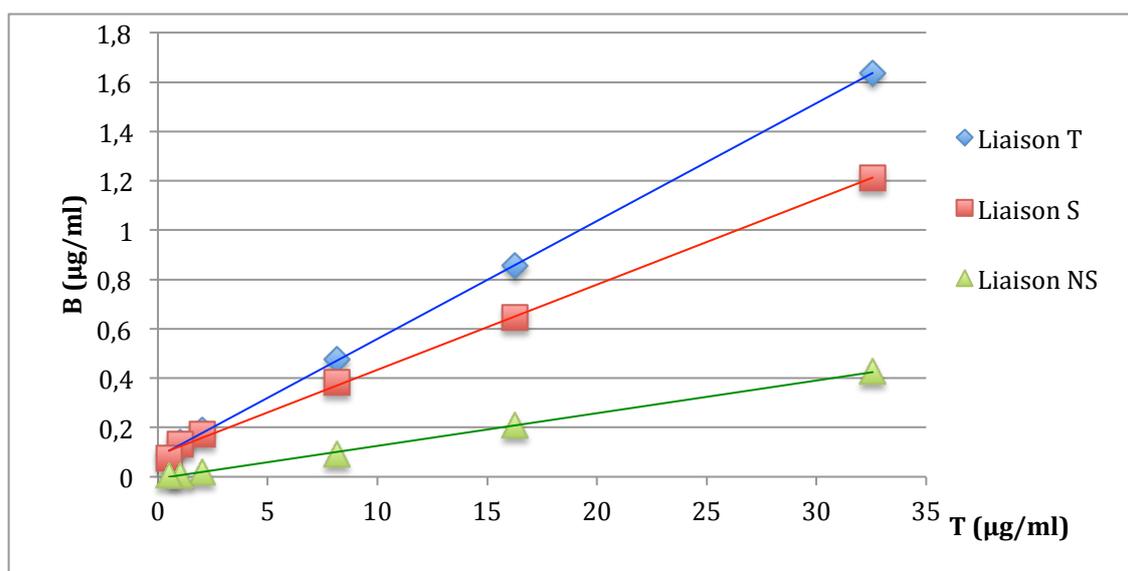


Figure 48 : Détermination de l'immunoaffinité des IgA anti-ACE radiomarquées par ELISA

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

◆ : Représente la fixation totale des IgA anti-ACE radiomarquées (BT)

■ : Représente la fixation spécifique des IgA anti-ACE radiomarquées (déterminée par BT-BNS)

▲ : Représente la fixation non spécifique des IgA anti-ACE radiomarquées. Fixation des IgA radiomarquées en présence d'excès d'Ac froid.

La fixation de l'IgA anti-ARA, Ig irrelevante, a également été étudiée (Figure 49). Il apparaît que la quantité d'Ac fixée par puits pour les IgA anti-ARA est très proche de celle des IgA anti-ACE. Les IgA anti-ARA présentent donc une forte liaison totale sur plaque coatée ACE. L'ajout d'Ac froid, déplace en partie cette liaison, et les liaisons non spécifique et spécifique sont pratiquement superposables (Figure 50). Ces trois liaisons sont non saturables. Nous pouvons nous interroger sur le choix de cet Ac comme contrôle irrelevant, puisqu'il semble se lier fortement au support et/ou à l'antigène.

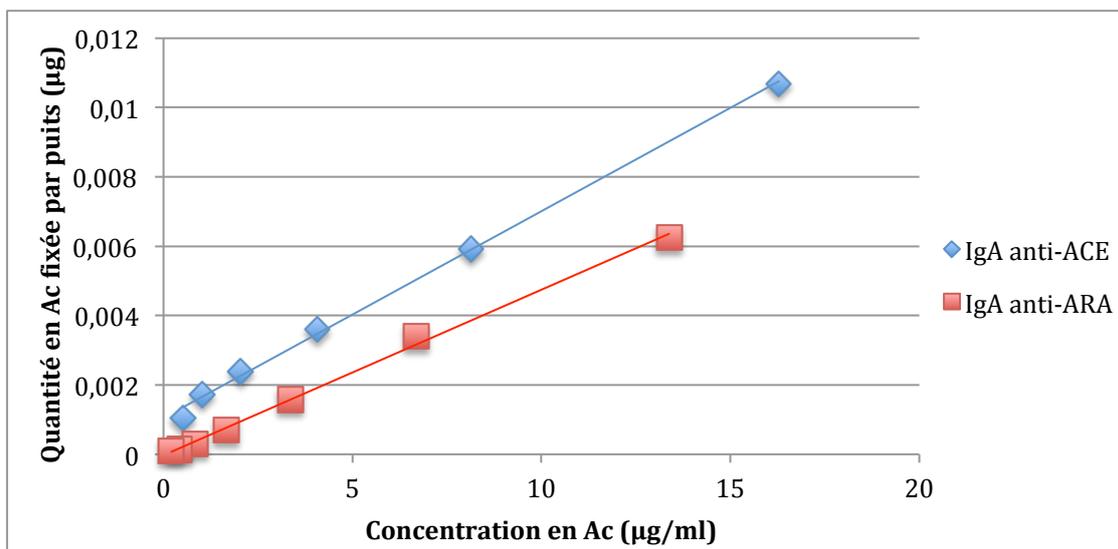


Figure 49 : Quantité en Ac fixée par puits des IgA après radiomarquage en fonction de la concentration en Ac ajoutée par ELISA avec Ag ACE.

- ◆ : Représente la fixation totale des IgA anti-ACE radiomarquées
- : Représente la fixation totale des IgA anti-ARA radiomarquées

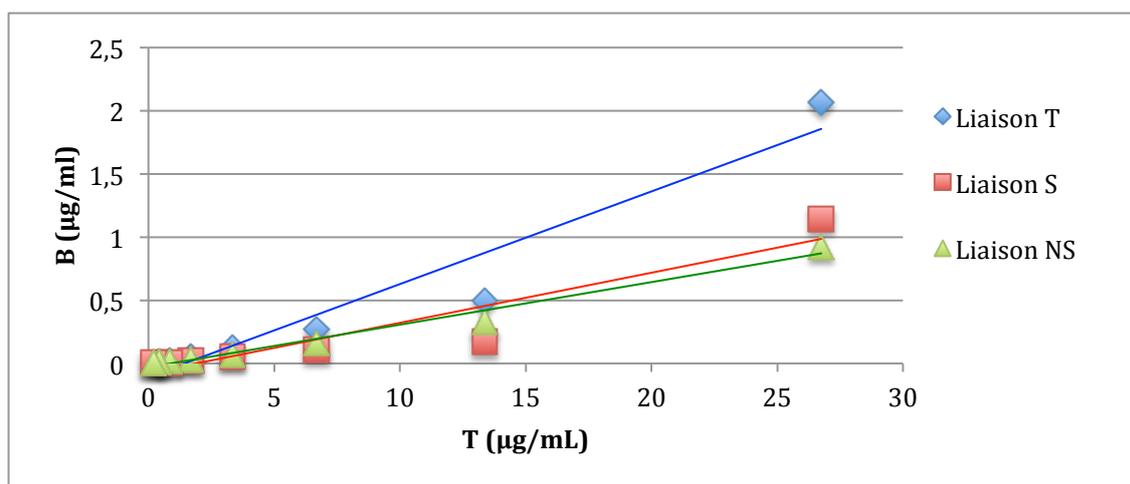


Figure 50 : Détermination de la liaison des IgA anti-ARA radiomarquées par ELISA.

Détermination de la liaison des IgA anti-ARA radiomarquées en fonction des concentrations totales d'Ac ajouté $B = f(T)$

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

La mise au point d'études d'affinité sur plaques nous a permis de montrer, qu'après radiomarquage, les IgA et les IgG conservent leur capacité à se lier sur leur antigène cible et de calculer leur K_d . Cette spécificité de liaison a été confirmée par la comparaison avec un Ac irrelevant pour les IgG.

D. Immunoaffinité des immunoglobulines radiomarquées sur cellules

1. Cas des ^{99m}Tc-Immoglobulines G

Les IgG à tester ciblant le CD20, nous avons travaillé avec les cellules EL4 CD20. Des contrôles négatifs ont été réalisés à l'aide des cellules EL4 WT qui n'expriment pas l'antigène CD20 à leur surface. En effet, les EL4 sont obtenues à partir d'un lymphome T murin. Une partie de ces EL4 a été transfectée pour exprimer l'antigène CD20 humain à leur surface.

Avant de débiter les études de Binding, nous avons dû déterminer la concentration en Ac froid à employer pour déplacer la liaison spécifique et calculer les liaisons non spécifique et spécifique. Nous avons choisi une quantité fixe de cellules de 1 million dans 250 µl de PBS-BSA 3% et trois concentrations en Ac radiomarquées (40 ng/ml, 800 ng/ml et 40 µg/ml), qui correspondent à la gamme de concentration dans laquelle les études d'affinité seront faites (Figure 51). Pour 40 ng/ml et 800 ng/ml d'Ig radiomarquées, une concentration d'Ac froid de 10 µg/ml induit déjà un déplacement maximum, l'excès d'Ac froid, dans le milieu réactionnel final, étant d'un rapport de 512 et 25 respectivement. Pour 40 µg/ml, concentration maximale d'Ac chaud dans les gammes étudiées, une concentration de 100 µg/ml (excès de 5) semble suffisante, 200 µg/ml n'apportant pas de déplacement supérieur. Pour la suite des études, nous avons donc choisi de travailler à une concentration en Ac froid de 100 µg/ml lors de la pré-incubation des cellules, même si, pour la concentration de la solution d'Ac radiomarqués la plus élevée de la gamme (40 µg/ml, soit 13,33 µg/ml dans le milieu réactionnel final), une concentration en froid supérieure serait probablement nécessaire pour un déplacement optimal, le taux de fixation non spécifique obtenu pour 40 ng/ml et 800 ng/ml étant d'environ 10% alors que pour 40 µg/ml, il est plus important (18,4%).

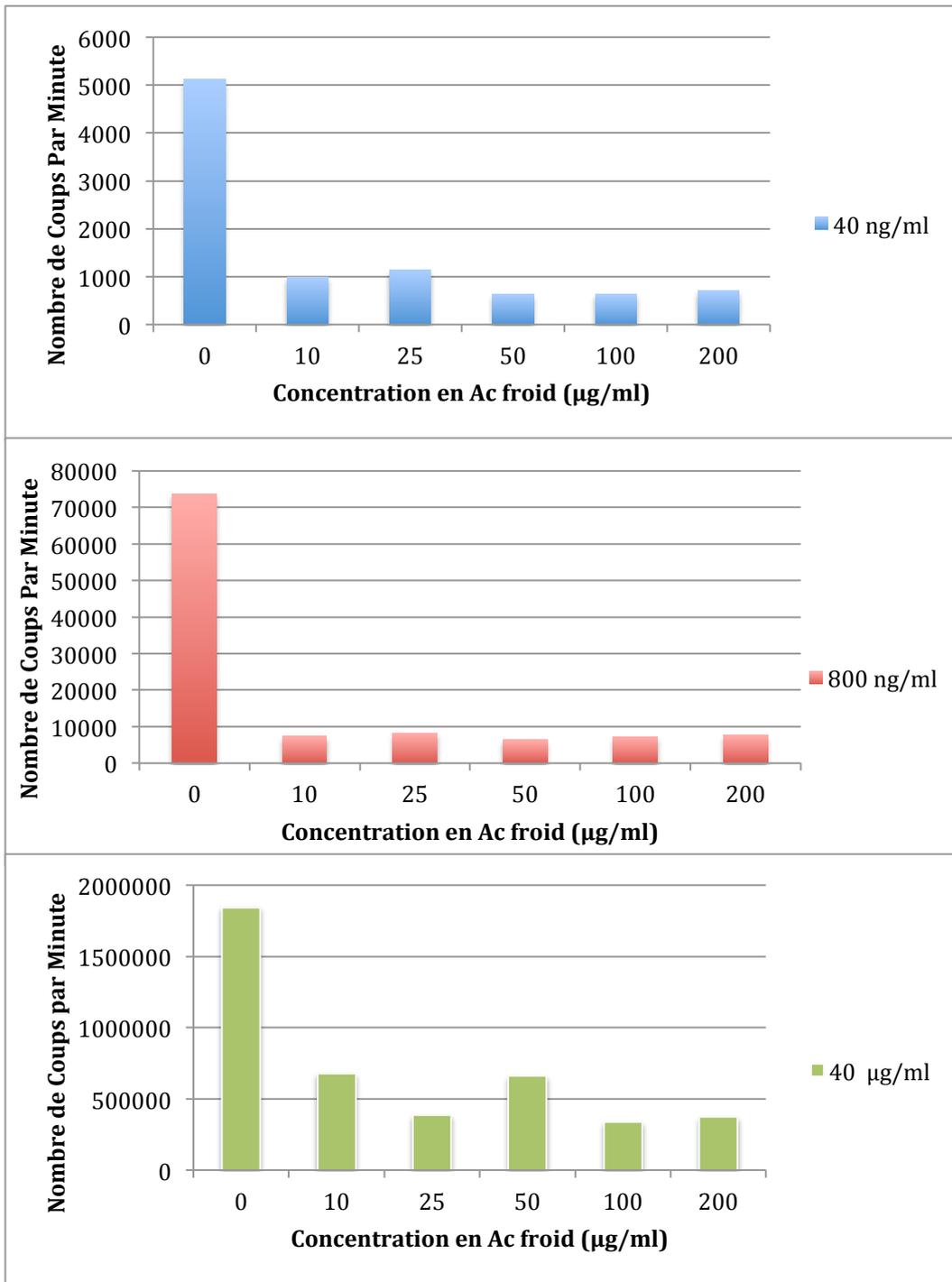


Figure 51 : Détermination de la concentration en Ac froid à utiliser pour les études d'affinité sur cellules.

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

a. Etude de Binding sur cellules et détermination des Kd

L'étude de la fixation des IgG anti-CD20 radiomarquées sur les cellules EL4 CD20 montre une fixation totale importante et qui augmente de manière linéaire en fonction de la concentration en Ac (Figure 52.A). La fixation non spécifique est faible. Elle augmente de façon proportionnelle à l'augmentation des concentrations en IgG et est non saturable. La liaison spécifique est très supérieure à la liaison non spécifique et tend vers une saturation.

Grâce à une linéarisation selon Scatchard en traçant $BS/F = f(BS)$, le Kd des IgG anti-CD20 radiomarquées sur cellules EL4 CD20 a été déterminé (Figure 52.B). En moyenne sur plusieurs expériences, nous obtenons un Kd des ^{99m}Tc -IgG anti-CD20 à $40 \text{ nM} \pm 19$, et un Bmax à $11 \text{ nM} \pm 7,2$ ($n = 3$). Ce Kd est très proche de celui obtenu par les études d'immunoaffinité sur plaques (35 nM). Le Bmax est inférieur à la quantité de sites avec laquelle nous avons travaillé sur plaques. Les concentrations les plus élevées étudiées étant de plus supérieures à celles sur plaques, le Bmax trouvé est concordant avec la tendance à la saturation que nous observons sur cellules.

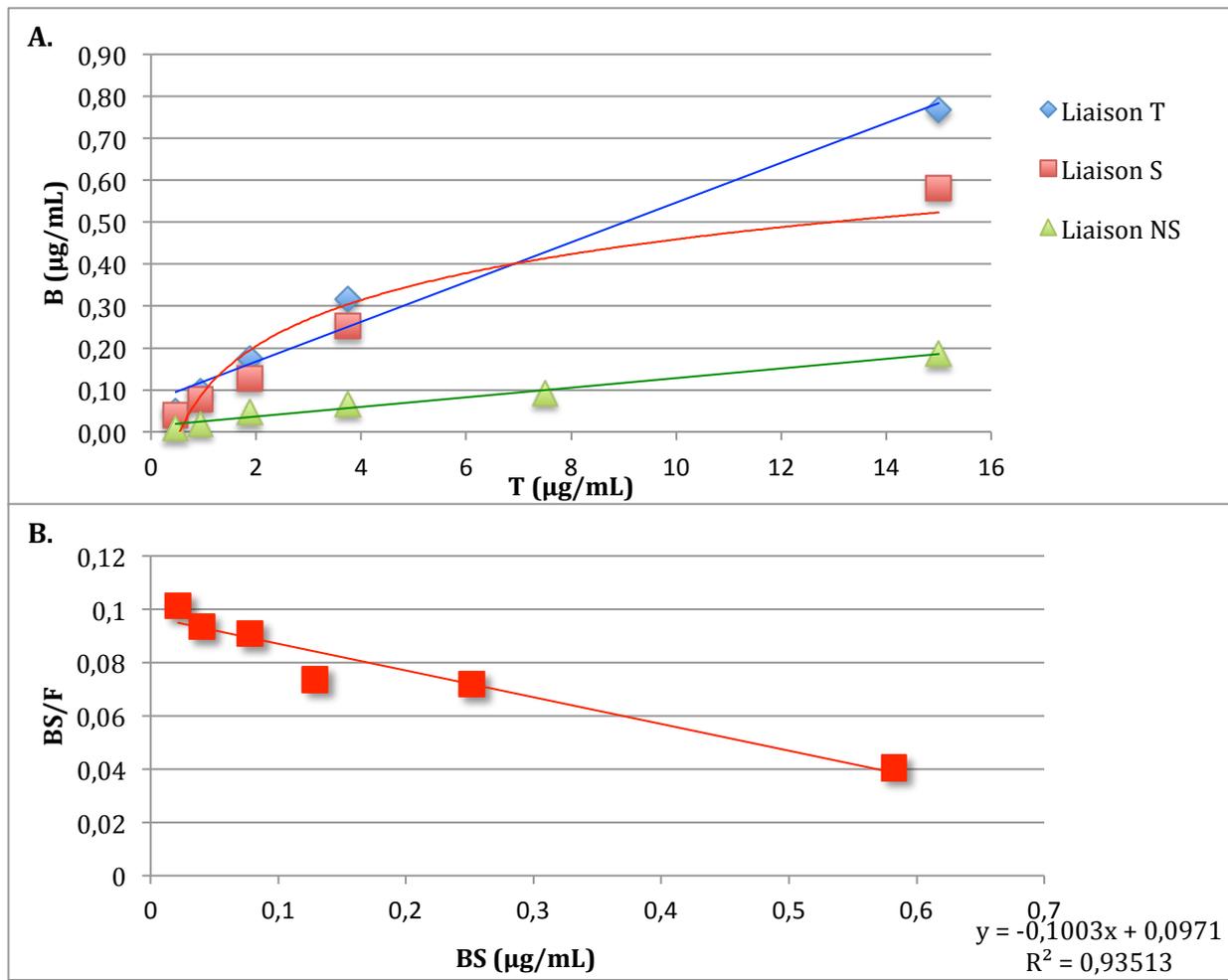


Figure 52 : Détermination de l'immunoaffinité des IgG anti-CD20 radiomarquées sur cellules EL4 CD20

A. Détermination de la liaison des IgG anti-CD20 radiomarquées sur cellules EL4 CD20 en fonction des concentrations totales en Ac ajouté $B = f(T)$

◆ : Représente la fixation totale des IgG anti-CD20 radiomarquées (BT)

■ : Représente la fixation spécifique des IgG anti-CD20 radiomarquées (déterminée par $BT - BNS$)

▲ : Représente la fixation non spécifique des IgG anti-CD20 radiomarquées. Fixation des IgG radiomarquées en présence d'excès d'Ac froid.

B. Représentation linéaire selon Scatchard $BS/F = f(BS)$, BS étant exprimée en µg/ml.

Nous avons ensuite vérifié que les IgG anti-CD20 radiomarquées ne se liaient pas à des cellules n'exprimant pas l'antigène CD20 (Figure 53). Les cellules sur lesquelles nous avons travaillé sont les EL4 WT. Nous observons que, les EL4 WT ne exprimant pas l'antigène CD20 à leur surface, aucune liaison spécifique sur ces cellules n'est présente. Les courbes de fixation totale et non spécifique sont quasiment superposables. Pour les concentrations étudiées, la fixation totale est assez faible ($< 0,2 \mu\text{g/ml}$), identique à la fixation non spécifique obtenue sur les EL4 CD20. La fixation spécifique sur les cellules EL4 CD20 est bien supérieure à celle obtenue sur les EL4 WT ce qui tend à démontrer qu'il y a un ciblage spécifique des IgG anti-CD20 radiomarquées sur les antigènes CD20.

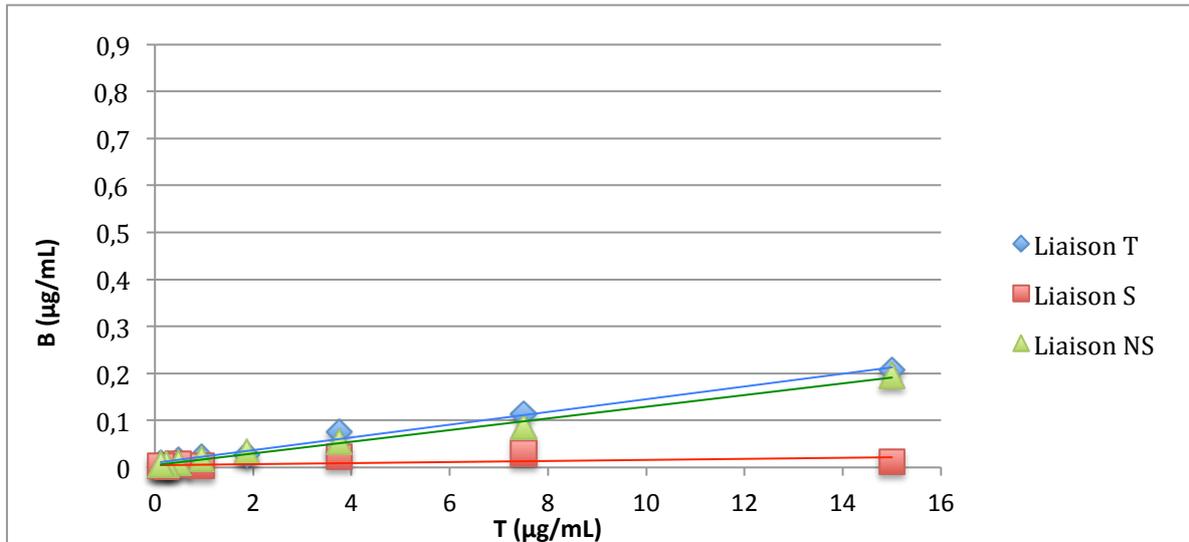


Figure 53 : Immunoaffinité des IgG anti-CD20 radiomarquées sur cellules EL4 WT.

Détermination de la liaison des IgG anti-CD20 radiomarquées sur cellules EL4 WT en fonction des concentrations totales en Ac ajouté $B = f(T)$

◆ : Représente la fixation totale des IgG anti-CD20 radiomarquées (BT)

■ : Représente la fixation spécifique des IgG anti-CD20 radiomarquées (déterminée par $BT - BNS$)

▲ : Représente la fixation non spécifique des IgG anti-CD20 radiomarquées. Fixation des IgG radiomarquées en présence d'excès d'Ac froid.

Un contrôle supplémentaire a été réalisé en étudiant la fixation des IgG anti-EGFR radiomarquées sur les cellules EL4 C20. Les trois fixations des IgG anti-EGFR radiomarquées sur cellules EL4 CD20 sont très faibles ($< 0,1 \mu\text{g/ml}$), même inférieures à la fixation non spécifique des IgG anti-CD20 radiomarquées sur EL4 CD20 (Figure 54). La fixation non spécifique est similaire à la fixation totale. Ces observations sont conformes aux résultats attendus puisque l'IgG anti-EGFR est l'Ac irrelevant et ne doit donc pas se fixer à l'antigène CD20.

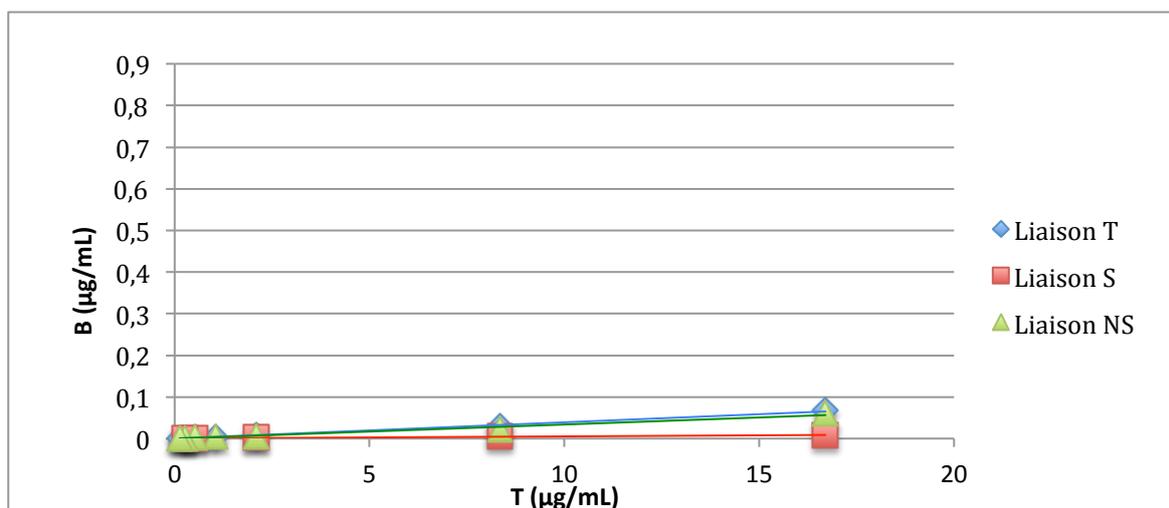


Figure 54 : Immunoaffinité des IgG anti-EGFR radiomarquées sur cellules EL4 CD20.

Détermination de la liaison des IgG anti-EGFR radiomarquées sur cellules EL4 CD20 en fonction des concentrations totales en Ac ajouté $B = f(T)$

◆ : Représente la fixation totale des IgG anti-EGFR radiomarquées (BT)

■ : Représente la fixation spécifique des IgG anti-EGFR radiomarquées (déterminée par $BT - BNS$)

▲ : Représente la fixation non spécifique des IgG anti-EGFR radiomarquées. Fixation des IgG radiomarquées en présence d'excès d'Ac froid.

b. Détermination de la fraction immunoréactive (IRF)

Des concentrations croissantes de cellules ont été incubées avec une concentration fixe en IgG anti-CD20 radiomarquées. Deux concentrations d'Ig ont été étudiées : 40 ng/ml et 800 ng/ml (Figures 55. A et B). Lorsque la concentration en cellules devient importante, on observe une saturation de la liaison spécifique, avec un plateau à 0,3. L'expression de l' « activité totale ajoutée / activité liaison spécifique » en fonction de l'inverse de la concentration en cellules (Figure 55.C) permet de trouver plus précisément la fraction immunoréactive qui est de 0,42 soit 42%.

La détermination de l'IRF dans notre étude permet de vérifier que l'Ac après radiomarquage a conservé sa réactivité vis-à-vis de l'antigène et ainsi que les étapes de marquage n'ont pas causé de modification majeure de la structure du site de liaison à l'antigène. L'IRF peut être réduite par l'étape de radiomarquage et représente donc un critère de qualité qui doit être évalué (Dux, 1991). La valeur que nous avons obtenue indique que seule une partie des Ac radiomarqués sera capable de se lier à l'antigène, ce qui peut être à l'origine de bruit de fond lors de l'acquisition d'images après administration à l'animal. Ce résultat est toutefois proche des valeurs obtenues dans d'autres études dont une étude de radiomarquage du rituximab avec un cœur tricarbonyl (IRF = 50%) (Dias, 2011).

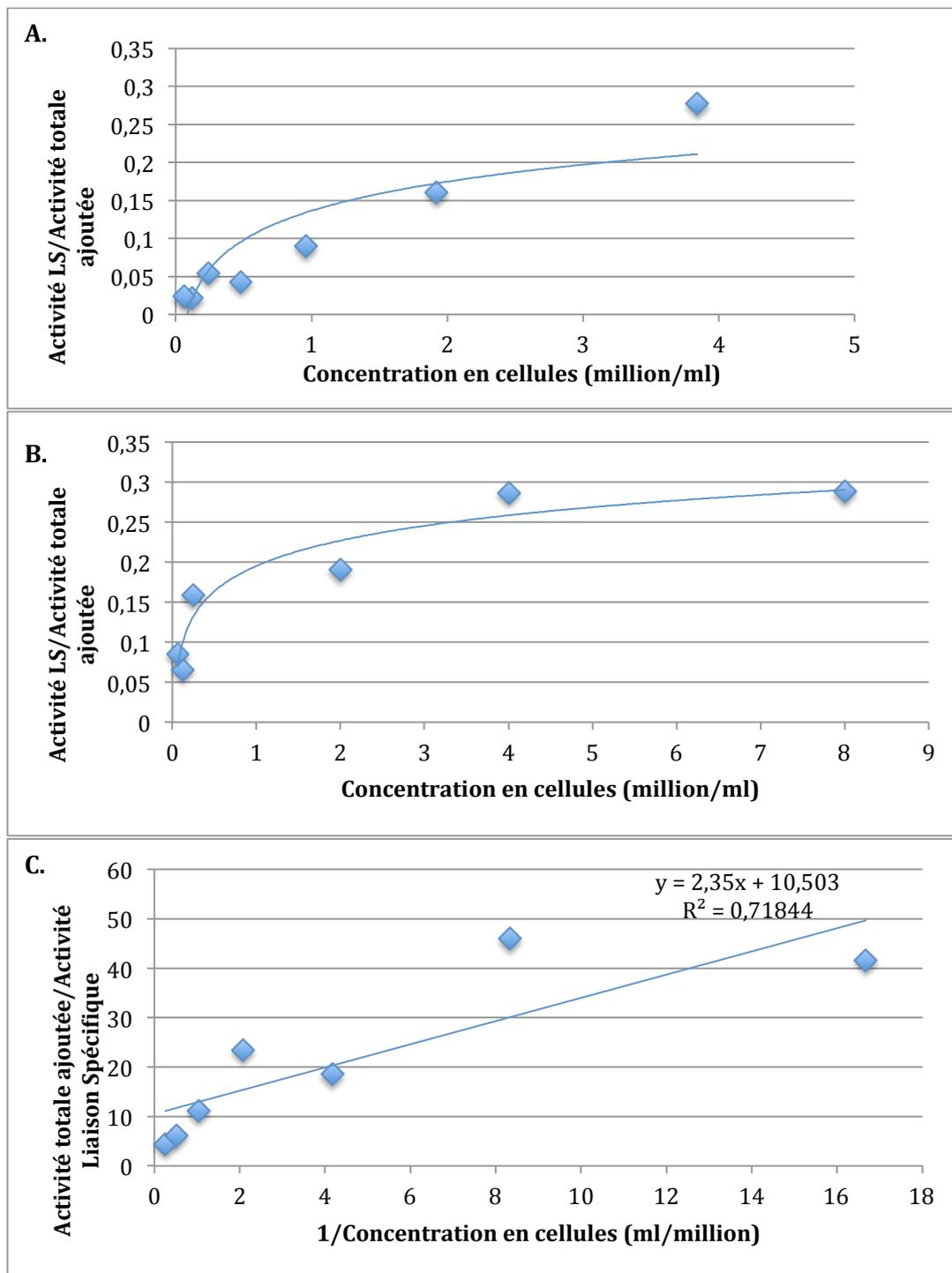


Figure 55 : Détermination de l'IRF des IgG anti-CD20 radiomarquées sur cellules EL4 CD20.

- A. (Activité liaison spécifique/Activité totale ajoutée) = f(Concentration en cellules) à la concentration de 40 ng/ml.
 B. (Activité liaison spécifique/Activité totale ajoutée) = f(Concentration en cellules) à la concentration de 800 ng/ml.
 C. Courbe en double inverse: (Activité totale ajoutée/Activité liaison spécifique) = f(1/Concentration en cellules)

Les expériences de binding sur plaque et sur cellules nous ont permis de déterminer un Kd de 35 et 40 nM respectivement. Le Kd du rituximab avant radiomarquage est de 5 nM (Dias, 2011), le radiomarquage, que nous avons effectué, a donc entraîné une diminution d'affinité, mais qui reste raisonnable et inférieure à un facteur 10. Cette diminution pourrait s'expliquer par le fait que le greffage du 2-IT n'étant pas ciblé, il peut se produire sur n'importe quelle région de l'Ac, dont le paratope, et gêner ensuite la liaison antigène-anticorps. Nous pouvons nous demander si le greffage diminue l'affinité d'une portion des Ac ou si certains Ac ne sont plus capables de se lier. L'IRF devrait répondre à cette question, puisqu'il permet théoriquement de déterminer la fraction des Ac pouvant se lier. L'IRF obtenue étant diminuée, il semble qu'une partie des Ac ne peut plus se lier. Dans notre cas, nous pouvons envisager une explication alternative. En effet, nous nous trouvons en présence d'un très large excès d'Ac froid (moins de 2% des Ac sont radiomarqués). Lorsque la concentration en Ac radiomarqués augmente pour atteindre le plateau de saturation, la concentration en Ac non radiomarqués augmente aussi. Une saturation des sites peut être atteinte avec seulement une fraction des Ac radiomarqués liée, les autres sites étant occupés par des Ac non radiomarqués, d'autant plus qu'ils sont en très large excès et ont une affinité supérieure. Il est donc difficile de conclure sur les raisons de la diminution du Kd. Il serait intéressant de connaître l'affinité totale des Ac présents dans la solution radiomarquée.

2. Cas des ^{99m}Tc-Immunoglobulines A

Pour les études concernant les IgA anti-ACE radiomarquées, les cellules WiDr exprimant l'ACE et les cellules DLD1 ne l'exprimant pas, ont été utilisées. Il a été montré par Guadagni et al., dans des extraits cellulaires (teneur en ACE exprimée en ng/mg de protéines cellulaires), que les cellules DLD1 ne produisent pas d'ACE, alors que les WiDr en produisent à raison de 93 ng/mg de protéines cellulaires (Guadagni, 1990). Selon l'ATCC, les WiDr produisent 118 ng d'ACE par million de cellules en 10 jours et les DLD1 0,5 ng. Les WiDr sont des cellules provenant d'un adénocarcinome primaire du côlon rectosigmoïdien de stade TNM II (Flatmark, 2004), et dérivent d'une lignée cellulaire appelée HT29 (Noguchi, 1979). Les cellules DLD1 sont issues d'un adénocarcinome colique de stade TNM III.

Les premières études d'affinité avaient été réalisées sur la lignée HT29, déjà utilisée dans le laboratoire, cependant celle-ci produisant nettement moins d'ACE (12,5 ng/mg de protéines cellulaires), ces travaux ont été poursuivis comme nous le verrons avec les cellules WiDr.

Les expériences de déplacement par concentration croissante de froid consommant beaucoup d'anticorps, et étant limité par la quantité d'IgA à disposition, nous avons choisi une concentration en Ac froid de 100 µg/ml, par analogie aux résultats obtenus pour les IgG.

a. Etude de Binding sur cellules et détermination des K_d

L'étude de l'affinité des IgA anti-ACE radiomarquées sur les cellules HT29 montre une fixation totale et une fixation non spécifique qui augmentent de façon parallèle lorsque les concentrations en IgA anti-ACE augmentent (Figure 56). Les deux droites obtenues étant linéaires cela montre bien qu'il s'agit de liaisons non saturables. La liaison spécifique semble saturer, toutefois elle est très faible ($< 0,05 \mu\text{g/ml}$) et reste très inférieure à la liaison non spécifique. Ces trois liaisons sont faibles par rapport à celles observées pour les IgG anti-CD20 sur les cellules EL4 CD20 (de l'ordre de $1 \mu\text{g/ml}$).

Les cellules HT29 sécrétant de l'ACE en quantité moindre par rapport à d'autres lignées cellulaires de cancer colorectal, nous avons décidé de travailler sur les cellules WiDr exprimant davantage cet antigène.

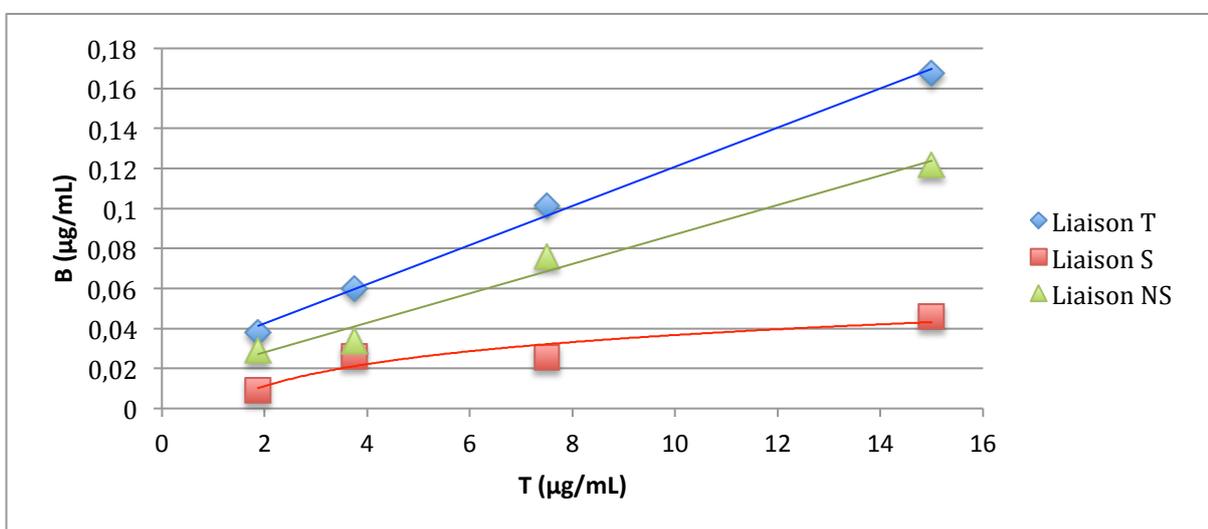


Figure 56 : Immunoaffinité des IgA anti-ACE après radiomarquage sur cellules HT29.

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

◆ : Représente la fixation totale des IgA anti-ACE radiomarquées (BT)

■ : Représente la fixation spécifique des IgA anti-ACE radiomarquées (déterminée par $BT - BNS$)

▲ : Représente la fixation non spécifique des IgA anti-ACE radiomarquées. Fixation des IgA radiomarquées en présence d'excès d'Ac froid.

L'étude de l'affinité des IgA anti-ACE après radiomarquage sur cellules WiDr montre que la fixation totale et la fixation non spécifique augmentent linéairement en fonction de la concentration en Ac. Ces liaisons sont non saturables (Figure 57.A). La fixation spécifique est plus importante que la liaison non spécifique et tend vers un plateau de saturation. A l'aide des données obtenues, nous avons déterminé le K_d et le B_{max} des IgA anti-ACE radiomarquées sur cellules WiDr en traçant $BS/F = f(BS)$ (Figure 57.B) qui sont respectivement de $9,1 \text{ nM} \pm 5,4$, et $0,7 \text{ nM} \pm 0,2$.

La fixation spécifique sur cellules WiDr est supérieure à la fixation sur cellules HT29 (0,2 et < 0,05 µg/ml, respectivement). Ce résultat est concordant avec les taux d'expression de l'ACE dans ces cellules. Le Bmax obtenu est toutefois inférieur à celui pour les cellules EL4 CD20, suggérant une plus faible expression antigénique des WiDr. De plus, une partie de l'ACE produit est libéré par les cellules (Ag circulant). Le Bmax est aussi inférieur à celui sur plaque, expliquant que la saturation soit atteinte.

Le Kd obtenu est faible, montrant que les IgA radiomarquées présentent une bonne affinité pour l'ACE. Ce résultat est inférieur à celui réalisé sur plaque (42 nM). Cette différence peut être due à une meilleure présentation de l'antigène sur les cellules, que sur plaque, où l'antigène seul est adsorbé et peut donc avoir son épitope partiellement ou totalement masqué. Nous ne disposons pas encore de l'affinité avant radiomarquage de ces IgA (la détermination étant en cours par l'équipe de B Cell Design), toutefois le Kd que nous avons trouvé est de l'ordre de grandeur de celui d'un Ac monoclonal.

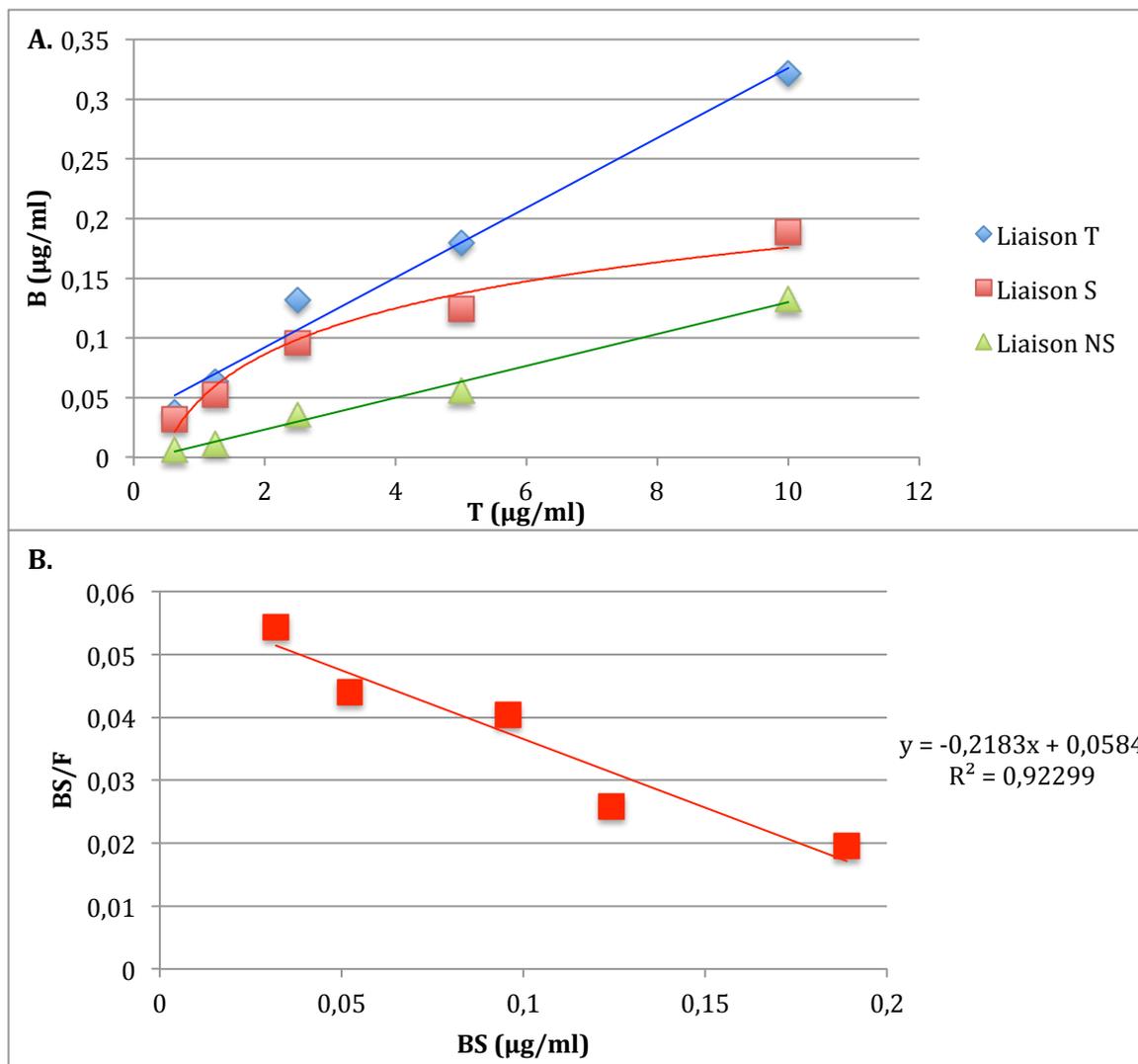


Figure 57 : Détermination de l'immunoaffinité des IgA anti-ACE radiomarquées sur cellules WiDr.

A. Détermination de la liaison des IgA anti-ACE radiomarquées sur cellules WiDr en fonction des concentrations totales en Ac ajouté $B = f(T)$

◆ : Représente la fixation totale des IgA anti-ACE radiomarquées (BT)

■ : Représente la fixation spécifique des IgA anti-ACE radiomarquées (déterminée par $BT - BNS$)

▲ : Représente la fixation non spécifique des IgA anti-ACE radiomarquées. Fixation des IgA radiomarquées en présence d'excès d'Ac froid.

B. Représentation linéaire selon Scatchard $BS/F = f(BS)$, BS étant exprimée en µg/ml.

Nous avons ensuite vérifié que les IgA anti-ACE radiomarquées ne se liaient pas à des cellules n'exprimant pas l'antigène ACE, les DLD1, cellules irrelevantes pour l'Ag ACE. Aucune liaison spécifique sur ces cellules n'a été observée (Figure 58). Les courbes de fixation totale et fixation non spécifique sont linéaires et quasiment superposables. Pour les concentrations étudiées, les fixations sont faibles ($< 0,07 \mu\text{g/ml}$). La fixation spécifique sur les cellules WiDr ($0,18 \mu\text{g/ml}$) est très supérieure à celle obtenue sur les DLD1 ce qui tend à démontrer qu'il y a un ciblage

spécifique des IgA anti-ACE radiomarquées sur les antigènes ACE.

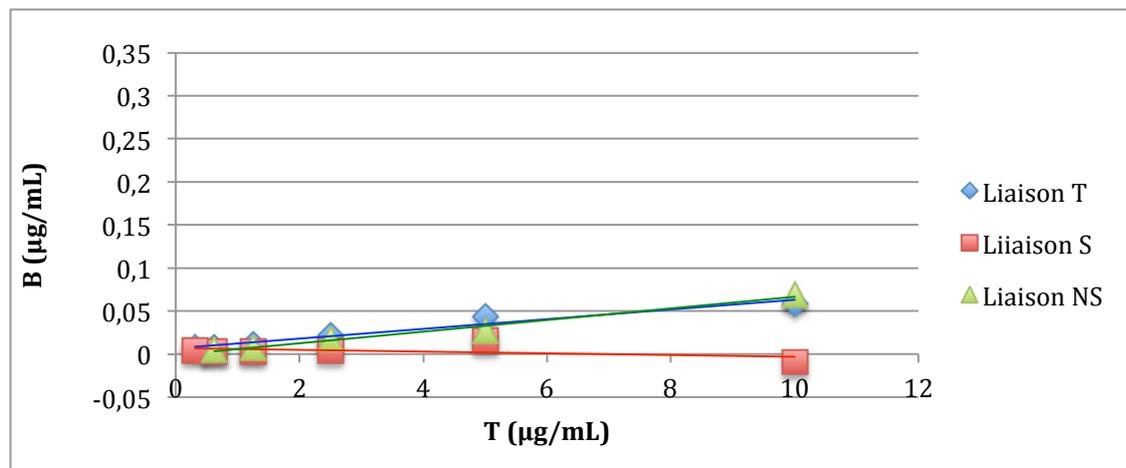


Figure 58 : Immunoaffinité des IgA anti-ACE radiomarquées sur cellules DLD1.

Détermination de la liaison des IgA anti-ACE radiomarquées sur cellules DLD1 en fonction des concentrations totales en Ac ajouté $B = f(T)$

◆ : Représente la fixation totale des IgA anti-ACE radiomarquées (BT)

■ : Représente la fixation spécifique des IgA anti-ACE radiomarquées (déterminée par BT-BNS)

▲ : Représente la fixation non spécifique des IgA anti-ACE radiomarquées. Fixation des IgA radiomarquées en présence d'excès d'Ac froid.

Un contrôle supplémentaire a été effectué. Nous avons regardé la fixation des IgA anti-ARA sur cellules WiDr et DLD1 (Figures 59. A et B). Sur les cellules WiDr, nous avons observé une fixation totale et une fixation non spécifique des IgA anti-ARA fortes et supérieures à celles des IgA anti-ACE. Ces deux fixations sont pratiquement superposables, ce qui montre que les IgA anti-ARA ne présentent pas de liaison spécifique pour l'antigène ACE. Nous avons confirmé ces résultats sur les cellules DLD1.

Afin de s'assurer que les IgA anti-ARA ne se fixent pas sur les cellules par le même antigène ou récepteur (comme les récepteurs de basse affinité) que les IgA anti-ACE, nous avons étudié la fixation des IgA anti-ACE radiomarquées après pré-incubation des cellules WiDR avec de l'IgA anti-ARA « froid ». Aucun déplacement n'a été observé, ce qui montre que la fixation des IgA anti-ARA se produit sur des sites distincts de ceux des IgA anti-ACE.

Ces résultats confirment ce que nous avons démontré par immunoaffinité sur plaque : les IgA anti-ARA sont des Ac se fixant beaucoup de manière aspécifique sur les supports et les antigènes. Ces Ac ne représentent certainement pas les témoins irrelevants que nous devons utiliser pour nos études *in vitro* et *in vivo*.

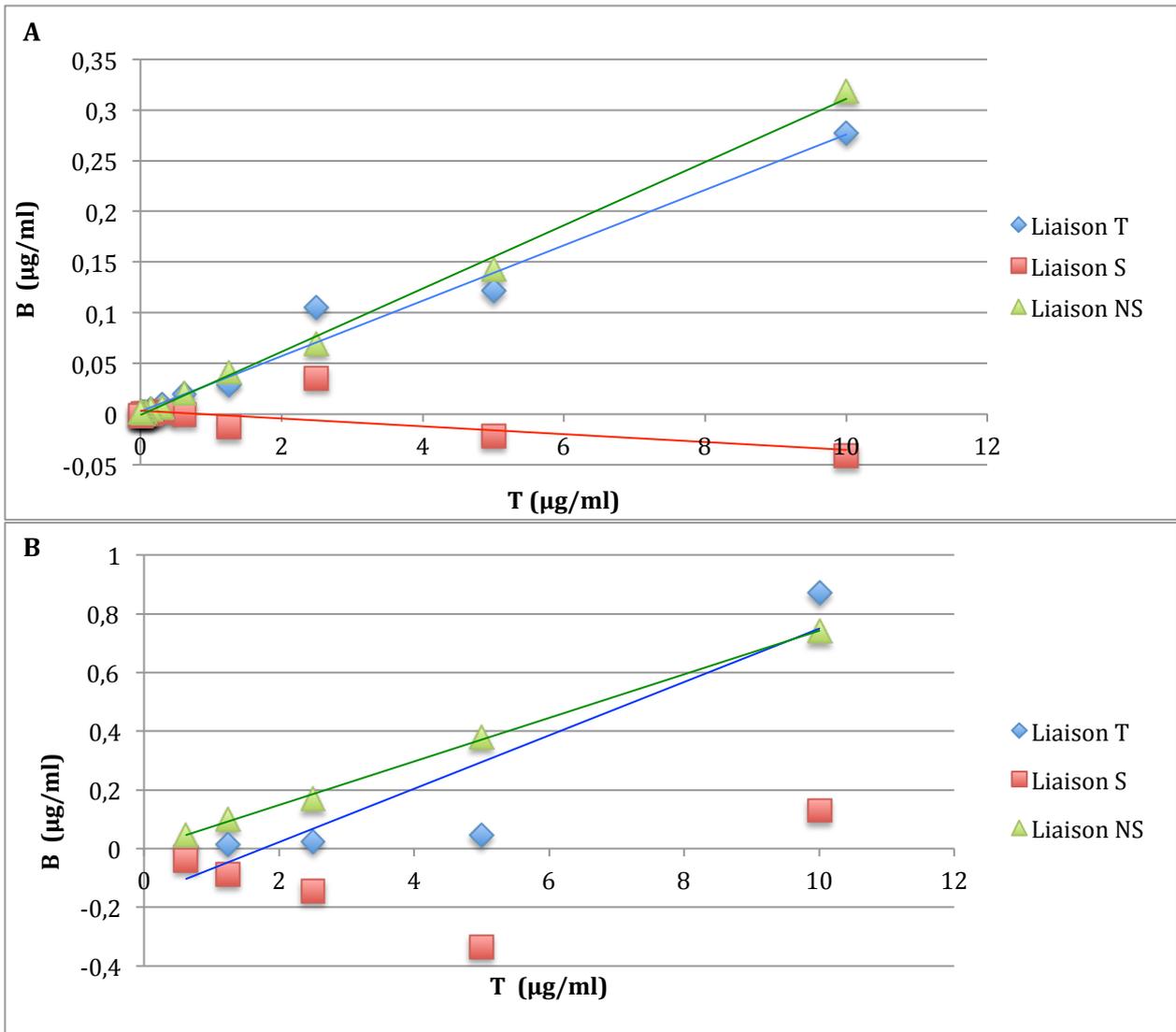


Figure 59 : Immunoaffinité des IgA anti-ARA radiomarquées.

A. Détermination de la liaison des IgA anti-ARA radiomarquées sur cellules WiDr en fonction des concentrations totales en Ac ajouté $B = f(T)$

B. Détermination de la liaison des IgA anti-ARA radiomarquées sur cellules DLD1 en fonction des concentrations totales en Ac ajouté $B = f(T)$

◆ : Représente la fixation totale des IgA anti-ARA radiomarquées (BT)

■ : Représente la fixation spécifique des IgA anti-ARA radiomarquées (déterminée par $BT - BNS$)

▲ : Représente la fixation non spécifique des IgA anti-ARA radiomarquées. Fixation des IgA radiomarquées en présence d'excès d'Ac froid.

b. Détermination de la fraction immunoréactive (IRF)

Des concentrations croissantes de cellules WiDr ont été incubées avec une concentration fixe en IgA anti-ACE radiomarquées. La concentration de 40 ng/ml d'Ig a été étudiée (Figure 60.A). Lorsque la concentration en cellules devient importante, on observe une saturation de la liaison spécifique, avec un plateau à 0,2. Une IRF de 0,18 soit 18% a été déterminée grâce à l'expression de l' « activité totale ajoutée / activité liaison spécifique » en fonction de l'inverse de la concentration en cellules (Figure 60.B). Cette IRF est inférieure à celle trouvée pour les IgG anti-

CD20 radiomarquées. Cette valeur indique, comme pour les IgG, que seule une partie des Ac radiomarqués sera capable de se lier à l'antigène. L'interprétation du résultat reste toutefois incertaine comme nous l'avons déjà expliqué, puisqu'il s'agit d'un mélange d'Ac radiomarqué et non radiomarqué.

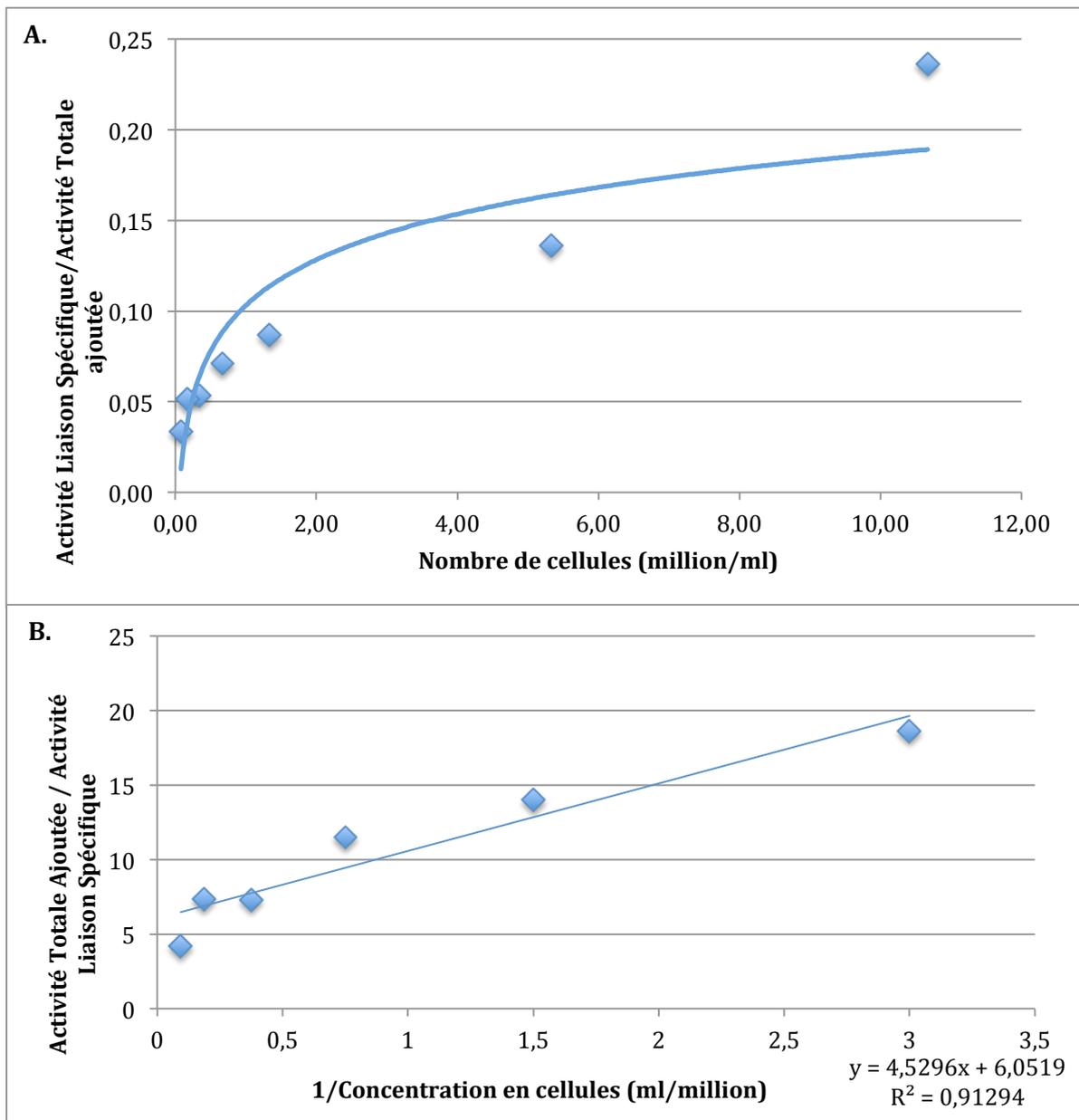


Figure 60 : Détermination de l'IRF des IgA anti-ACE radiomarquées sur cellules WiDr.

A. $(\text{Activité liaison spécifique}/\text{Activité totale ajoutée}) = f(\text{Concentration en cellules})$ à la concentration de 40 ng/ml.

B. Courbe en double inverse : $(\text{Activité totale ajoutée}/\text{Activité liaison spécifique}) = f(1/\text{Concentration en cellules})$

Les résultats que nous avons obtenus par binding sur cellules sont intéressants et concordants avec les résultats sur plaque. La mise au point de cette technique nous permet d'avoir des conditions d'étude plus proches *in vivo*, d'autant plus que les mêmes lignées cellulaires pourront être greffées pour induire des tumeurs chez la souris. Cette technique est plus contraignante puisqu'elle nécessite de mener en parallèle des cultures cellulaires dont va dépendre le nombre de concentrations qui pourra être étudié. L'écart-type du Bmax est assez important et provient du fait que l'expression antigénique cellulaire est variable selon le nombre de repiquage des cellules, leur état de confluence ou encore leur phase de cycle cellulaire. La liaison non spécifique reste assez importante. Elle est générée par la liaison non spécifique sur les tubes et les filtres, même si elle a été réduite par une pré-incubation des supports en PBS-BSA. De plus, malgré la détermination de la concentration nécessaire en Ac froid afin d'optimiser le déplacement de la liaison spécifique, nous observons que la liaison non spécifique des IgG anti-CD20 sur les EL4 CD20 est supérieure à celle de l'IgG anti-EGFR ou à celle sur les EL4 WT. A fortes concentrations, il semble donc que le déplacement ne soit pas maximal. De même pour les IgA, une liaison non spécifique pouvant aller jusqu'à 30% a été observée.

Les études de binding sur cellules ont été mises au point avec différentes lignées cellulaires, afin d'évaluer la spécificité de la liaison et de la quantifier pour les IgG et les IgA après radiomarquage. Les Kd déterminés sont concordants avec ceux trouvés par les études sur plaques et montrent une petite diminution de l'affinité après radiomarquage pour les IgG. La fraction immunoréactive a pu être déterminée pour les 2 isotypes et apparaît diminuée. S'agissant d'un mélange d'anticorps chauds et d'anticorps froid, son interprétation est complexe.

Conclusion - Perspectives

L'imagerie et la thérapie radioisotopiques des tumeurs ont connu un essor important au cours de ces dernières années. Cependant, la principale limitation qui persiste est la spécificité des ligands utilisés afin d'augmenter le rapport signal/bruit en imagerie et de diminuer les effets indésirables en radiothérapie. Les anticorps monoclonaux notamment de classe IgG et les fragments de ces anticorps ont, dans cette optique, trouvé toute leur place. Les IgG représentent, en effet, l'isotype le plus utilisé en diagnostic et en thérapie aux dépens d'autres classes jusque là délaissées comme les IgA. Les connaissances sur les IgA sont beaucoup plus restreintes que celles sur les IgG, en particulier à cause de leur difficulté de production. Elles n'ont de plus jamais été évaluées en imagerie isotopique. L'objectif de notre travail a donc été de radiomarquer les IgA et les IgG afin de disposer d'outils pour étudier et comparer leur comportement *in vivo*.

Une méthode de radiomarquage de ces deux isotypes, originale, simple et adaptée aux particularités des IgA a été optimisée. Le radiomarquage fait intervenir un synthon bifonctionnel, le 2-Iminothiolane, qui génère des groupements thiol libres servant de point d'ancrage au complexe technétié préformé, le ^{99m}Tc -Tricarboxyl. Cette technique nous a permis d'atteindre des rendements de radiomarquage beaucoup plus élevés que lorsque les Ig ne sont pas fonctionnalisées. En moyenne, des rendements supérieurs à 93% ont été obtenus, avec une bonne reproductibilité.

Les études *in vitro* de conservation des propriétés des Ig après radiomarquage sont prometteuses. La stabilité du radiomarquage en tampon PBS évaluée sur 24h est compatible avec une utilisation de ces Ig radiomarquées en routine. Néanmoins, en présence de plasma, celle-ci est moins grande, leur utilisation reste tout de même exploitable. Les études d'intégrité ont montré que les IgG et les IgA après radiomarquage conservaient leur structure. Deux techniques d'immunoaffinité complémentaires ont été mises au point. L'immunoaffinité sur plaques est une méthode plus rapide et moins fastidieuse que l'immunoaffinité sur cellules, mais elle reste plus éloignée de la réalité *in vivo*. Les Kd obtenus par ces deux techniques sont proches et montrent que l'affinité des IgG après radiomarquage est peu diminuée. Les IgA radiomarquées présentent également un faible Kd. Cependant, ces résultats encourageants sont contrebalancés par ceux obtenus pour la fraction immunoréactive, dont l'interprétation est difficile puisqu'une très faible partie des Ac est radiomarquée et que des mécanismes de compétition avec les Ac non radiomarqués existent. Des épreuves d'immunoaffinité totale ELISA, en comparant l'Ig avant et après radiomarquage sont en cours de réalisation afin de compléter et d'expliquer ces résultats. L'ensemble de ces travaux permet d'envisager la réalisation prochaine d'études *in vivo*, sur petit animal. Ces études auront pour objectif de comparer la biodistribution des IgA et des IgG après

radiomarquage chez l'animal sain et d'évaluer leur intérêt en imagerie tumorale à l'aide de modèles animaux. Ces études ne pourront être réalisées que lorsque nous disposerons des IgA et des IgG d'antigénicité identique. De plus, il serait intéressant de comparer le comportement des IgA monomérique, dimérique et sécrétoire après administration intraveineuse ou orale, voie d'administration originale pour des Ac monoclonaux suggérée par les propriétés des IgA sécrétoires. Pour étayer cette évaluation, un marquage en double isotope devrait être envisagé : radiomarquage dans un premier temps des IgA dimériques par le ^{99m}Tc et dans un second temps de la pièce sécrétoire par l' ^{123}I pour regarder l'assemblage de ces deux composés en temps réel. La connaissance du devenir des IgA après injection intraveineuse ou après administration orale permettra à terme d'orienter de manière plus efficace l'évaluation du potentiel diagnostique et thérapeutique de cet isotype.

Serment de Galien

Je jure, en présence de mes Maîtres de la Faculté, et de mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

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

Bibliographie

1. ABRAMS M. J., JUWEID M., TENKATE C. I., SCHWARTZ D. A., HAUSER M. M., GAUL F. E., FUCCELLO A. J., RUBIN R. H., STRAUSS H. W., FISCHMAN A. J. « Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats ». *J. Nucl. Med.* décembre 1990. Vol. 31, n°12, p. 2022-2028.
2. ALBERTO R., SCHIBLI R., EGLI A., SCHUBIGER A. P., ABRAM U., KADEN T. A. « A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules : Synthesis of $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand ». *J. Am. Chem. Soc.* 1998. Vol. 120, n°31, p. 7987-7988.
3. ALBERTO R., SCHIBLI R., WAIBEL R., ABRAM U., SCHUBIGER A. P. « Basic aqueous chemistry of $[\text{M}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (M=Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application ». *Coordination Chemistry Reviews.* septembre 1999. Vol. 190-192, n°0, p. 901-919.
4. ARDISSON V., MATHIEU J. P., GHEZZI C., FAGRET D. « TEMP : les possibilités de marquage à l'iode 123 ou au technétium ». *Médecine nucléaire.* Vol. 29, n°4, p. 168-178.
5. AUFORT M. *Chimiothèques de complexes du technétium et du rhénium ciblant l'intégrine $\alpha\text{V}\beta_3$: développement de traceurs pour la détection précoce de la néoangiogenèse tumorale.* Thèse de doctorat. [s.l.] : [s.n.], 2008. 311 p.
6. BALLOT E., JOHANET C. « Les immunoglobulines ». In : *Infectiologie, Pharmacie - biologie.* Rueil-Malmaison : Groupe Liaisons S.A., 2007. p. 1036. ISBN : 2915585407.
7. BARBET J., KRABER-BODÉRE F., FAIVRE-CHAUVET A., GESTIN J.-F., BARDIÈS M., CAMPION L., CHATAL J.-F. « La radio-immunothérapie préciblée des tumeurs solides : une démarche pluridisciplinaire ». *Médecine Nucléaire.* septembre 2007. Vol. 31, n°9, p. 498-505.
8. BATY D., CHAMES P. « Le point sur les anticorps autorisés en imagerie et en immunothérapie ». *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* octobre 2006. Vol. 21, n°5, p. 255-263.
9. BECKMAN R. A., WEINER L. M., DAVIS H. M. « Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors ». *Cancer.* 15 janvier 2007. Vol. 109, n°2, p. 170-179.
10. BENCHIMOL S., FUKS A., JOTHY S., BEAUCHEMIN N., SHIROTA K., STANNERS C. P. « Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule ». *Cell.* 21 avril 1989. Vol. 57, n°2, p. 327-334.
11. BIECHLIN M.-L., BONMARTIN A., GILLY F.-N., FRAYSSE M., DU MOULINET D'HARDEMARE A. « Radiolabeling of annexin A5 with $(^{99m})\text{Tc}$: comparison of HYNIC-

- Tc vs. iminothiolane-Tc-tricarbonyl conjugates ». *Nucl. Med. Biol.* août 2008. Vol. 35, n°6, p. 679-687.
12. BIECHLIN M.-L., D' HARDEMARE A. DU M., FRAYSSE M., GILLY F.-N., BONMARTIN A. « Improvement in radiolabelling proteins with the ^{99m}Tc -tricarbonyl-core [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$] $^+$, by thiol-derivatization with iminothiolane: application to γ -globulins and annexin V ». *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2005. Vol. 48, n°12, p. 873-885.
 13. BIESBROCK A. R., REDDY M. S., LEVINE M. J. « Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens ». *Infect. Immun.* octobre 1991. Vol. 59, n°10, p. 3492-3497.
 14. BIGOTT-HENNKENS H. M., DANNOON S., LEWIS M. R., JURISSON S. S. « In vitro receptor binding assays: general methods and considerations ». *Q J Nucl Med Mol Imaging*. septembre 2008. Vol. 52, n°3, p. 245-253.
 15. BODET-MILIN C., OUDOUX A., KRAEBER-BODÉRE F. « La radio-immunothérapie ». *Médecine Nucléaire*. mars 2009. Vol. 33, n°3, p. 148-151.
 16. BOSLY A. « Anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) dans les maladies hématologiques et les affections auto-immunes ». *Réanimation*. août 2006. Vol. 15, n°4, p. 270-277.
 17. BOUREL D., TEILLAUD J.-L. « Anticorps monoclonaux : tours et détours technologiques pour de nouveaux espoirs thérapeutiques ». *Comptes Rendus Biologies*. avril 2006. Vol. 329, n°4, p. 217-227.
 18. CALOP J., LIMAT S., FERNANDEZ C. *Pharmacie clinique et thérapeutique*. 3e éd.[s.l.] : Masson, 2008. 1308 p.ISBN : 2294062345.
 19. CAROSELLA E. D., AUJAME L., CARCAGNE J. « Modification des anticorps monoclonaux, immuno-ligands : applications et perspectives ». *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* [En ligne]. octobre 1990. Vol. 5, n°5, p. 9-19.
 20. CHAMES P., VAN REGENMORTEL M., WEISS E., BATY D. « Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future ». *Br. J. Pharmacol.* mai 2009. Vol. 157, n°2, p. 220-233. D
 21. CHEETHAM P. J., PETRYLAK D. P. « Alpha particles as radiopharmaceuticals in the treatment of bone metastases: mechanism of action of radium-223 chloride (Alpharadin) and radiation protection ». *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. avril 2012. Vol. 26, n°4, p. 330-337, 341.
 22. CHOPRA A. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [En ligne]. Bethesda (MD) : National Center for Biotechnology Information (US), 2004. Disponible sur: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23364/> > (consulté le 4 janvier 2012)
 23. CNHIM. *Anticancéreux : utilisation pratique (6ème édition)*. [s.l.] : [s.n.], 2008. 520 p.

24. COGNÉ M., DUCHEZ S. « Transgenesis and humanization of murine antibodies. ». *Médecine sciences : M/S*. 2009. Vol. 25, n°12, p. 1149-54.
25. COGNÉ M., SIRAC C., BARDEL M., DECOURT C., LAROCHE C. Brevet d'invention. : « Mammifère non-humain transgénique pour la région des chaînes lourdes des immunoglobulines humaines de classe A et ses applications », WO/2005/047333, demande PCT/FR2004/002701
26. COMET M., VIDAL M. *Radiopharmaceutiques: Chimie des radiotraceurs et applications biologiques*. [s.l.] : Presses Universitaires de Grenoble (PUG), 1999. 744 p.ISBN : 270610774X.
27. CREMONESI M., FERRARI M., DI DIA A., BOTTA F., DE CICCO C., BODEI L., PAGANELLI G. « Recent issues on dosimetry and radiobiology for peptide receptor radionuclide therapy ». *Q J Nucl Med Mol Imaging*. avril 2011. Vol. 55, n°2, p. 155-167.
28. CUESTA A. M., SAINZ-PASTOR N., BONET J., OLIVA B., ALVAREZ-VALLINA L. « Multivalent antibodies: when design surpasses evolution ». *Trends Biotechnol.* juillet 2010. Vol. 28, n°7, p. 355-362.
29. DECRISTOFORO C., MATHER S. J. « Preparation, ^{99m}Tc-labeling, and in vitro characterization of HYNIC and N3S modified RC-160 and [Tyr³]octreotide ». *Bioconjug. Chem.* juin 1999. Vol. 10, n°3, p. 431-438.
30. DIAS C. R., JEGER S., OSSO J. A. Jr, MÜLLER C., DE PASQUALE C., HOHN A., WAIBEL ROBERT, SCHIBLI ROGER. « Radiolabeling of rituximab with (188)Re and (99m)Tc using the tricarbonyl technology ». *Nucl. Med. Biol.* janvier 2011. Vol. 38, n°1, p. 19-28.
31. VAN DIJK M. A., VAN DE WINKEL J. G. « Human antibodies as next generation therapeutics ». *Curr Opin Chem Biol.* août 2001. Vol. 5, n°4, p. 368-374.
32. DUCHEZ S., AMIN R., COGNÉ N., DELPY L., SIRAC C., PASCAL V., CORTHÉSY B., COGNÉ M. « Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 16 février 2010. Vol. 107, n°7, p. 3064-3069.
33. DUFFY M. J. « Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? ». *Clin. Chem.* avril 2001. Vol. 47, n°4, p. 624-630.
34. DUX R., KINDLER-RÖHRBORN A., LENNARTZ K., RAJEWSKY M. F. « Determination of immunoreactive fraction and kinetic parameters of a radiolabeled monoclonal antibody in the absence of antigen excess ». *J. Immunol. Methods*. 22 novembre 1991. Vol. 144, n°2, p. 175-183.
35. EGLI A., ALBERTO R., TANNAHILL L., SCHIBLI R., ABRAM U., SCHAFFLAND A., WAIBEL R., TOURWÉ D., JEANNIN L., ITERBEKE K., SCHUBIGER P. A. « Organometallic ^{99m}Tc-aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity ». *J. Nucl. Med.* novembre 1999. Vol. 40, n°11, p. 1913-1917.

36. VAN EGMOND M., DAMEN C. A., VAN SPRIEL A. B., VIDARSSON G., VAN GARDEREN E., VAN DE WINKEL J. G. « IgA and the IgA Fc receptor ». *Trends Immunol.* avril 2001. Vol. 22, n°4, p. 205-211.
37. ELGQVIST J. « Targeted alpha therapy: part I ». *Curr Radiopharm.* juillet 2011. Vol. 4, n°3, p. 176.
38. ERNST J. A., LI H., KIM H. S., NAKAMURA G. R., YANSURA D. G., VANDLEN R. L. « Isolation and characterization of the B-cell marker CD20 ». *Biochemistry.* 22 novembre 2005. Vol. 44, n°46, p. 15150-15158.
39. FAINTUCH B. L., NÚÑEZ G. E. F., TEODORO R., MORO A. M., MENGATTI J. « Radiolabeled nano-peptides show specificity for an animal model of human PC3 prostate cancer cells ». *Clinics (Sao Paulo).* 2011. Vol. 66, n°2, p. 327-336.
40. FLATMARK K., MÆLANDSMO G. M., MARTINSEN M., RASMUSSEN H., FODSTAD Ø. « Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice ». *European Journal of Cancer.* juillet 2004. Vol. 40, n°10, p. 1593-1598.
41. FRITZBERG A. R., ABRAMS P. G., BEAUMIER P. L., KASINA S., MORGAN A. C., RAO T. N., RENO J. M., SANDERSON J. A., SRINIVASAN A., WILBUR D. S. « Specific and stable labeling of antibodies with technetium-99m with a diamide dithiolate chelating agent. ». *Proc Natl Acad Sci U S A.* juin 1988. Vol. 85, n°11, p. 4025-4029.
42. GANO L., PATRÍCIO L., MARQUES E., CANTINHO G., PENA H., MARTINS T., HNATOWICH D. J. « Human polyclonal immunoglobulin labelled with technetium-99m via NHS-MAG3: a comparison of radiochemical behavior and biological efficacy with other labelling methods ». *Nucl. Med. Biol.* mai 1998. Vol. 25, n°4, p. 395-403.
43. GOEDEMANS W. T., PANEK K. J. *Bifunctional chelating agents.* 5395946. 7 mars 1995.
44. GOLD P., FREEDMAN S. O. « Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system ». *J. Exp. Med.* 1 septembre 1965. Vol. 122, n°3, p. 467-481.
45. GOLDENBERG D M, WEGENER W. « Studies of breast cancer imaging with radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen. Immunomedics Breast Cancer Study Group ». *Acta Med. Austriaca.* 1997. Vol. 24, n°2, p. 55-59.
46. GOLDSTEIN M. J., MITCHELL E. P. « Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer ». *Cancer Invest.* 2005. Vol. 23, n°4, p. 338-351.
47. GUADAGNI F., WITT P. L., ROBBINS P. F., SCHLOM J., GREINER J. W. « Regulation of carcinoembryonic antigen expression in different human colorectal tumor cells by interferon-gamma ». *Cancer Res.* 1 octobre 1990. Vol. 50, n°19, p. 6248-6255.

48. GUGLER E., BOKELMANN G., DATWYLER A., VON MURALT G. « [Immunoelectrophoretic studies on human milk proteins] ». *Schweiz Med Wochenschr.* 13 décembre 1958. Vol. 88, n°50, p. 1264-1267.
49. HAMMARSTRÖM S. « The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues ». *Semin. Cancer Biol.* avril 1999. Vol. 9, n°2, p. 67-81.
50. HAS. *Guide-ALD n°30 : Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique. Cancer colorectal, Adénocarcinome.* janvier 2012. 57 p. Disponible sur : < http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_644453/ald-n-30-cancer-colorectal > (consulté le 4 juin 2012)
51. HAS. *Guide-ALD n°30 : Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique. Lymphomes non hodgkiniens de l'adulte.* mars 2012. 48 p. Disponible sur : < http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-06/ald_30_guide_lnh_final_web_2012-06-11_13-25-17_16.pdf > (consulté le 4 juin 2012)
52. HASSAN R., WU C., BRECHBIEL M. W., MARGULIES I., KREITMAN R. J., PASTAN I. « 111Indium-labeled monoclonal antibody K1: biodistribution study in nude mice bearing a human carcinoma xenograft expressing mesothelin ». *Int. J. Cancer.* février 1999. Vol. 80, n°4, p. 559-563.
53. HEREMANS J. F., HEREMANS M. T., SCHULTZE H. E. « Isolation and description of a few properties of the beta 2A-globulin of human serum ». *Clin. Chim. Acta.* janvier 1959. Vol. 4, n°1, p. 96-102.
54. HOLLIGER P., HUDSON P. J. « Engineered antibody fragments and the rise of single domains ». *Nat. Biotechnol.* septembre 2005. Vol. 23, n°9, p. 1126-1136.
55. HU S.-Z., SHIVELY L., RAUBITSCHKE A., SHERMAN M., WILLIAMS LAWRENCE E, WONG J. Y. C., SHIVELY JOHN E, WU ANNA M. « Minibody: A Novel Engineered Anti-Carcinoembryonic Antigen Antibody Fragment (Single-Chain Fv-CH3) Which Exhibits Rapid, High-Level Targeting of Xenografts ». *Cancer Res.* 1 juillet 1996. Vol. 56, n°13, p. 3055-3061.
56. JANSEN F. P., VANDERHEYDEN J.-L. « The future of SPECT in a time of PET ». *Nucl. Med. Biol.* octobre 2007. Vol. 34, n°7, p. 733-735.
57. KERR M A. « The structure and function of human IgA ». *Biochem. J.* 15 octobre 1990. Vol. 271, n°2, p. 285-296.
58. KÖHLER G., MILSTEIN C. « Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity ». *Nature.* 7 août 1975. Vol. 256, n°5517, p. 495-497.

59. KRAEBER-BODÉRE F., PALLARDY A., LACOMBE M., EUGÈNE T., ANSQUER C., BODET-MILIN C., ROUSSEAU C., SALAUN P.-Y., DAVODEAU F., FAIVRE-CHAUVET A., BARBET J., CHÉREL M. « Radiothérapie vectorisée : les nouvelles molécules ». *Médecine Nucléaire*. novembre 2011. Vol. 35, n°11, p. 613-616.
60. KRAEBER-BODÉRE F., ROUSSEAU C., BODET-MILIN C., FERRER L., FAIVRE-CHAUVET A., CAMPION L., VUILLEZ J.-P., DEVILLERS A., CHANG C.-H., GOLDENBERG D. M., CHATAL J.-F., BARBET J. « Targeting, toxicity, and efficacy of 2-step, pretargeted radioimmunotherapy using a chimeric bispecific antibody and ¹³¹I-labeled bivalent hapten in a phase I optimization clinical trial ». *J. Nucl. Med.* février 2006. Vol. 47, n°2, p. 247-255.
61. LAVERMAN P., DAMS E. T., OYEN W. J., STORM G., KOENDERS E. B., PREVOST R., VAN DER MEER J. W., CORSTENS F. H., BOERMAN O. C. « A novel method to label liposomes with ^{99m}Tc by the hydrazino nicotinyl derivative ». *J. Nucl. Med.* janvier 1999. Vol. 40, n°1, p. 192-197.
62. LINDMO T., BOVEN E., CUTTITTA F., FEDORKO J., BUNN P. A. Jr. « Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess ». *J. Immunol. Methods*. 3 août 1984. Vol. 72, n°1, p. 77-89.
63. LINDMO T., BUNN P. A. Jr. « Determination of the true immunoreactive fraction of monoclonal antibodies after radiolabeling ». *Meth. Enzymol.* 1986. Vol. 121, p. 678-691.
64. LIU S., EDWARDS D. S. « ^{99m}Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals ». *Chem. Rev.* 8 septembre 1999. Vol. 99, n°9, p. 2235-2268.
65. LIU S., HSIEH W.-Y., KIM Y.-S., MOHAMMED S. I. « Effect of coligands on biodistribution characteristics of ternary ligand ^{99m}Tc complexes of a HYNIC-conjugated cyclic RGDfK dimer ». *Bioconjug. Chem.* décembre 2005. Vol. 16, n°6, p. 1580-1588.
66. LIU S. « Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides ». *Adv. Drug Deliv. Rev.* septembre 2008. Vol. 60, n°12, p. 1347-1370.
67. MACPHERSON A. J., GEUKING M. B., SLACK E., HAPFELMEIER S., MCCOY K. D. « The habitat, double life, citizenship, and forgetfulness of IgA ». *Immunol. Rev.* janvier 2012. Vol. 245, n°1, p. 132-146.
68. MEARES C. F., MOI M. K., DIRIL H., KUKIS D. L., MCCALL M. J., DESHPANDE S. V., DENARDO S. J., SNOOK D., EPENETOS A. A. « Macrocyclic chelates of radiometals for diagnosis and therapy ». *Br. J. Cancer Suppl.* juillet 1990. Vol. 10, p. 21-26.
69. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. Bethesda (MD) : National Center for Biotechnology Information (US), 2004. Disponible sur : < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20641565> > (consulté le 3 août 2012)

70. MISRI R., SAATCHI K., NG S. S. W., KUMAR U., HÄFELI U. O. « Evaluation of ¹¹¹In labeled antibodies for SPECT imaging of mesothelin expressing tumors ». *Nuclear Medicine and Biology*. août 2011. Vol. 38, n°6, p. 885-896.
71. MOHAMED F. *Etude multicentrique de nouveaux marqueurs tumoraux moléculaires dans les épanchements péritonéaux et le sang : analyse par PCR quantitative en temps réel*. Thèse de doctorat. [S.l.] : [s.n.], 2010.
72. MONTEIRO RENATO C. « Role of IgA and IgA fc receptors in inflammation ». *J. Clin. Immunol.* janvier 2010. Vol. 30, n°1, p. 1-9.
73. MONTRAVERS F., NATAF V., BALOGOVA S., KERROU K., HUCHET V., PASCAL O., TALBOT J.-N. « Tomographie d'émission de positons et radiopharmaceutiques spécifiques en oncologie : exemples d'application ». *Médecine Nucléaire*. mars 2009. Vol. 33, n°3, p. 152-160.
74. MOSTOV K. E. « Transepithelial transport of immunoglobulins ». *Annu. Rev. Immunol.* 1994. Vol. 12, p. 63-84.
75. MOURA I. C., CENTELLES M. N., ARCOS-FAJARDO M., MALHEIROS D. M., COLLAWN J. F., COOPER M. D., MONTEIRO R. C. « Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy ». *J. Exp. Med.* 20 août 2001. Vol. 194, n°4, p. 417-425.
76. NOGUCHI P., WALLACE R., JOHNSON J., EARLEY E. M., O'BRIEN S., FERRONE S., PELLEGRINO M. A., MILSTIEN J., NEEDY C., BROWNE W., PETRICCIANI J. « Characterization of the WIDR: a human colon carcinoma cell line ». *In Vitro*. juin 1979. Vol. 15, n°6, p. 401-408.
77. OZKER S. K., HELLMAN R. S., KRASNOW A. Z. « Preparation of ^{99m}Tc labeled substance P (SP) ». *Applied Radiation and Isotopes*. novembre 2002. Vol. 57, n°5, p. 729-732.
78. PAK J. K., BENNY P., SPINGLER B., ORTNER KIRSTIN, ALBERTO ROGER. « N(epsilon) functionalization of metal and organic protected L-histidine for a highly efficient, direct labeling of biomolecules with [Tc(OH)₂]₃(CO)₃⁺ ». *Chemistry*. 9 mai 2003. Vol. 9, n°9, p. 2053-2061.
79. PARDOLL D. « Does the immune system see tumors as foreign or self? ». *Annu. Rev. Immunol.* 2003. Vol. 21, p. 807-839.
80. PASCAL V. *Vers l'utilisation des Immunoglobulines A humaines ou de leurs variants à des fins thérapeutiques*. Thèse de doctorat. [S.l.] : [s.n.], 2009.
81. PONTECORVO G. « Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment ». *Somatic Cell Genet.* octobre 1975. Vol. 1, n°4, p. 397-400.

82. PRIN-MATHIEU C., AGUILAR P., BÉNÉ M.-C., FAURE G., KOLOPP-SARDA M.-N. « Anticorps monoclonaux, anticorps thérapeutiques ». *Revue Française des Laboratoires*. novembre 2003. Vol. 2003, n°357, p. 31-39.
83. RENAUDINEAU Y., DEVAUCHELLE-PENSEC V., HANROTEL C., PERS J.-O., SARAUX A., YOUINO P. « Mécanismes de l'action des anticorps monoclonaux anti-CD20 et surveillance biologique de leurs effets ». *Revue du Rhumatisme*. octobre 2009. Vol. 76, n°9, p. 826-832.
84. ROBINSON M. K., DOSS M., SHALLER C., NARAYANAN D., MARKS J. D., ADLER L. P., GONZÁLEZ TROTTER D. E., ADAMS G. P. « Quantitative immuno-positron emission tomography imaging of HER2-positive tumor xenografts with an iodine-124 labeled anti-HER2 diabody ». *Cancer Res*. 15 février 2005. Vol. 65, n°4, p. 1471-1478.
85. SATPATI D., MALLIA M., KOTHARI K., PILLAI M. R. A. « Comparative evaluation of $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ precursor synthesized by conventional method and by using carbonyl kit ». *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2004. Vol. 47, n°10, p. 657-668.
86. SCHIBLI R., LA BELLA R., ALBERTO R., GARCIA-GARAYOA E., ORTNER K., ABRAM U., SCHUBIGER P. A. « Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of $(^{99m}\text{Tc}(\text{I})\text{-tricarboxyl})$ complexes: a hint for the future functionalization of biomolecules ». *Bioconjug. Chem*. juin 2000. Vol. 11, n°3, p. 345-351.
87. SCHROEDER H. W. Jr, CAVACINI L. « Structure and function of immunoglobulins ». *J. Allergy Clin. Immunol.* février 2010. Vol. 125, n°2 Suppl 2, p. S41-52.
88. STASHENKO P., NADLER L. M., HARDY R., SCHLOSSMAN S. F. « Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen ». *J. Immunol.* octobre 1980. Vol. 125, n°4, p. 1678-1685.
89. STOPAR T. G., MLINARIC-RASCAN I., FETTICH J., HOJKER S., MATHER S. J. « (^{99m}Tc) -rituximab radiolabelled by photo-activation: a new non-Hodgkin's lymphoma imaging agent ». *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. janvier 2006. Vol. 33, n°1, p. 53-59.
90. TEILLAUD J.-L. « Qu'est-ce qu'une biothérapie ? L'exemple des anticorps monoclonaux ». *La Presse Médicale*. mai 2009. Vol. 38, n°5, p. 825-831.
91. THOMPSON J. A., GRUNERT F., ZIMMERMANN W. « Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives ». *J. Clin. Lab. Anal.* 1991. Vol. 5, n°5, p. 344-366.
92. TROP HS., DAVISON A., JONES A.G., DAVIS M.A., SZALDA D.J., LIPPARD S.J. « Synthesis and physical properties of hexakis(isothiocyanato)technetate(III) and - (IV) complexes. Structure of the $[\text{Tc}(\text{NCS})_6]^{3-}$ ion. » *Inorg. Chem.* 1980. Vol. 19, p.1105-1110.

93. VERBEKE K., KIEFFER D., VANDERHEYDEN J.-L., REUTELINGSPERGER C., STEINMETZ N., GREEN A., VERBRUGGEN A. « Optimization of the preparation of ^{99m}Tc-labeled Hynic-derivatized Annexin V for human use ». *Nucl. Med. Biol.* octobre 2003. Vol. 30, n°7, p. 771-778.
94. VILAIN D., PAPATHANASSIOU D. « Imagerie fonctionnelle : spécificité des nouveaux traceurs en médecine nucléaire ». *La Revue de Médecine Interne.* mai 2012. Vol. 33, n°5, p. 241-243.
95. WAIBEL R., ALBERTO R., WILLUDA J., FINNERN R., SCHIBLI R, STICHELBERGER A., EGLI A, ABRAM U, MACH J. P., PLÜCKTHUN A., SCHUBIGER P. A. « Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex ». *Nat. Biotechnol.* septembre 1999. Vol. 17, n°9, p. 897-901.
96. WEISSER N. E., HALL J. C. « Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics ». *Biotechnology Advances.* juillet 2009. Vol. 27, n°4, p. 502-520.
97. WOOF J M, RUSSELL M. W. « Structure and function relationships in IgA ». *Mucosal Immunol.* novembre 2011. Vol. 4, n°6, p. 590-597.
98. WOOF JENNY M, KERR MICHAEL A. « The function of immunoglobulin A in immunity ». *J. Pathol.* janvier 2006. Vol. 208, n°2, p. 270-282.
99. WOOF JENNY M, MESTECKY J. « Mucosal immunoglobulins ». *Immunol. Rev.* août 2005. Vol. 206, p. 64-82.
100. YANG K., BASU A., WANG M., CHINTALA R., HSIEH M.-C., LIU SAM, HUA J., ZHANG Z., ZHOU J., LI M., PHYU H., PETTI G., MENDEZ M., JANJUA H., PENG P., LONGLEY C., BOROWSKI V., MEHLIG M., FILPULA D. « Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation ». *Protein Eng.* octobre 2003. Vol. 16, n°10, p. 761-770.
101. YAZAKI P J, WU A M, TSAI S. W., WILLIAMS L E, IKLER D. N., WONG J. Y., SHIVELY J E, RAUBITSCHKEK A. A. « Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and t84.66 minibody: comparison to radioiodinated fragments ». *Bioconjug. Chem.* avril 2001. Vol. 12, n°2, p. 220-228.
102. YAZAKI PAUL J., KASSA T., CHEUNG C., CROW D. M., SHERMAN M. A., BADING J. R., ANDERSON A.-L. J., COLCHER D., RAUBITSCHKEK A. « Biodistribution and tumor imaging of an anti-CEA single-chain antibody-albumin fusion protein ». *Nuclear Medicine and Biology.* février 2008. Vol. 35, n°2, p. 151-158.
103. YOO E. M., MORRISON S. L. « IgA: An immune glycoprotein ». *Clinical Immunology.* juillet 2005. Vol. 116, n°1, p. 3-10.

Table des matières

Remerciements	4
Sommaire	8
Abréviations	9
Introduction	11
Chapitre 1 : Revue bibliographique	13
I. Les immunoglobulines	13
A. Immunoglobulines - anticorps monoclonaux.....	13
1. Structure des immunoglobulines	13
2. Fonctions effectrices et propriétés biologiques des anticorps	16
3. Anticorps monoclonaux : des anticorps monoclonaux chimériques aux anticorps humains.....	18
B. L'immunoglobuline G.....	22
1. Structure.....	22
2. Propriétés	22
3. Utilisation des anticorps monoclonaux d'isotype G	23
4. Intérêts et limites des anticorps monoclonaux d'isotype G.....	27
C. Les variants d'anticorps	29
1. Les fragments d'anticorps (Figures 7 et 8):	29
2. Les anticorps bispécifiques	32
3. Les nanobodies et intrabodies.....	32
D. L'immunoglobuline A.....	33
1. Caractéristiques structurales des IgA.....	33
2. Production des IgA.....	36
3. Propriétés	37
4. Apports potentiels	42
II. Les cibles	45
A. Les Lymphomes non Hodgkiniens	45
1. Epidémiologie	45
2. Histoire naturelle de la maladie	46
3. Diagnostic	48
4. Prise en charge thérapeutique.....	49
5. Antigène CD20.....	50
B. Le Cancer colorectal	51
1. Epidémiologie	51
2. Description	51
3. Diagnostic	53
4. Prise en charge thérapeutique.....	54
5. Antigène ACE.....	55
III. Stratégie de radiomarquage des anticorps	56
A. Rappels de radioactivité	56
1. Définition et unités de mesure	56
2. Rayonnements.....	58
B. Applications des radioisotopes en Médecine Nucléaire	62
1. En thérapie	62
2. En diagnostic	63
C. Isotopes utilisés pour le radiomarquage d'anticorps.....	64
D. Radiomarquage au technétium 99m.....	67
1. Le technétium	67

2. Propriétés physiques et production du technétium 99m.....	67
3. Chimie du technétium	68
4. Possibilités de radiomarquage par le ^{99m} Tc.....	72
5. Méthode choisie pour le radiomarquage des IgA.....	77
IV. Présentation du travail.....	79
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	80
I. Matériel.....	80
A. Les immunoglobulines	80
B. Le technétium 99m et le cœur tricarbonyl.....	80
C. Les réactifs et les cellules	80
D. Les consommables et les instruments pour les études analytiques	81
II. Méthodes	83
A. Mise au point du radiomarquage des immunoglobulines G et A	83
1. Fonctionnalisation de l'immunoglobuline par BFCA	83
2. Complexation du technétium à un groupe chélatant.....	85
3. Complexation du chélate technétié avec les immunoglobulines greffées SH	87
4. Dosage des immunoglobulines avant et après radiomarquage	88
B. Etude de la conservation des propriétés des immunoglobulines radiomarquées	91
1. Stabilité du radiomarquage	91
2. Intégrité des immunoglobulines radiomarquées par Western Blot	91
3. Immunoaffinité des immunoglobulines radiomarquées.....	93
Chapitre 3 : Résultats et discussion	100
I. Mise au point du radiomarquage des Immunoglobulines G et A	100
A. Radiomarquage de l'Isolink® avec du pertechnétate de sodium [Na ^{99m} TcO ₄].....	100
B. Radiomarquage des immunoglobulines G.....	100
C. Radiomarquage des immunoglobulines A	105
II. Etude de la stabilité et de la conservation des propriétés des immunoglobulines radiomarquées	112
A. Stabilité du radiomarquage.....	112
B. Intégrité des immunoglobulines radiomarquées	114
C. Immunoaffinité des immunoglobulines radiomarquées sur plaques.....	115
1. Cas des ^{99m} Tc-Immunoglobulines G.....	115
2. Cas des ^{99m} Tc-Immunoglobulines A	117
D. Immunoaffinité des immunoglobulines radiomarquées sur cellules.....	120
1. Cas des ^{99m} Tc-Immunoglobulines G.....	120
2. Cas des ^{99m} Tc-Immunoglobulines A	127
Conclusion - Perspectives	135
Serment de Galien.....	137
Bibliographie.....	138
Table des matières	147
Table des figures	149
Table des tables.....	151

Table des figures

Figure 1: Structure des immunoglobulines (Ig)	15
Figure 2: Hydrolyse enzymatique des immunoglobulines par la papaïne et la pepsine	16
Figure 3: Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps (ADCC) et Cytotoxicité Dépendante du Complément (CDC)	17
Figure 4: Génération d'anticorps monoclonaux humains	20
Figure 5: Evolution de l'humanisation des anticorps monoclonaux (d'après Cogné, 2009)	20
Figure 6: Mécanisme d'action des principaux anticorps	24
Figure 7: Représentation schématique d'un Ac conventionnel (Intact antibody), et de fragments d'Ac	30
Figure 8 : Optimisation de la biodistribution intratumorale des anticorps	31
Figure 9: Modèle moléculaire des IgA1 et des IgA2m(1) humaines.....	33
Figure 10 : Représentation schématique des différentes formes monomériques, dimériques (IgA1d) et sécrétoires (IgA1s) d'IgA humaine.....	34
Figure 11: Synthèse des IgA sécrétoires	36
Figure 12 : Rôle des IgA dans la protection des muqueuses. (D'après Woof, 2005).....	42
Figure 13 : Les divers stades du cancer colorectal (D'après L'association canadienne du Cancer Colorectal)	52
Figure 14 : Pouvoir de pénétration des différents rayonnements ionisants	58
Figure 15 : Principe de fonctionnement d'une caméra TEP (site <i>laradioactivite.com</i>)	60
Figure 16 : Principe de fonctionnement d'une gamma caméra (site <i>laradioactivite.com</i>).....	61
Figure 17 : Schéma de désintégration du ⁹⁹ Mo	68
Figure 18 : Générateur de molybdène ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc.....	68
Figure 19 : Diagramme potentiel-pH du technétium dans l'eau à 25°C.....	69
Figure 20 : Principaux cœurs de technétium et état d'oxydation du cœur métallique	70
Figure 21 : Cœur monoxotechnétium	71
Figure 22 : Structure du ^{99m} Tc-HMPAO	71
Figure 23 : Structure du ^{99m} Tc-MIBI	72
Figure 24 : Réaction de marquage par voie directe (X = oxygène)	72
Figure 25 : Stratégie de marquage de peptide par approche intégrée	73
Figure 26 : Réaction de marquage par l'intermédiaire d'un chélate bifonctionnel	74
Figure 27 : Structure du complexe ^{99m} Tc-HYNIC-peptide	75
Figure 28 : ^{99m} Tc-Mertiatide.....	76
Figure 29 : Cœur tricarbonyl	76
Figure 30 : Réaction des acides aminés avec le 2-IT. Formation du groupe MBG.....	78
Figure 31 : Fixation du 2-IT sur un anticorps.....	83
Figure 32 : Formation du cœur tricarbonyl.	85
Figure 33 : Radiochromatogrammes du ^{99m} Tc-Isolink®.....	86
Figure 34 : Radiomarquage de l'Ig-SH par le ^{99m} Tc-Isolink®.....	87
Figure 35 : Radiochromatogrammes sur support ITLC-SG en phase mobile NaCl 0,9%.....	88
Figure 36 : Gammes ELISA utilisées pour doser les IgG et les IgA	90
Figure 37 : Rendements des radiomarquages des IgG en fonction du nombre de moles d'IgG et de la greffe ou non de groupements thiol.....	103
Figure 38 : Rendements de radiomarquage des IgG en fonction du nombre de moles de groupes thiol fixés.....	103

Figure 39 : Rendements des radiomarquages d'IgG avec 3 concentrations de 2-IT.	104
Figure 40 : Rendements des radiomarquages d'IgA avec 3 concentrations de 2-IT.	105
Figure 41 : Rendements des radiomarquages des IgA en fonction du nombre de moles d'IgA et de la greffe ou non de groupements thiol.	109
Figure 42 : Rendements des radiomarquages des IgA en fonction du nombre de moles de groupements thiol fixés.	109
Figure 43 : Cinétique de la stabilité du radiomarquage des IgA en présence de plasma murin à 37°C.	113
Figure 44 : Western Blot des IgG avant et après radiomarquage.	114
Figure 45 : Western Blot des IgA avant et après radiomarquage.	115
Figure 46 : Quantité en Ac fixée par puits des IgG après radiomarquage en fonction de la concentration en Ac ajoutée par ELISA avec Ag CD20.	116
Figure 47 : Détermination de l'immunoaffinité des IgG anti-CD20 radiomarquées par ELISA.	117
Figure 48 : Détermination de l'immunoaffinité des IgA anti-ACE radiomarquées par ELISA.	118
Figure 49 : Quantité en Ac fixée par puits des IgA après radiomarquage en fonction de la concentration en Ac ajoutée par ELISA avec Ag ACE.	119
Figure 50 : Détermination de la liaison des IgA anti-ARA radiomarquées par ELISA.	119
Figure 51 : Détermination de la concentration en Ac froid à utiliser pour les études d'affinité sur cellules.	121
Figure 52 : Détermination de l'immunoaffinité des IgG anti-CD20 radiomarquées sur cellules EL4 CD20.	123
Figure 53 : Immunoaffinité des IgG anti-CD20 radiomarquées sur cellules EL4 WT.	124
Figure 54 : Immunoaffinité des IgG anti-EGFR radiomarquées sur cellules EL4 CD20.	125
Figure 55 : Détermination de l'IRF des IgG anti-CD20 radiomarquées sur cellules EL4 CD20.	126
Figure 56 : Immunoaffinité des IgA anti-ACE après radiomarquage sur cellules HT29.	128
Figure 57 : Détermination de l'immunoaffinité des IgA anti-ACE radiomarquées sur cellules WiDr.	130
Figure 58 : Immunoaffinité des IgA anti-ACE radiomarquées sur cellules DLD1.	131
Figure 59 : Immunoaffinité des IgA anti-ARA radiomarquées.	132
Figure 60 : Détermination de l'IRF des IgA anti-ACE radiomarquées sur cellules WiDr.	133

Table des tables

Table 1 : Liste des anticorps monoclonaux utilisés en thérapeutique (Liste non exhaustive)	26
Table 2 : Liste des anticorps monoclonaux utilisés en diagnostic (Liste non exhaustive)	27
Table 3 : Les différents récepteurs des IgA	40
Table 4 : Récapitulatif des propriétés chimiques, physiques et biologiques des IgG et IgA humaines.....	44
Table 5: Lymphomes Non Hodgkiniens de l'adulte.	47
Table 6 : Classification cytologique des Lymphomes Non Hodgkiniens.....	48
Table 7 : Prise en charge thérapeutique des cancers colorectaux.....	55
Table 8 : Parcours et TEL des différents rayonnements ionisants.....	59
Table 9 : Comparaison clinique et préclinique des propriétés de l'imagerie TEP et TEMP (D'après Jansen, 2007)	61
Table 10 : Principaux radionucléides utilisés en RIS	66
Table 11 : Principaux radionucléides β - utilisés en RIT	66
Table 12 : Principaux radionucléides α utilisés en RIT.....	67
Table 13 : Rapports Frontaux (RF) en CCM de chaque espèce chimique pouvant être présente dans le " ^{99m} Tc-Isolink®" et dans le " ^{99m} Tc-Ig"	86
Table 14 : Lignées cellulaires testées en fonction des Ig étudiées.	96
Table 15 : Comparaison des concentrations en groupements SH fixés sur les IgG en tampon NaH ₂ PO ₄ et en tampon PBS.....	101
Table 16 : Rapport du nombre de moles de SH fixés sur le nombre de moles d'Ig en fonction de la concentration en 2-IT	104
Table 17 : Comparaison des concentrations d'Ig obtenues par 2 méthodes : ELISA et dosage des protéines totales, avec la concentration théorique après traitement ou non par 2-IT.....	106
Table 18 : Pourcentage de perte en Ig après lavage en colonne Zeba.	108
Table 19 : Etude de la stabilité du radiomarquage des Ig en PBS.....	112
Table 20 : Etude de la stabilité du radiomarquage des Ig en présence de plasma murin	112

RADIOMARQUAGE DES IMMUNOGLOBULINES A ET G AU TECHNETIUM 99M ET ETUDE *IN VITRO*

RÉSUMÉ

L'imagerie et la thérapie radioisotopiques connaissent un essor important dans la prise en charge des cancers. La principale problématique reste le ciblage sélectif des tumeurs, pour lequel les anticorps monoclonaux jouent un rôle primordial. Actuellement, seuls les immunoglobulines G et leurs fragments sont utilisés. Malgré de nombreux efforts d'amélioration en terme de cinétique et d'affinité, des limitations subsistent et nous amènent à nous intéresser à une classe d'immunoglobuline jusque là délaissée : les immunoglobulines A.

Après une revue bibliographique sur les immunoglobulines A, les antigènes CD20 et ACE et les techniques de radiomarquage, nous avons présenté notre travail portant sur le radiomarquage des immunoglobulines A et G par le technétium 99m et l'étude *in vitro* de ces immunoglobulines radiomarquées. Le radiomarquage a consisté à dériver les immunoglobulines à l'aide d'un synthon bifonctionnel, le 2-Iminothiolane, afin de générer des groupements thiol libres servant de point d'ancrage au cœur ^{99m}Tc-tricarboxyl. Cette méthode a permis d'obtenir des rendements de marquage intéressants. L'étude *in vitro* de la stabilité, de l'intégrité par Western Blot et de l'immunoaffinité de ces immunoglobulines radiomarquées a conduit à des résultats encourageants nous permettant d'envisager l'application de ces immunoglobulines radiomarquées *in vivo*. Ces travaux seront poursuivis par des études chez l'animal, afin de comparer le comportement des immunoglobulines A et G et d'évaluer leur intérêt respectif en imagerie tumorale.

MOTS CLÉS : immunoglobuline A, radiomarquage au ^{99m}Tc, études *in vitro*

^{99m}Tc-RADIOLABELING OF IMMUNOGLOBULINS G AND A AND *IN VITRO* STUDIES

ABSTRACT

Diagnostic and therapeutic uses of radioisotopes in cancers have known significant progresses in recent years. However, selectivity of radiopharmaceuticals available stays the main problem. Monoclonal antibodies appear to be a promising tracer, particularly due to their ability to target a selected antigen. Currently, only immunoglobulin G and its fragments are used, but limitations persist despite many efforts to improve kinetic and affinity. These limitations lead us to look at another class of immunoglobulin with promising characteristics, nevertheless not so much studied: immunoglobulin A.

After a literature review on immunoglobulin A, on CD20 and ACE antigens, and on radiolabeling techniques, we present our work on immunoglobulins A and G radiolabeling with technetium 99m and on radiolabeled immunoglobulins *in vitro* studies. Radiolabeling technique chosen was to label immunoglobulins with the ^{99m}Tc-tricarboxyl-core after introducing free thiol groups thanks to a Bifunctional Chelating Agent, 2-Iminothiolane. This method has permitted us to reach successful radiolabeling yields. *In vitro* studies have included radiolabeling stability, integrity by Western blot and immunoaffinity determination. Results are encouraging and allow us to consider the radiolabeled immunoglobulin prospective *in vivo* application. In next future, biodistribution of radiolabeled immunoglobulins A and G will be carried out and compare in normal animal models. Furthermore, imaging studies will be performed in mice bearing tumours models.

KEY WORDS : immunoglobulin A, ^{99m}Tc radiolabeling, *in vitro* studies