

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Médecine Nucléaire

Par

Clément BAILLY

Nouveaux Biomarqueurs en imagerie du Myélome Multiple

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 11/12/2019

Unité de recherche : INSERM 1232 (Equipe 13) du CRCINA (Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie de Nantes-Angers)

Rapporteurs avant soutenance :

Florent Cachin Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université Clermont-Auvergne

Gilles Karcher Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Lorraine

Composition du Jury :

Présidente : Françoise Kraeber-Bodéré Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Examineurs : Florent Cachin Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université Clermont-Auvergne
Gilles Karcher Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Lorraine
Nicolas Arlicot Maître de Conférence – Praticien Hospitalier, Université de Tours
Dir. de thèse : Michel Chérel Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Co-dir. de thèse : Caroline Bodet-Milin Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Nantes

Invités

Ronan Abgral

Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Bretagne Occidentale

Remerciements

Table des Matières

INTRODUCTION	14
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	16
BIOMARQUEURS CLINICO-BIOLOGIQUES DANS LE MM	17
<i>Biomarqueurs de risque</i>	19
<i>Biomarqueurs diagnostiques</i>	19
<i>Biomarqueurs pronostiques</i>	20
<i>Biomarqueurs prédictifs</i>	22
BIOMARQUEURS D'IMAGERIE DANS LE MM.....	24
<i>IRM et MM</i>	24
<i>TEP et MM</i>	25
Performance de la TEP-FDG pour la détection de la maladie au diagnostic initial de MM.	26
Valeur pronostique de la TEP-FDG au diagnostic initial de MM.....	26
Valeur pronostique de la TEP-FDG vers une transformation en MM	28
Intérêt de la TEP-FDG dans le suivi thérapeutique	28
Valeur pronostique de la TEP-FDG à la rechute dans le MM	30
QUELQUES VOIES DE DEVELOPPEMENT EN TEP POUR LE MM:.....	31
<i>L'approche semi-quantitative en TEP</i>	31
Valeur de fixation standardisée: la SUV	31
Analyse volumique.....	32
Analyse de l'hétérogénéité tumorale via l'analyse de texture	33
<i>Autres radiopharmaceutiques</i>	36
<i>L' ImmunoTEP</i>	38
Le choix du radionucléide.....	39
Le choix du vecteur	40
Le radiomarquage	41
Quelques exemples d'application de l'immuno-TEP.....	43

TRAVAIL DE THESE : ETUDES EXPERIMENTALES ET CLINIQUE	46
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	47
PREMIERE PARTIE: EVALUATION PRE-CLINIQUE D'ANTICORPS CIBLANT LE CD138	48
<i>Introduction.....</i>	49
<i>Premier Chapitre - Evaluation de la biodistribution de l'Ac anti-mCD138 couplé au Cuivre 64 chez des souris C57BL/KaLwRij greffées avec des cellules 5T33 de MM murin.....</i>	52
Introduction.....	52
Matériels et Méthodes.....	52
<i>Lignées et cultures cellulaires :</i>	52
<i>Anticorps 9E7.4, anticorps anti-mCD138.....</i>	53
<i>Anticorps Isotype contrôle IgG2a,κ</i>	53
<i>Modèle animal.....</i>	53
<i>Cuivre-64 (⁶⁴Cu)</i>	53
<i>Déroulement de l'étude in vivo.....</i>	54
Résultats	56
<i>Imagerie</i>	56
<i>Biodistributions</i>	58
Discussion :	59
Conclusion	62
<i>Deuxième Chapitre - Etude de l'apport de l'immuno-TEP avec l'Ac anti-mCD138 pour la détection du MM dans un modèle murin syngénique (C57BL/KaLwRij et cellules 5T33) en implantation sous-cutanée et systémique, en comparaison avec la TEP-FDG et la TEP au ⁶⁴CuCl₂.....</i>	63
Introduction.....	63
Matériels et Méthodes.....	63
<i>Lignées, cultures cellulaires et modèle animal:.....</i>	63
<i>Traceurs.....</i>	64
<i>Déroulement de l'étude in vivo.....</i>	64
<i>Analyse statistique</i>	67
Résultats	67

<i>Expériences de biodistribution ex vivo</i>	67
<i>Dans le modèle SC</i>	68
<i>Dans le Modèle Orthotopique</i>	71
Discussion.....	74
Conclusion.....	76
<i>Troisième Chapitre - Etude de comparaison des immuno-TEPs avec l'Ac anti-mCD138 pour la détection du MM dans un modèle murin syngénique (C57BL/KaLwRij et cellules 5T33) en implantation sous-cutanée et systémique, radiomarquées au ⁶⁴Cu ou ⁸⁹Zr</i>	78
Introduction.....	78
Matériels et Méthodes.....	78
<i>Lignées, cultures cellulaires et modèle animal:</i>	78
<i>Traceurs</i>	79
<i>Déroulement de l'étude in vivo</i>	80
<i>Analyse statistique</i>	82
Résultats.....	82
<i>Expériences de biodistribution ex vivo</i>	82
<i>Imagerie TEP</i>	83
<i>Comparaison des deux radio-immunoconjugués</i>	88
Discussion.....	91
Conclusion.....	94
<i>Quatrième Chapitre – Optimisation de l'immuno-TEP avec l'Ac anti-mCD138 pour la détection du MM dans un modèle murin syngénique (C57BL/KaLwRij et cellules 5T33) : Etude de l'apport d'une dose de pré-charge</i>	96
Introduction.....	96
Matériels et Méthodes.....	96
<i>Lignées, cultures cellulaires et modèle animal:</i>	96
<i>Traceur</i>	97
<i>Déroulement de l'étude in vivo</i>	97
<i>Analyse statistique</i>	99
Résultats.....	99
<i>Expériences de biodistribution ex vivo</i>	99
<i>Imagerie TEP</i>	100

Discussion.....	101
Conclusion	103
<i>Conclusion de la première partie.....</i>	<i>104</i>
DEUXIEME PARTIE : EXPLORATION DE PARAMETRES QUANTITATIFS D'ANALYSE DE L'IMAGERIE TEP CARACTERISANT L'HETEROGENEITE INTRA-TUMORALE DE LA DISTRIBUTION DES RADIOTRACEURS A PARTIR DES DONNEES D'EXPERIMENTATION ANIMALE	106
<i>Introduction :</i>	107
<i>Matériels et méthodes :</i>	108
Lignées, cultures cellulaires, modèle animal et protocole:.....	108
Traitement des images TEP et d'autoradiographie:.....	108
Statistiques	109
<i>Résultats</i>	109
<i>Discussion</i>	110
<i>Conclusion</i>	112
TROISIEME PARTIE : EXPLORATION DE PARAMETRES QUANTITATIFS D'ANALYSE DE L'IMAGERIE TEP CARACTERISANT L'HETEROGENEITE INTRA-TUMORALE DE LA DISTRIBUTION DES RADIOTRACEURS A PARTIR DES DONNEES CLINIQUES.....	113
<i>Introduction :</i>	114
<i>Matériels et méthodes :</i>	114
Patients.....	114
TEP-FDG.....	115
Statistiques	116
<i>Résultats</i>	117
<i>Discussion</i>	123
<i>Conclusion</i>	126
QUATRIEME PARTIE : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	127
ANNEXES	147

Liste des Abréviations

AcM: Anticorps monoclonal
Ag: Antigène
ASO-PCR: Allele-Specific Oligonucleotide PCR
BOM: Biopsie Ostéo-médullaire
CMF: Cytométrie de flux
CRCINA : Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie de Nantes-Angers
CRP: protéine C-réactive
CTR1: Copper transporter 1 protein
CXCR4: Chemokine receptor-4
DFO: Desferrioxamine
DOTA: Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
EP: Electrophorèse des protéines
EPR: Effet de perméabilité et de rétention
FCH: 18F-fluorocholine
FDG: 18Fluoro-désoxy-glucose
FISH: Fluorescent In Situ Hybridation
FLAB: Fuzzy locally adaptive bayesian
GEP: Profils d'expression génique
HER2: Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain
Ig: Immunoglobuline
IHC: Immunohistochimie
IMD: Infiltration ostéo-médullaire diffuse
IMWG: International Myeloma Working Group
IRM: Imagerie par résonance magnétique
ISS: International Staging System
ITK: Inhibiteur de la tyrosine kinase
IV: Intra-veineux
LEM: lésion extra-médullaire
LF: Lésion focale
LNH: Lymphome Non Hodgkinien
MET: C-méthionine
MGUS: Gammopathie monoclonale de signification indéterminée
MM : Myélome Multiple
MRD: Minimal residual disease
MTV: Volume métabolique tumoral
NGS: Next-generation Sequencing
OS: Overall Survival
OSEM: Order Subset Expectation Maximization
PFS: Progression Free Survival
PI: Post Injection
PM: Poids moléculaire
RC: Réponse Complète

RCM: Réponse complète métabolique
RIT: Radio-immunothérapie
SC: Sous Cutané
SMM: Smoldering multiple myeloma
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SUV: Standard Uptake Value
TEP: Tomographie par émission de positons
TLG: Total Lesion Glycolysis
ZNLU: Zone Length Non Uniformity

Liste des Figures

Figure 1: Différentes techniques d'acquisition des biomarqueurs dans le MM	17
Figure 2 : Formule de la SUV.....	31
Figure 3: Protocole expérimental de l'évaluation de la biodistribution de l'Ac anti-mCD138 couplé au ^{64}Cu vs Isotype-Contrôle	54
Figure 4: Imagerie TEP au ^{64}Cu couplé à l'anticorps anti-mCD138 à 2h (A) et 24h (B) d'une souris greffée SC présentant des hyperfixations des 2 tumeurs SC bilatérales.....	57
Figure 5: Imagerie TEP au ^{64}Cu couplé à l'isotype-contrôle à 2h (A) et 24h (B) d'une souris greffée SC.....	58
Figure 6: Biodistributions du ^{64}Cu couplé à l'anticorps anti-mCD138 et de l'isotype-contrôle obtenues par organe 24 h après l'injection des radiotraceurs, exprimées respectivement en %DI/g d'organe (A et B) et en rapport %DI/g d'organe / %DI/g de sang (C et D).....	58
Figure 7 : Protocole expérimental de l'évaluation de la biodistribution de l'AcM anti-mCD138 couplé au ^{64}Cu vs FDG et $^{64}\text{CuCl}_2$	64
Figure 8: Biodistributions du $^{64}\text{CuCl}_2$ obtenues par organe 2h et 24 h après injection, exprimées en %DI/g d'organe.....	68
Figure 9: Imagerie TEP à 2 h (A) et à 24 h (B) post-injection de $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ montrant des fixations dans les deux tumeurs sous-cutanées et d'un ganglion lymphatique iliaque.	69
Figure 10: Imagerie TEP à 2 h (A) et à 24 h (B) post-injection de $^{64}\text{CuCl}_2$ montrant des fixations dans les deux tumeurs sous-cutanées.	70
Figure 11: Acquisitions en autoradiographie Beaver de coupes sériées réalisées sur les tumeurs SC de souris respectivement injectées en $^{64}\text{CuCl}_2$ et $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$	71
Figure 12: Différentes explorations réalisées chez une souris, greffée en IV : bioluminescence (A), TEP-FDG (B), TEP au $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ (C) et analyse anatomopathologique du fémur gauche en coloration à l'Hématoxyline-Phoxine-Safran (D) retrouvant deux infiltrats plasmocytaires (E et G) séparés par de la moelle saine (F).....	72
Figure 13: Imagerie par bioluminescence (A), TEP-FDG (B), TEP au $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ à 2h (C) et 24 h post injection (D) montrant des fixations dans le crâne, le sacrum et l'aile iliaque gauche.	72
Figure 14: Imagerie par bioluminescence (A), TEP-FDG (B), TEP au $^{64}\text{CuCl}_2$ à 2h (C) et 24 h post injection (D) montrant des fixations dans le crâne.....	73
Figure 15: Imagerie par bioluminescence (A) et TEP-FDG (B), montrant des fixations dans les deux fémurs. Aucune absorption significative n'a été observée sur les images TEP 2 h (D) et 24 h (F) après l'injection de $^{64}\text{CuCl}_2$. Images sagittales représentatives du fémur gauche en imagerie TEP (C, E, G).	73

Figure 16: Protocole expérimental de l'évaluation de la biodistribution de l'AcM anti-mCD138 couplé au ^{89}Zr vs FDG et Oxalate de ^{89}Zr	80
Figure 17: Protocole expérimental de l'évaluation de la biodistribution d'AcM anti-mCD138 couplés au ^{64}Cu et ^{89}Zr vs FDG	81
Figure 18: Résultats de la biodistribution et rapports organes/sang de l'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4 et de l'oxalate de ^{89}Zr chez des souris porteuses de tumeurs. Résultats de biodistribution ex vivo (A) et rapports organes/sang (B) de l'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7E7.4 à 24 h et 72 h post-injection, dans le modèle de tumeur sous-cutanée (n = 3 pour chaque groupe). Résultats de la biodistribution ex vivo (C) et rapports organes/sang (D) de ^{89}Zr -oxalate à 24 h PI (n = 3).	83
Figure 19: Imagerie TEP après injection de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 (A), FDG (B) et oxalate de ^{89}Zr (C) chez des souris porteuses de tumeurs SC.....	84
Figure 20: Imagerie TEP à 24 h (A;D), 48 h (B;E) et 72 h (C;F) post-injection de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 dans le modèle SC	85
Figure 21 : Imagerie par bioluminescence (A) et Imagerie TEP 24 h (B;E), 48 h (C;F) et 72 h post injection (D;G) de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 dans le modèle disséminé .	86
Figure 22: Imagerie TEP et acquisitions d'autoradiographie numérique réalisées sur des fémurs de souris imagés au ^{89}Zr -DFO-9E7.4 ou oxalate de ^{89}Zr . Imagerie TEP 24h (A) et 48h (B) après l'injection de ^{89}Zr -DFO-9E7E7.4 de souris montrant des lésions fémorale gauches. Imagerie TEP 24h après injection d'oxalate de ^{89}Zr (C). Acquisitions en autoradiographie numérique réalisées sur les fémurs des souris (D).	87
Figure 23: Modification du contraste dans le modèle disséminé imagé avec l'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4 à 24h. Imagerie par bioluminescence (A) révélant des lésions dans les deux fémurs. Images TEP 24 h après l'injection de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 (B et C) montrant une fixation de ces mêmes lésions dans les deux fémurs. Imagerie par bioluminescence (D) révélant des lésions dans le sacrum, le fémur gauche et les deux ailes iliaques. Images TEP 24 h après l'injection de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 (E et F) montrant une fixation correspondante dans le sacrum, le fémur gauche et les ailes iliaques. De multiples foyers osseux faussement positifs ont également été observés.	88
Figure 24: Comparaison d'imagerie TEP avec les AcM ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 et ^{89}Zr -DFO-9E7.4. Imagerie par bioluminescence (A) révélant des lésions de la colonne vertébrale et de l'aile iliaque gauche. TEP-FDG (B; C) et imagerie TEP à 24 h post-injection de ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 (D;E), réalisées 33 jours après injection des cellules de myélome multiple. TEP-FDG (F;G) et imagerie TEP à 24 h post-injection de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 (H;I), réalisées 40 jours après injection des cellules. Les lésions identifiables ont été repérées dans le crâne, la colonne vertébrale et l'aile iliaque gauche.	89
Figure 25: Résultats de la biodistribution (A) et rapports organes/sang des AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4 et ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 (B) chez des souris porteuses de tumeurs. (n	

= 3 pour chaque groupe). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la dose radioactive injectée par gramme de tissu (% ID/g) et présentées en moyenne ± écart-type.....	90
Figure 26: Rapports tumeurs/os de ⁸⁹ Zr-DFO-9E7.4 et ⁶⁴ Cu-TE2A-9E7.4. dans le modèle tumoral sous-cutané (n = 3 pour chaque groupe).....	91
Figure 27: Protocole expérimental initial de l'évaluation de la biodistribution de l'AcM anti-mCD138 couplé au ⁶⁴ Cu avec pré-charge d'AcM « froids ».....	97
Figure 28: Protocole expérimental initial de l'évaluation de la biodistribution de l'AcM anti-mCD138 couplé au ⁶⁴ Cu avec pré-charge d'AcM « froids ».....	98
Figure 29: Résultats de la biodistribution de l'AcM ⁶⁴ Cu-TE1PA-9E7.4 avec pré-charge chez des souris porteuses de tumeurs SC.....	99
Figure 30: Résultats des ratios tissus/sang de l'AcM ⁶⁴ Cu-TE1PA-9E7.4 avec pré-charge chez des souris porteuses de tumeurs SC.....	100
Figure 31: Images TEP réalisées 24 h après injection de l'AcM ⁶⁴ Cu-TE1PA-9E7.4 en fonction des combinaisons de pré-charge chez des souris porteuses de tumeurs SC.....	101
Figure 32: Exemple d'images d'autoradiographie et TEP reconstruites selon différentes tailles de voxel	109
Figure 33: Corrélation de l'indice ZLNU (Zone Length Non Uniformity) entre les images TEP et en autoradiographie.....	110
Figure 34: Diagramme de flux d'inclusion des patients	118
Figure 35: Deux exemples de calcul de Δ SUVmax chez des patients atteints de MM sur des TEP-FDG acquises au diagnostic et après trois cycles de RVD. Toutes les LFs sont représentées en rouge. Les Δ SUVmax entre les TEP-FDG acquises au diagnostic (A,E) et après chimiothérapie (B,F) ont été calculées sur la LF la plus intense). Le premier patient présentait une LF sur le sacrum (C-D) avec un Δ SUVmax de -17,8% et a rechuté de son MM après 4,8 mois. Le Δ SUVmax pour le deuxième patient présentant une LF sur la deuxième côte gauche (G-H) était de -83,9% et la rechute est survenue après 21,5 mois.	121
Figure 36: Courbes de Kaplan-Meier pour la PFS selon le Δ SUVmax de la LF la plus intense et la réponse biochimique après trois cycles de RVD.....	122

Liste des Tableaux

Tableau 1: Principaux biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et prédictifs utilisés dans le MM.	18
Tableau 2: Biomarqueurs prédictifs de progression vers un MM.	19
Tableau 3: Caractéristiques des patients et paramètres TEP-FDG au diagnostic et après 3 cycles de RVD	119
Tableau 4: Analyse univariée des facteurs associés à la PFS après trois cycles de RVD.....	120
Tableau 5: Analyses univariée et multivariée sur la PFS après trois cycles de RVD de différentes définitions de la variation du SUVmax.....	123

Introduction

L'oncologie moderne a connu lors des 2 dernières décennies des avancées considérables sur les plans scientifique et technologique, qui ont ouvert la voie à la médecine personnalisée. Cette dernière se définit comme une prise en charge individualisée, où chaque patient reçoit un traitement adapté, optimal compte tenu des spécificités de son cancer : le concept du « bon traitement pour le bon patient et la bonne maladie ». Toute tumeur est unique. Chaque type de cancer inclut en effet des sous-types présentant des signatures biologiques différentes qui se distinguent par leur pronostic clinique et leur réponse au traitement. La médecine personnalisée nécessite donc l'identification de caractéristiques anatomiques, biologiques, génétiques, métaboliques, fonctionnels... pertinents, associés au patient et à sa pathologie. Ces caractéristiques mesurées de façon objective et évaluées comme des indicateurs fiables de processus biologiques physiologiques ou pathologiques sont appelées « des biomarqueurs ». Ce terme, bien que peu récent, est aujourd'hui largement employé, le développement de la biologie moléculaire et l'avènement des « omiques » ayant largement participé à l'accélération de la recherche dans ce domaine. La caractérisation fine des tumeurs a permis d'identifier des biomarqueurs diagnostiques, prédictifs de la réponse aux agents thérapeutiques, ou encore pouvant être utilisés comme cibles de thérapies ciblées. Ainsi, aujourd'hui, la notion de biomarqueur ne correspond plus nécessairement à une caractéristique unique biologique mesurée ex vivo mais inclut des caractéristiques physiologiques complexes acquises par différentes technologies. L'imagerie en médecine nucléaire s'inscrit parfaitement dans cette démarche en permettant d'observer in vivo, de façon non invasive, l'expression et la distribution des biomarqueurs accessibles dans les cibles tumorales.

Le Myélome Multiple (MM) est une pathologie idéale pour ce type d'approche. Le MM est une hémopathie maligne caractérisée par la prolifération clonale de plasmocytes malins dans la moelle osseuse ¹. C'est une maladie rare qui représente environ 80 % des gammopathies monoclonales malignes et 15 % des hémopathies malignes¹. Cette affection touche préférentiellement les sujets de plus de 40 ans avec un pic de fréquence entre 65 et 70 ans. Avant les années 1990, le faible arsenal thérapeutique imposait que l'on attende de l'apparition de symptômes cliniques (anciens critères « CRAB ») pour initier la prise en charge thérapeutique.

Heureusement, le paysage thérapeutique du MM a considérablement évolué depuis, notamment grâce à l'arrivée de nouvelles molécules, telles que les inhibiteurs du protéasome, qui ont transformé le pronostic de la maladie. Par ailleurs, la meilleure compréhension de la biologie tumorale a permis une profonde réactualisation des critères diagnostiques et des indications thérapeutiques du MM. Cette pathologie n'est donc aujourd'hui plus seulement définie par des symptômes mais par un ensemble de biomarqueurs prenant en considération à la fois les données cliniques, biologiques, immunologiques, cytogénétiques et d'imagerie ². Ce changement radical de la gestion des patients conjuguant l'utilisation d'une polythérapie moderne et une prise en charge personnalisée a permis de prolonger considérablement la survie globale des patients atteints de MM. La survie médiane des patients atteints de MM nouvellement diagnostiqué a ainsi augmenté d'environ 2,5 ans dans les années 1990 à près de 4 ans de nos jours. Certains patients présentent même une amélioration de la survie sans récurrence, supérieure à 10 ans.

Toutefois, malgré ces progrès, le MM reste encore une maladie incurable et l'identification de nouveaux biomarqueurs permettant de mieux sélectionner les patients de mauvais pronostic éligibles à une thérapie plus intensive demeure plus que jamais d'actualité ^{1,2}.

Ce travail s'articule en deux grandes parties :

- La première partie présente des généralités sur les biomarqueurs utilisés dans la prise en charge des MM, en insistant sur les biomarqueurs d'imagerie notamment en médecine nucléaire, et sur 2 futurs axes de développement des biomarqueurs que sont l'immunoTEP et l'analyse quantitative.

- La deuxième partie est consacrée aux travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de l'unité INSERM 1232 (Equipe 13) du CRCINA (Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie de Nantes-Angers) et de l'équipe de Médecine Nucléaire du CHU de Nantes. Ces travaux ont consisté en l'évaluation d'un anticorps radiomarqué anti-CD138 pour l'immunoTEP du MM et à l'exploration dans des modèles pré-cliniques et cliniques de la valeur potentielle de paramètres quantitatifs d'analyse de l'imagerie TEP caractérisant notamment l'hétérogénéité intra-tumorale de la distribution des radiotraceurs.

Données bibliographiques

Biomarqueurs clinico-biologiques dans le MM

Tous les biomarqueurs décrits dans la littérature ne seront pas détaillés ci-après. Beaucoup sont issus de cohorte unique et n'ont jamais été testés dans des cohortes indépendantes, ce qui limite leur significativité. Schématiquement, les biomarqueurs peuvent être classés selon les différentes techniques employées pour acquérir ces données (Figure 1). Les biomarqueurs d'imagerie et notamment ceux issus de la médecine nucléaire seront ainsi présentés dans une partie à part. Il est également possible de les trier selon les différents types d'objectifs poursuivis. Ainsi, selon leur fonction, on décrit les biomarqueurs de risque (évaluent un risque de développer une pathologie), les biomarqueurs diagnostiques (établissent un diagnostic précis), les biomarqueurs pronostiques (permettent de prédire ou suivre l'évolution d'une pathologie) et les biomarqueurs prédictifs (prédisent la réponse thérapeutique) (Tableau 1).

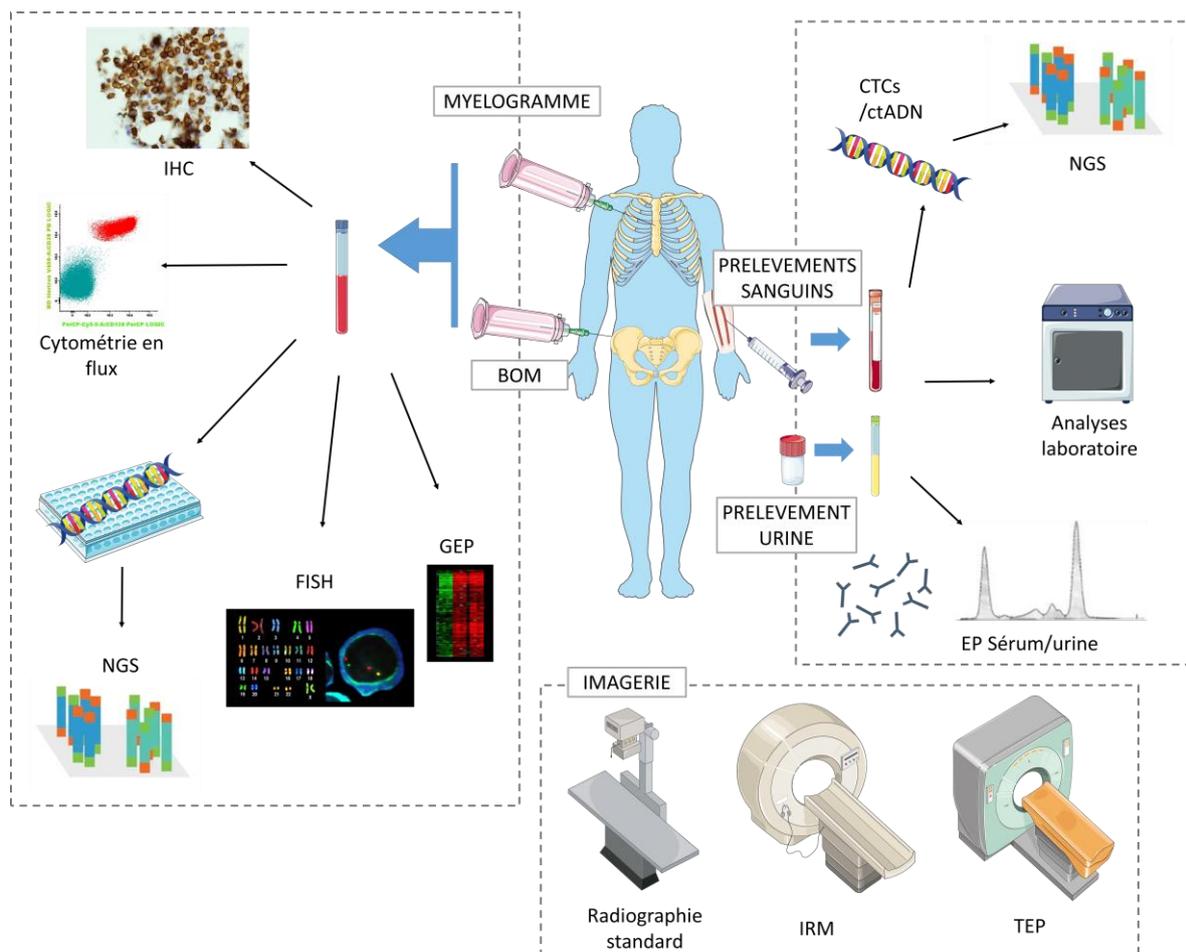


Figure 1: Différentes techniques d'acquisition des biomarqueurs dans le MM ³

Tableau 1: Principaux biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et prédictifs utilisés dans le MM. ^{2,4,5}

Fonctions	Biomarqueurs
Diagnostic	<ul style="list-style-type: none"> - plasmocytose médullaire clonale $\geq 10\%$ ou plasmocytome prouvé histologiquement - présence d'au moins un des critères suivants : <ul style="list-style-type: none"> - hypercalcémie ($> 0,25$ mmol/L par rapport à la normale ou $> 2,75$ mmol/L), - insuffisance rénale (créatinine > 177 mmol/L ou Cl créatinine < 40 mL/min), - anémie (Hb < 2 g/dL par rapport à la normale ou < 10 g/dL), - ≥ 1 lésion ostéolytique (radiographies standard, scanner corps entier faibles doses, TEP scanner), - plasmocytose médullaire clonale $\geq 60\%$, - rapport κ/λ ou $\lambda/\kappa \geq 100$ (avec concentration de la chaîne légère monoclonale ≥ 100 mg/L),
Pronostic	
<i>Risque faible</i>	<ul style="list-style-type: none"> - ISS I/II et absence de t(4;14) ou del 17p13 - âge < 55 ans
<i>Risque élevé</i>	<ul style="list-style-type: none"> - ISS II/III et présence de t(4;14) ou del 17p13 - t(14;16) - Présence de plasmocytes circulants - LDH $> 2N$ - GEP 70, IFM-15 - âge > 65 ans - IRM lésions focales > 7 - TEP-FDG lésions focales > 3 - TEP-FDG SUVmax $> 4,2$
Prédictif	- Critères IMWG MRD négatifs

Biomarqueurs de risque

Il est de plus en plus établi que tous les MM sont précédés d'une gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), puis d'une phase indolente, dite « smoldering multiple myeloma » (SMM). Cette dernière se définit par la présence d'une protéine monoclonale dans le sérum ou d'une prolifération plasmocytaire médullaire excessive, en l'absence de critères cliniques et biologiques de MM ². Cette entité est assez hétérogène avec un risque de progression vers un MM estimé à 5-10 % par an. Ainsi, l'enjeu principal de cette pathologie est d'en évaluer le risque évolutif, afin de tenter de cibler les patients à haut risque de progression, qui pourraient bénéficier d'une stratégie thérapeutique précoce. Plusieurs facteurs pronostiques permettant d'identifier les patients porteurs de MGUS ou de SMM avec un risque de progression estimé à environ 25 % par an ont été rapportés (médiane de progression 2 ans) ^{6,7}. Ces « biomarqueurs prédictifs » sont décrits dans le Tableau 2.

Tableau 2: Biomarqueurs prédictifs de progression vers un MM.

- SMM IgA
- Rapport κ/λ ou $\lambda/\kappa \geq 8$ mais < 100
- Progression du pic (augmentation ≥ 25 % sur 2 prélèvements consécutifs sur une période de 6 mois)
- Pourcentage de plasmocytes médullaires normaux < 5 %
- t(4;14) ou del(17) ou 1q gain
- Augmentation du taux de plasmocytes circulants
- Infiltrat diffus ou 1 lésion focale sur l'IRM
- TEP avec ≥ 1 lésion focale hypermétabolique mais sans lyse osseuse sous-jacente

Biomarqueurs diagnostiques

L'International Myeloma Working Group (IMWG) a publié, fin 2014, une actualisation des critères diagnostiques du MM ². Ces derniers consistent à mettre

en évidence l'infiltration médullaire par les plasmocytes tumoraux, caractériser la protéine monoclonale et évaluer une éventuelle atteinte des organes cibles. Ainsi, selon les critères internationaux, le diagnostic de MM est défini par la présence d'une plasmocytose médullaire clonale $\geq 10\%$ ou d'un plasmocytome prouvé histologiquement, associée à au moins l'un des critères suivants :

- hypercalcémie ($> 0,25$ mmol/L par rapport à la normale ou $> 2,75$ mmol/L),
- insuffisance rénale (créatinine > 177 mmol/L ou Cl créatinine < 40 mL/min),
- anémie (Hb < 2 g/dL par rapport à la normale ou < 10 g/dL),
- ≥ 1 lésion ostéolytique sur le bilan d'imagerie (radiographies, scanner ou TEP)
- > 1 lésion focale sur l'IRM
- plasmocytose médullaire clonale $\geq 60\%$,
- rapport κ/λ ou $\lambda/\kappa \geq 100$ (avec concentration de la chaîne légère monoclonale ≥ 100 mg/l).

Biomarqueurs pronostiques

L'évolution du MM est très hétérogène. De nombreuses études ont été menées pour identifier des facteurs pronostiques de survie ⁸⁻¹². Initialement, ces biomarqueurs étudiés étaient principalement liés aux complications de la maladie. L'amélioration constante des méthodes d'exploration du clone tumoral ouvre de nouvelles perspectives en offrant la possibilité de prédire l'évolution des patients de manière plus performante et plus précise ³.

Biomarqueurs pronostiques liés au patient

L'âge supérieur à 65 ans et l'état général du patient mesuré par le « performans status » sont deux facteurs pronostiques puissants dans le MM quel que soit le traitement ¹³.

Biomarqueurs pronostiques liés à la masse tumorale

L'importance de la masse tumorale a été l'un des premiers facteurs pronostiques identifié. La classification de Salmon et Durie est la méthode de référence ². Différents paramètres sont pris en compte incluant l'isotype de la chaîne lourde, l'importance du taux de composant monoclonal, le taux d'hémoglobine, l'étendue des lésions osseuses et la calcémie. Cette classification reste néanmoins peu utilisée aujourd'hui. D'autres paramètres ont en effet été identifiés, au premier rang desquels se trouve le taux de β 2-microglobuline sérique. Conjugué au dosage de l'albuminémie, il permet d'établir « l'International Staging System » (ISS). Ce score simple a été révisé en 2015 par l'IMWG pour y incorporer les LDH et la présence d'anomalies cytogénétiques de haut risque (déletion 17p, t(4 ;14) et/ou t(14 ;16)). Le score ISS sous sa forme révisée est aujourd'hui le biomarqueur pronostique de référence dans le bilan initial du MM ².

Plus récemment, d'autres facteurs sériques ont été décrits, reflétant également l'importance de la masse tumorale. Le plus fréquemment cité est le taux sérique de CD138 soluble ^{14,15}. Le CD138 est exprimé électivement à la surface des plasmocytes dans la moelle osseuse, qu'ils soient normaux ou tumoraux. Il peut être clivé par diverses protéases, conduisant à la libération de CD138 soluble dans le plasma. Des taux sériques élevés corrélerent avec une survie significativement plus courte, sans apporter une significativité plus importante ¹⁵. Il n'est en pratique pas analysé en routine à ce jour.

Biomarqueurs pronostiques liés au clone tumoral

Différents facteurs liés à la cellule tumorale elle-même interviennent dans la détermination du pronostic ^{5,8,16}. Le paramètre le plus anciennement connu concerne les capacités prolifératives des plasmocytes malins. Ainsi, le degré de prolifération est inversement corrélé avec la survie. La principale difficulté d'utilisation de ce paramètre réside dans la nécessité d'une analyse immédiate après le prélèvement, les capacités prolifératives s'éteignant rapidement *ex vivo*.

L'analyse des anomalies chromosomiques a probablement été la principale avancée de ces dernières années dans la détermination du pronostic lié au clone tumoral du MM. Plusieurs techniques peuvent être utilisées, comme l'hybridation in

situ en fluorescence (FISH), les profils d'expression génique (GEP) ou les recherches d'anomalies de nombre de copies de l'ADN par la SNParray (Single Nucleotide Polymorphism array). En routine clinique, les deux principales anomalies recherchées sont la translocation t(4;14) et la délétion du bras court du chromosome 17 (del(17p)) en FISH. En effet, ces 2 anomalies sont associées à un pronostic péjoratif, tant en termes de survie sans progression que de survie globale. D'autres anomalies structurales et numériques ont également été décrites dont les plus fréquentes sont la perte de matériel chromosomique sur le chromosome 13 (del(13)), la translocation t(14;16), les gains de copies supplémentaires du bras long du chromosome 1 (gain 1q) ou l'hyperdiploïdie. Deux études fondées sur de grandes cohortes de patients ont ainsi identifié deux grands groupes de gènes (GEP 70 de l'UAMS¹⁷ et modèle 15 gènes de l'IFM¹⁸) permettant d'individualiser des patients de haut risque. Ces scores bien que validés sur des cohortes externes et indépendantes de patients restent peu utilisés en pratique quotidienne.

D'autres paramètres pronostiques sont plus difficilement classables, reflétant les interactions entre les cellules tumorales et les cellules de l'environnement. Parmi ceux-ci, le taux sérique de protéine C-réactive (CRP) est très fréquemment utilisé³. L'élévation du taux de CRP reflète l'action de l'interleukine-6, cytokine importante dans la prolifération et la survie des plasmocytes et est corrélée à une survie significativement plus courte.

Biomarqueurs prédictifs

Aujourd'hui, la définition de réponse complète (RC) nécessite une normalisation de l'immunofixation sérique et urinaire et du myélogramme^{4,19}. Avec les stratégies actuelles d'intensification thérapeutique, 60 à 70 % des patients éligibles obtiennent une RC en fin de traitement selon ces critères. Toutefois, cette donnée cache une hétérogénéité interindividuelle considérable. La qualité de cette réponse impacte directement le devenir à long terme des patients : plus la réponse est profonde, plus la survie sans progression ou la survie globale sont bonnes. L'évaluation de la maladie résiduelle (MRD pour minimal residual disease) est donc un facteur prédictif et pronostique majeure dans le MM. Des outils toujours plus sensibles sont donc développés et plusieurs technologies répondent actuellement à ce besoin : la

cytométrie de flux (CMF), le séquençage de nouvelle génération (NGS pour Next Generation Sequencing), ou l'ASO-PCR (Allele-Specific Oligonucleotide PCR). Les critères de réponse au traitement ont été mis à jour par l'IMWG en 2016 afin d'inclure ces différents seuils de profondeur de réponse ⁴.

Biomarqueurs d'imagerie dans le MM

En parallèle des avancées technologiques en biologie moléculaire, le MM a largement bénéficié des progrès de l'imagerie en coupe. Dans cette pathologie où presque 80% des patients présentent une atteinte osseuse au diagnostic, l'imagerie joue en effet un rôle essentiel. Le bilan radiographique standard du squelette constituait jusqu'à peu l'examen de référence. Bénéficiant d'une sensibilité et spécificité nettement supérieures, le scanner, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie par émission de positons (TEP) au ¹⁸Fluoro-désoxy-glucose (FDG) ont, depuis 2014, été intégrés aux critères diagnostiques du MM ^{2,19}. Selon ces derniers, la mise en évidence d'une lésion ostéolytique ≥ 5 mm quelle que soit la technique d'imagerie est un critère suffisant pour définir une atteinte osseuse devant être considérée comme un critère de traitement. Toutefois, aujourd'hui, limiter l'utilisation de l'imagerie médicale à ce simple biomarqueur semble extrêmement réducteur tant l'IRM et la TEP-FDG offrent d'autres possibilités. Ces 2 examens prennent en effet une place de plus en plus importante dans la prise en charge des patients atteints de MM.

IRM et MM

Chez les patients atteints de MM symptomatique, les recommandations internationales préconisent la réalisation d'une IRM corps entier afin de détecter la maladie osseuse au moment du bilan initial ². L'IRM permet en effet une imagerie extrêmement précise du squelette axial et détecte une atteinte osseuse chez plus de 90% des patients présentant un MM symptomatique. Elle représente également la procédure de choix pour évaluer une lésion douloureuse et détecter une compression médullaire. L'IRM est particulièrement utile dans l'évaluation des tassements vertébraux, surtout quand le MM n'est pas actif et que le risque de fracture ostéoporotique est élevé ^{20,21}.

La valeur pronostique de l'IRM a également été évaluée dans plusieurs études ^{22,23}. Le nombre de lésions lytiques (> 7) et l'aspect d'infiltration diffuse apparaissent des biomarqueurs pronostiques majeurs permettant de discriminer plus facilement des patients à haut risque évolutif.

Dans le suivi thérapeutique, les performances de l'IRM sont moins bonnes en raison de la fréquence élevée des faux positifs et d'autres techniques d'imagerie peuvent être proposées en fonction de l'impact clinique, notamment la TEP-FDG^{4,24}.

En parallèle, l'IRM est recommandée chez les patients atteints de SMM: les patients présentant plus de 1 lésion focale (> 1 LF) non équivoque (diamètre > 5 mm) doivent être considérés comme atteints d'un MM symptomatique nécessitant un traitement²⁰. Chez les patients présentant des anomalies équivoques en IRM, le bilan peut être complété par une imagerie scanographique pour confirmer l'atteinte osseuse asymptomatique. De plus, il est proposé de répéter l'IRM après 3 à 6 mois dans le suivi des patients atteints de SMM. Enfin, pour les patients atteints de MGUS, l'IRM n'est pas recommandée en l'absence de signe clinique faisant suspecter une évolutivité vers un MM.

TEP et MM

La TEP-FDG est une imagerie corps entier tridimensionnelle non invasive ayant été validée dans de nombreuses indications en oncologie, ces dernières années, pour l'évaluation initiale, de fin de traitement ou l'évaluation thérapeutique précoce de différentes tumeurs solides (carcinomes bronchiques, ORL, colorectaux, mélanomes...) ²⁵⁻²⁷ ou d'hémopathies (lymphomes B diffus à grandes cellules ou hodgkiniens) ²⁸⁻³⁰.

La TEP-FDG est validé pour le bilan initial et le suivi thérapeutique des patients atteints de MM. Certaines données récentes de la littérature ont effectivement montré que la TEP-FDG permettrait un meilleur bilan d'extension de la maladie au moment du diagnostic par rapport à l'IRM et que l'examen aurait une valeur pronostique importante au bilan initial mais également lorsqu'il se normalise après les cycles initiaux de chimiothérapie, et en fin de traitement. De même, comme pour l'évaluation des lymphomes, les critères d'interprétation devront être standardisés pour utiliser la TEP-FDG dans l'évaluation des MM en routine. L'ensemble de ces éléments sont détaillés ci-après.

Performance de la TEP-FDG pour la détection de la maladie osseuse au diagnostic initial de myélome

La TEP-FDG permet une exploration du corps entier et de la totalité du squelette et présente une sensibilité de l'ordre de 90% pour la détection de lésions myélomateuses. On retrouve au niveau osseux des LF, des atteintes diffuses ou des atteintes mixtes avec une captation variable du glucose se traduisant par des valeurs variables d'intensité de fixation mesurée par la SUV (pour « Standard Uptake Value ») ^{20,22,31-34} La TEP-FDG permet également la détection des lésions extramédullaires (LEM) dans environ 10% des patients au diagnostic. La spécificité de la TEP-FDG dans le MM varie de 70 à 100% selon les études ^{22,32}.

La sensibilité de la TEP-FDG est supérieure au bilan radiologique standard du corps entier montrant des lésions supplémentaires chez la moitié des patients avec cependant des faux négatifs pour les lésions crâniennes de petites tailles détectées par les radiographies standards ^{2,33}. L'étude prospective comparative française IMAJEM a comparé les taux de détection de la TEP-FDG et de l'IRM au bilan initial et a retrouvé des résultats comparables avec les deux techniques, détectant des anomalies chez plus de 90% des patients ³⁵. Enfin, la TEP-FDG permet la détection des lésions myélomateuses situées en dehors du champ de vue de l'IRM.

Chez les patients atteints de plasmocytome solitaire, la TEP FDG détecte des lésions supplémentaires, avec une sensibilité et une spécificité supérieure à l'IRM ³¹.

Valeur pronostique de la TEP-FDG au diagnostic initial de myélome

Le principal intérêt de la TEP-FDG dans le MM réside dans les informations pronostiques qu'elle apporte. La TEP-FDG et l'IRM ont d'abord été comparées dans une grande série prospective de 239 patients, traités de façon homogène en première ligne dans le programme de double autogreffe dit « total therapy » du groupe de Little-Rock, Arkansas, pour évaluer la valeur pronostique respective de ces examens³⁶. En analyse multivariée, le seul examen d'imagerie associé de façon significative à un pronostic défavorable tant pour la survie globale que pour la survie sans événement était la TEP-FDG lorsque le nombre de LF était supérieur à 3 au diagnostic. Le nombre de LF sur l'IRM initiale (7 et plus) affectait la survie sans

événement (PFS pour Progression Free Survival) mais pas la survie globale (OS pour Overall Survival).

La valeur pronostique du nombre de LF sur la TEP-FDG initiale a ensuite été confirmée dans une large série de 192 patients atteints de MM rentrant dans un programme de double autogreffe après une induction comprenant du thalidomide et de la dexaméthasone ³⁷. Dans cette étude, un nombre d'au moins 3 LF (44% des cas), une SUV > 4,2 (46% des cas), la présence de LEM (6%) affectaient négativement la PFS à 4 ans. La SUV > 4,2 et la présence de LEM étaient aussi associées à une OS plus courte.

La valeur pronostique de la TEP-FDG a également été étudiée dans une série de 61 patients au moment du diagnostic de MM ou plasmocytome solitaire ³⁸. Une corrélation était retrouvée entre les LEM les plus fixantes, la fixation ostéo-médullaire (p = 0,027) et le score ISS (p = 0,048). La SUVmax ostéo-médullaire était corrélée à l'ISS (p = 0,013). Les 44 patients positifs en TEP-FDG avaient une survie estimée à 5 ans, inférieure (61%) aux 11 patients TEP-FDG négatives, tous vivants à 5 ans (p = 0,01). En analyse multivariée, seule la présence de LEM fixant de manière intense avait une valeur pronostique sur la survie globale (p = 0,03). L'étude française IMAJEM a confirmé la valeur pronostique négative des LEM au diagnostic initial de MM ³⁵.

Une autre étude menée chez 59 patients au diagnostic initial de MM ne retrouvait pas de différence en termes de caractéristiques cliniques entre les patients présentant une SUVmax < ou >4, alors qu'il existait des différences significatives entre les patients avec un nombre de LF <3 et ceux avec LF >3 pour la bêta2-microglobuline, les LDH, la présence d'une anémie et le score de Salmon et Durie ³⁹.

Une corrélation a été rapportée entre les valeurs de SUVmax, le degré d'infiltration médullaire et le ratio de plasmocytes (r = 0.54 and r = 0.74, p < 0,01) chez 42 patients, 32 au diagnostic initial de MM et 10 en évaluation thérapeutique ⁴⁰.

Des biomarqueurs TEP plus complexes, tels que les volumes fonctionnels et l'hétérogénéité tumorale, ont également été étudiés ou sont en cours d'évaluation avec des résultats prometteurs car permettant de quantifier la charge fonctionnelle

de la maladie. Une étude menée dans une large série de 192 patients a confirmé la valeur pronostique du volume métabolique tumoral (MTV) et a également montré la valeur pronostique du TLG (pour « Total lesion glycolysis ») ⁴¹. Dans cette dernière étude, l'analyse multivariée montrait en baseline qu'un TLG > 620 g et un MTV > 210 cm³ affectaient péjorativement la PFS et l'OS après ajustement pour les facteurs pronostiques connus. Combiné avec le score pronostique GEP70, un TLG > 205 g identifiait un sous-groupe de patients à haut risque. De plus, un TLG > 205 g séparait les patients ISS II en deux sous-groupes avec un devenir comparable aux patients ISS I et ISS III.

Enfin, comme décrit par Carlier et al. pour 62 patients dans l'étude française IMAJEM, les caractéristiques texturales intra-tumorales (par exemple, reflétant l'hétérogénéité de la tumeur), et particulièrement l'entropie, semblent également avoir une valeur pronostique (valeur pronostique indépendante de l'entropie sur la PFS)⁴². Des travaux supplémentaires sont en cours sur ce sujet.

Valeur pronostique de la TEP-FDG vers une transformation en myélome

Chez les patients atteints de plasmocytome solitaire, la présence d'au moins 2 lésions hypermétaboliques en TEP-FDG est prédictive d'une évolution rapide vers un MM ⁴³.

Chez les patients suivis pour un SMM, la positivité de la TEP-FDG semble augmenter le risque de progression vers un MM. Dans une série de 120 patients suivis pour un SMM, l'équipe de Bologne rapportait une positivité de la TEP-FDG dans 16% des cas et la probabilité de progression dans les 2 ans était de 58% pour les patients TEP positive contre 33% pour les patients TEP négative ⁴⁴.

Intérêt de la TEP-FDG dans le suivi thérapeutique

L'obtention d'une RC métabolique (RCM) en TEP-FDG lors de l'évaluation intermédiaire avant autogreffe ou après autogreffe est associée à de meilleurs taux de survie. Bartel et al. montraient en 2009 que la normalisation de la fixation du

FDG au niveau des LF après les cycles initiaux de chimiothérapie et avant la procédure d'autogreffe était associée à une meilleure PFS et OS ³⁶. Confrontée aux profils génétiques, la RCM avant autogreffe conférait une meilleure OS chez les patients à bas risque et une meilleure PFS chez les patients à haut risque. La même équipe rapportait en 2013 chez des patients traités selon le même protocole intensif (Total Therapy 3) la valeur pronostique de la TEP-FDG précoce réalisée au septième jour de l'induction dans une série de 302 patients, 277 d'entre eux ayant aussi bénéficié d'une étude du profil d'expression des gènes ⁴⁵. L'analyse multivariée concluait qu'un nombre $>$ à 3 LF sur la TEP-FDG à J7 était associé à une PFS et une OS inférieures même dans le groupe de patients à haut risque selon le profil génétique, la TEP-FDG pouvant être envisagée comme un outil d'adaptation thérapeutique précoce.

Dans la série italienne de 192 patients, la persistance d'une SUV $>$ 4,2 après l'induction thérapeutique était associée à une réduction de la PFS ³⁷. Trois mois après l'autogreffe, une RCM était obtenue chez 65% des patients, avec une PFS et une OS à 4 ans supérieures à celles des patients TEP-positives. Il est intéressant de noter que dans cette étude, 23% des patients obtenant une RC selon les critères conventionnels étaient considérés TEP-positives. L'analyse multivariée montrait que le statut TEP après autogreffe était un facteur pronostique indépendant de la PFS. L'équipe de Bologne confirmait ces résultats en 2015 chez 282 patients atteints de MM symptomatique traités en première ligne entre 2002 et 2012 ⁴⁶. Le suivi était de 67 mois. Après traitement, une RCM était obtenue chez 70% des patients alors que les méthodes conventionnelles concluaient à 53% de RC. La négativité de la TEP affectait la PFS et la survie globale positivement. Chez 12% des patients ayant rechuté, la progression osseuse était uniquement détectée par la TEP-FDG réalisée dans le suivi systématique et l'analyse multivariée montrait qu'une SUVmax $>$ 4,2 après le traitement de première ligne était un facteur indépendant prédisant la progression sur l'imagerie métabolique.

L'étude prospective IMAJEM a également confirmé l'intérêt de la TEP-FDG pour l'évaluation thérapeutique du MM dans une population de 134 patients traités par une lenalidomide, bortezomib et dexaméthasone (RVD) avec ou sans autogreffe, suivi par lenalidomide en maintenance ³⁵. Alors que la normalisation de l'IRM après 3 cycles de RVD et avant la maintenance n'affectait ni la PFS, ni l'OS, la PFS des

patients TEP-négative à 3 cycles était meilleure que celle des patients TEP-positive (PFS à 30 mois de 78,7% versus 56,8). La normalisation de la TEP-FDG avant la maintenance était associée à une meilleure PFS et OS.

L'intérêt de la TEP en post-autogreffe a également été rapporté en 2013 dans une série prospective de 77 patients évalués par TEP-FDG 3 mois après l'autogreffe puis tous les 6 à 12 mois dans le suivi ⁴⁷. Les patients étaient classés en groupe 1 (rechute) et groupe 2 (absence de rechute). Dans le groupe 1, la durée de la réponse était plus longue quand la TEP était négative (27,6 mois) que quand elle était positive (18 mois) ($p = 0,05$) avec chez les patients TEP-positive une SUVmax inversement corrélée à la durée de la réponse ($p < 0,01$). Dans le groupe 2, 27 patients avaient une TEP-FDG négative et 13 une TEP-FDG positive mais la SUVmax restait stable dans le suivi.

Une autre étude a évalué les performances de la TEP-FDG pour la détection de maladie résiduelle après autogreffe ⁴⁸. Un total de 197 TEP-FDG a été enregistré chez 99 patients à différents temps, permettant la détection de 576 LF osseuses et LEM sur 79 TEP-FDG avec en plus une infiltration ostéo-médullaire diffuse (IMD) chez 17 patients. La TEP-FDG avait une sensibilité de 54,6%, une spécificité de 82,1%, une valeur prédictive positive de 82,3%, une valeur prédictive négative 54,2% et une exactitude de 65,5%.

Valeur pronostique de la TEP-FDG à la rechute dans le MM

La valeur pronostique de la TEP-FDG a aussi été évaluée chez les patients atteints de MM suspects de rechute après autogreffe ^{49,50}. Il a été montré dans une petite série de 37 patients que l'absence de foyer avide de FDG était un facteur pronostique favorable sur le temps jusqu'à la progression (TTP) et la survie globale ($p < 0,01$). La présence de plus de 10 LF étaient corrélée au TTP ($p < 0,01$) et à l'OS ($p < 0,05$) et l'intensité de la fixation du FDG et la présence de LEM à un TTP plus court ($p = 0,037$ and $p = 0,049$, respectivement). Le résultat de la TEP-FDG induisait un changement de la prise en charge dans 30% des cas.

Quelques voies de développement en TEP pour le MM :

La TEP-FDG reste l'élément de base de l'imagerie TEP en oncologie. Toutefois, comme nous l'avons aperçu précédemment, l'imagerie TEP ne se limite pas uniquement à l'utilisation de ce radiopharmaceutique et à l'analyse visuelle des images obtenues. La prochaine partie développe 2 aspects de l'imagerie TEP qui permettent d'explorer plus en détail l'hétérogénéité tumorale. Cette dernière peut effectivement être appréciée en explorant les distribution et fixation d'un traceur tel que le FDG, ou par l'intermédiaire de multiples radiopharmaceutiques apportant chacun une information différente. Ces deux approches représentent deux pistes de développement pour la recherche de nouveaux biomarqueurs dans la prise en charge du MM.

L'approche semi-quantitative en TEP

Valeur de fixation standardisée: la SUV

Le contraste sur les images TEP-TDM entre les zones hyperfixantes et le reste de l'organisme suffit généralement à la détection des foyers pathologiques. Cependant, devant la difficulté fréquente de distinguer une fixation bénigne d'une fixation maligne, un indice de quantification a été développé : la « Standardized Uptake Value » ou SUV. Elle correspond au taux de FDG (MBq/mL) rapporté à la dose injectée et au poids du patient (g) ou à sa surface en m² (Figure 2).

$$SUV = \frac{\text{concentration tissulaire (MBq/mL)}}{\text{dose injectée (MBq)/ poids(g)}}$$

Figure 2 : Formule de la SUV

L'approche classique la plus répandue en pratique clinique consiste à considérer la valeur maximale mesurée dans la tumeur (SUV_{max}). Cette mesure de la SUV dépend grandement de la préparation du patient, de la machine utilisée, des protocoles d'acquisition ou encore des paramètres de reconstruction^{51,52} mais la simplicité de calcul de cette méthode justifie sa fréquente utilisation. D'autres calculs

de SUV sont possibles, mesurés à partir d'un plus grand nombre de voxels. Une approche alternative consiste ainsi à mesurer la valeur moyenne de la fixation dans la région tumorale d'intérêt (SUV_{mean}). Il a également été proposé de mesurer la concentration d'activité moyenne dans un volume d'intérêt fixe et dont la position dans la tumeur est choisie afin de maximiser la valeur de la SUV finalement calculée (SUV_{peak}). La SUV_{peak} serait alors moins sensible que la SUV_{max} aux caractéristiques de l'image telles que la résolution. Néanmoins l'un des problèmes relatifs à l'utilisation de ces deux derniers index est l'absence de consensus sur la définition du volume d'intérêt.

Pour diminuer ces biais lors du suivi longitudinal d'un même patient ou afin de comparer les données issues de centres différents, la communauté scientifique a proposé de normaliser les pratiques. Les critères EORTC appliqués à la TEP ⁵³, proposés en 1999, sont longtemps restés les seuls critères d'évaluation de la réponse au traitement. Les critères PERCIST ²⁵, par exemple, basés sur une bibliographie plus riche, ont été proposés depuis et sont basés notamment sur le calcul du Delta SUV_{peak}. En dépit des limitations intrinsèques de la SUV, lorsque celle-ci est mesurée de façon rigoureuse, elle fournit une mesure de la captation du FDG qui peut être utilisée pour évaluer objectivement les changements uniquement liés aux cellules tumorales.

Analyse volumique

D'autres mesures quantitatives sont également utilisées proposant des approches volumiques, tels que le MTV ou le TLG. Ces indices évaluent donc le volume tumoral global en TEP-FDG, reflet théorique de la charge tumorale.

Le MTV correspond au volume métabolique tumoral. La principale difficulté de cette mesure est alors de délimiter la région tumorale, et plusieurs méthodes existent actuellement sans véritable consensus. Les plus utilisées sont les méthodes de seuillage en raison de leur simplicité d'exécution et facilité d'utilisation. Le seuil peut être fixe ou proportionnel à la SUV_{max}. La valeur de 40 % est aujourd'hui largement utilisée en routine clinique et provient d'une simplification des travaux de Erdi et al ⁵⁴. Bien que de nombreux paramètres tels que la taille de la tumeur, le contraste, le niveau de bruit dans les images puissent influencer la valeur du seuil optimal, cette

valeur de 40 % mène à une corrélation significative entre les volumes TEP et les volumes TDM dans de nombreuses études. Ce seuil apparaît bien adapté à la segmentation de lésions homogènes, volumineuses et bien contrastées. Une valeur seuil égale à 2,5 a également été proposée de manière empirique dans la littérature pour différencier les tumeurs malignes des fixations non significatives⁵⁵. Tous les pixels ayant une valeur de SUV supérieure à 2,5 sont alors considérés comme appartenant à la cible. Le seuil peut également être défini en fonction des caractéristiques de l'image comme le niveau de bruit de fond ou le rapport signal sur bruit (méthode de seuillage adaptatif). D'autres méthodes plus sophistiquées ont également été proposées dans la littérature. La plupart portent sur des méthodes statistiques de classification de voxels cherchant à définir, voxel par voxel, à quelle région (fond ou lésion) celui-ci appartient en s'appuyant sur l'information contextuelle de voisinage des voxels d'une même région. Ces méthodes telles que l'outil FLAB pour « fuzzy locally adaptive Bayesian »⁵⁶, sont semi-automatiques car elles nécessitent au préalable une phase de définition d'un volume de travail incluant la lésion, la segmentation n'ayant pas lieu sur toute l'image TEP.

Le TLG est défini comme le produit, pour chaque lésion, du volume métabolique et de son activité moyenne. L'intérêt pronostique de ce dernier index, qui combine explicitement informations de volume et d'activité est en cours d'évaluation et les critères PERCIST²⁵ conseillent de relever ces valeurs à des fins exploratoires.

Analyse de l'hétérogénéité tumorale via l'analyse de texture

Parallèlement aux mesures classiques de volume et/ou de SUV moyenne ou maximale basées sur une population de voxels définis comme caractéristiques de la lésion étudiée, d'autres méthodes pour caractériser le métabolisme tumoral en TEP-FDG ont été proposées telles que les analyses de texture. La simple analyse visuelle de la fixation de FDG en TEP suggère en effet que la distribution intra-tumorale du radiotracer peut être extrêmement hétérogène. Des études sur petits animaux ont montré que la distribution de FDG dans les tissus tumoraux est corrélée aux caractéristiques du microenvironnement tumoral⁵⁷.

L'hétérogénéité intratumorale est également une notion familière au pathologiste. Les interactions des cellules cancéreuses avec leur microenvironnement ne sont pas

uniformes dans la tumeur, et les propriétés du stroma cancéreux ainsi que le remodelage de la matrice extracellulaire varient en fonction des régions de la tumeur. D'autre part, certaines zones d'un cancer sont moins bien vascularisées et oxygénées que d'autres et cette variation locale de l'angiogénèse et de l'hypoxie locale conduit, entre autres, à une modification du métabolisme énergétique. Ceci conditionne l'agressivité de la tumeur et la résistance thérapeutique. Ainsi, les tumeurs avec une forte hétérogénéité intrinsèque ont un pronostic plus péjoratif ^{58,59}. Il reste difficile d'évaluer cette hétérogénéité intratumorale par un échantillonnage « aléatoire » via une biopsie, cette dernière ne représentant pas l'intégralité des variations phénotypiques de la maladie tumorale. Une méthode non invasive d'évaluation de l'hétérogénéité tumorale, en particulier en cette ère de la médecine personnalisée, pourrait donc permettre d'extraire des caractéristiques utiles dans le cadre de l'évaluation tumorale et de mieux sélectionner les patients de mauvais pronostic pour une thérapie plus intensive.

Au cours des dernières années, des efforts considérables ont été entrepris par la communauté de l'imagerie médicale pour obtenir des corrélations entre les caractéristiques de l'image et l'hétérogénéité tumorale. L'analyse de texture permet l'acquisition d'informations sur la distribution spatiale des voxels d'intensités différentes dans une image ou une région sélectionnée et donc la répartition spatiale du radiotracer. Les données obtenues par analyse de texture peuvent être classées en paramètres de premier ordre, deuxième ordre ou d'ordre supérieur. La première approche, très utilisée en traitement d'image, consiste à extraire différentes statistiques directement issues de la répartition des valeurs de fixations normalisées de FDG dans la tumeur. On utilise, pour les calculer, un histogramme d'intensité représentatif de la distribution des valeurs des SUV des voxels contenus dans le volume segmenté étudié. Les paramètres de premier ordre ne considèrent pas les éventuelles relations de voisinage de chacun des voxels. Les paramètres de deuxième ordre et d'ordre supérieur mesurent les relations entre des groupes de deux ou plusieurs voxels dans l'image. Ils peuvent être calculés notamment à partir de matrices de cooccurrence qui déterminent la fréquence ou la probabilité avec laquelle un voxel d'intensité i , se trouve associé à un autre voxel d'intensité j . La matrice de cooccurrence, alors mise en œuvre et adaptée à des données à 3 dimensions, permet de mesurer la probabilité de trouver des voxels voisins d'intensité donnée dans toutes les directions de l'espace. Une fois calculée, cette matrice donne accès entre autres,

à différentes grandeurs locales telles que l'entropie, l'énergie, le contraste ou encore l'homogénéité. L'entropie, équivalente à la grandeur physique utilisée en thermodynamique comme la mesure du degré de désordre d'un système au niveau microscopique, mesure ainsi le caractère aléatoire de la distribution des pixels dans l'image. Plus l'entropie de l'image est élevée, plus les pixels sont répartis de façon aléatoire. L'énergie mesure l'homogénéité de l'image. Une valeur élevée d'énergie signifie une grande uniformité des valeurs de niveaux d'intensité dans la matrice de cooccurrence. En bref, plus l'entropie est élevée et plus l'énergie est basse, plus la distribution des différents niveaux d'intensité est hétérogène dans l'image de la tumeur. La mesure du contraste traduit la gamme dynamique des niveaux d'intensité dans l'image et le niveau de variation locale de l'intensité. L'homogénéité représente l'uniformité de la matrice de cooccurrence. La corrélation est une mesure du degré de dépendance linéaire entre 2 niveaux d'intensité.

Malgré, la quasi-absence de résultats dans la littérature sur la réelle signification biologique des paramètres d'hétérogénéité calculables sur les images TEP et des phénomènes physiopathologiques sous-jacents, l'étude de ces paramètres apparaît prometteuse avec des résultats encourageants dans un certain nombre de cancers, dont le cancer de l'œsophage ⁶⁰⁻⁶², de la sphère ORL ^{63,64}, et du poumon ^{65,66}. Néanmoins, bien que plusieurs paramètres puissent être dérivés de l'analyse de texture, seul un nombre limité d'entre eux ont montré un réel intérêt clinique. En effet, l'analyse de texture reste aujourd'hui limitée et biaisée par de nombreux facteurs statistiques ⁶⁷ mais également techniques et physiologiques inhérents à l'acquisition de l'image TEP tels que la faible résolution spatiale, l'effet de volume partiel, les algorithmes de reconstruction, les artefacts de mouvement, le bruit de l'image et la technique de segmentation qui peuvent affecter la quantification de l'hétérogénéité de l'image. Des mesures standardisées doivent donc être adoptées avant d'utiliser ces index pour des comparaisons multicentriques et pour que l'applicabilité et la valeur ajoutée de l'analyse de texture par rapport aux paramètres utilisés jusqu'à maintenant puissent être démontrées ⁶⁸⁻⁷⁰.

Autres radiopharmaceutiques

Le FDG, traceur de métabolisme, n'est pas un traceur spécifique. En effet, les cellules inflammatoires étant également avides de glucose, elles sont donc susceptibles de générer des faux positifs. Par ailleurs, l'avidité de la tumeur pour le glucose et donc pour le FDG est variable : les lésions agressives, à croissance rapide sont avides de glucose et donc bien visualisées mais les cellules indolentes ou dormantes, souvent observées dans les niches osseuses dans le MM, consommant moins de glucose pourraient être plus difficilement détectables. Une étude récente sur 227 patients au diagnostic initial de MM rapportait un taux de négativité de la TEP FDG de 11 % associé à une faible expression du gène codant pour l'hexokinase 2 catalysant la première étape de la glycolyse⁷¹.

Quelques études ont ainsi souligné l'intérêt diagnostique de nouveaux radiotraceurs dans le MM. Cassou et al. ont ainsi comparé les sensibilités respectives du FDG et de la ¹⁸F-fluorocholine (FCH) pour la détection des LF à la rechute ou progression de la maladie, dans une petite série de patients ⁷². Dans cette étude, 76% de lésions supplémentaires étaient détectées avec la FCH, suggérant un potentiel diagnostique supérieur de ce traceur à la rechute/progression du MM, avec cependant dans cette petite cohorte aucun cas strictement négatif en TEP-FDG et positif en TEP FCH. Lapa et al ont comparé prospectivement la sensibilité du FDG et de la C-méthionine (MET) pour la détection des lésions myélomateuses chez des patients évalués au bilan initial (n=11) ou en rechute (n=32) ⁷³. La TEP-MET permettait la détection de LF et de LEM pour respectivement 6 et 2 patients de plus que la TEP-FDG et elle retrouvait également plus de LF et de LEM dans respectivement 28 et 6 cas, confirmant ainsi les résultats préliminaires publiés par Okasaki et al⁷⁴. On peut néanmoins s'interroger sur la valeur pronostique de ces deux traceurs, notamment en comparaison avec le FDG dont il s'agit du point fort dans cette pathologie.

Par ailleurs, la ¹⁸F-Fludarabine (2- [¹⁸F] fluoro-9-β-D-arabinofuranosyl-adénine), radio-pharmaceutique émetteur de positon développé au centre Cyceron-PET à Caen, représente également un bon candidat potentiel pour l'exploration du MM. En effet d'après les travaux déjà effectués dans des modèles de lymphopathies, ce traceur présente une forte sélectivité pour les cellules lymphoïdes, indépendamment du cycle cellulaire et les études pré-cliniques déjà effectuées chez les souris,

comparant la distribution de la ^{18}F -Fludarabine à celle du FDG, montrent une absorption significativement plus faible de la ^{18}F Fludarabine dans les cellules inflammatoires ($p < 0,01$), une vidange très rapide dans les sites de fixation physiologiques du FDG et enfin une meilleure corrélation intensité de fixation/histologie que le FDG ($r^2=0.91$, $p < 0.001$ versus $r^2=0.55$, $p=0.03$)⁷⁵⁻⁷⁷. Les résultats issus d'une première étude clinique pilote réalisée chez 10 patients nouvellement atteints de lymphomes (lymphomes B diffus à grandes cellules et de leucémies lymphoïdes chroniques) confirment l'ensemble des résultats obtenus en pré-clinique ainsi que l'excellente tolérance du radiopharmaceutique chez les 10 patients inclus (données en cours de publication). Cette étude pilote démontre en effet la bonne sensibilité de la ^{18}F -Fludarabine pour détecter les lésions lymphomateuses, particulièrement pour les lymphomes indolents. Elle confirme l'absence de fixation sur les lésions inflammatoires et ainsi le probable intérêt en termes de spécificité notamment pour l'évaluation de la réponse thérapeutique. Compte tenu de ces résultats pertinents dans les lymphopathies, l'équipe de Caen a également évalué la faisabilité de l'utilisation de la ^{18}F -Fludarabine en pré-clinique et en comparaison au FDG, sur un modèle murin de MM⁷⁸. Les résultats de ce travail confirment la bonne fixation de la ^{18}F -Fludarabine sur le MM tant au niveau cellulaire que sur les 5 souris xénogreffées et explorées en imagerie. Ils démontrent également une corrélation entre le volume tumoral évalué en bioluminescence et la captation du radiopharmaceutique plus favorable avec la ^{18}F -Fludarabine qu'avec le FDG. Enfin les résultats des analyses immunohistochimiques évaluant les expressions du CD138 et F4/80 (pour caractériser les cellules inflammatoires) suggèrent une meilleure spécificité de la ^{18}F -Fludarabine que du FDG pour le MM.

A l'inverse, malgré la valeur théorique potentielle, des résultats décourageants ont été observés en ce qui concerne la performance du ^{18}F -NaF dans l'évaluation du MM. Ce radiotracer qui reflète le remodelage osseux, apparaît comme une méthode d'imagerie intéressante pour les maladies osseuses malignes. Pourtant, tel que rapporté dans l'évaluation diagnostique et l'évaluation du traitement^{79,80}, le ^{18}F -NaF ne semble pas ajouter d'information significative à la FDG-PET chez les patients MM.

Enfin, de nouvelles perspectives diagnostiques et thérapeutiques s'offrent dans le MM grâce aux traceurs dits « théranostiques ». Le CXCR4 (pour chemokine

receptor-4) par exemple est souvent exprimé en forte concentration par les cellules plasmocytaires monoclonales et une étude récente a révélé le potentiel du ^{68}Ga -Pentixafor, un ligand possédant une haute affinité pour le CXCR4 et offrant un excellent rapport signal/bruit chez les patients exprimant le CXCR4⁸¹. Ce même ligand peut également être marqué avec des émetteurs β à visée thérapeutique, comme le ^{177}Lu tétium ou l' ^{90}Y ttrium, avec des résultats cliniques préliminaires très encourageants.

*L' ImmunotEP*⁸²

Les progrès constants réalisés ces dernières décennies dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'oncogenèse associés au décryptage progressif des voies de transduction du signal cellulaire, ont posé les bases de l'oncologie moderne ^{83,84}. En ont découlé de profonds changements dans la prise en charge thérapeutique des patients, marqués par l'utilisation des thérapies moléculaires dites « ciblées » utilisées en complément des médicaments cytotoxiques et des chimiothérapies « non spécifiques ». Les deux principaux représentants de ce nouveau type de traitements sont les anticorps monoclonaux (AcM) ^{85,86} et les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) ^{87,88}. Ils sont conçus pour interférer spécifiquement avec certaines voies moléculaires clés impliquées dans la tumorigenèse, réalisant ainsi la vision d'Ehrlich d'une « magic bullet » capable de détruire sélectivement les cellules tumorales disséminées tout en épargnant les tissus sains ⁸⁹.

La technologie des hybridomes de Köhler et Milstein fut une découverte majeure dans le cadre de la production des AcM ⁹⁰. Cette dernière a permis la génération quasi-illimitée d'AcM, murins, stables, avec une spécificité prédéterminée. Cependant, lors de leurs premières utilisations, l'immunogénicité de ces AcM murins a constitué le principal obstacle à leur succès thérapeutique. Cela a conduit au développement d'une seconde génération d'AcM chimériques et humanisés ⁹¹. L'efficacité clinique du trastuzumab, ciblant le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) chez les patientes atteintes d'un cancer du sein et du rituximab anti-CD20 dans le lymphome non hodgkinien (LNH) a démontré pour la première fois que les AcM pouvaient être commercialisés comme de puissants agents thérapeutiques dans la lutte contre le cancer ^{92,93}. Le succès clinique du rituximab et

du trastuzumab a ainsi stimulé la recherche de nouvelles protéines membranaires cibles, dans les lymphomes et les tumeurs solides.

En parallèle, dans les années 1980, quelques AcM ont été marqués avec des radionucléides pour l'imagerie scintigraphique en oncologie ⁹⁴. C'était un défi prometteur, mais le succès escompté était limité par une faible résolution d'imagerie malgré une assez bonne spécificité de ces AcM. Ce n'est qu'au cours de la dernière décennie, grâce au développement de détecteurs plus sensibles et de logiciels dédiés, ainsi qu'aux progrès techniques importants dans la production de radionucléides émetteurs de positons et leurs méthodes de marquage, qu'une large gamme de nouveaux traceurs pour la réalisation d'imagerie spécifique ⁹⁵⁻⁹⁸ a été développée. Dans la pratique médicale, dans le contexte d'une médecine personnalisée, l'identification de biomarqueurs devient lentement mais sûrement une condition préalable à toute décision thérapeutique. L'immunoTEP, combinant la sensibilité élevée et la résolution d'une caméra TEP à la spécificité d'un AcM, s'intègre parfaitement à cette approche. En effet, les AcM marqués avec des radionucléides représentent des sondes prometteuses pour les approches théranostiques, offrant une solution non invasive pour évaluer l'expression et la distribution des cibles in vivo et pour obtenir des informations diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques fiables ⁹⁹. Cet aperçu de la distribution des molécules cibles dans l'organisme pourrait ainsi être intégré dans des stratégies de traitement individuelles avant l'introduction de thérapies potentiellement coûteuses ou toxiques¹⁰⁰. De plus, une fois radiomarqués avec des émetteurs β ou α , les AcM ciblant les molécules d'intérêt exprimées par différentes tumeurs solides ou hémopathies peuvent être utilisés en radio-immunothérapie (RIT)¹⁰¹.

Le choix du radionucléide

En TEP, le choix du radioélément est déterminant. La période physique du radioélément constitue un paramètre essentiel : elle doit être adaptée à la période biologique du vecteur. L'émetteur approprié pour le marquage d'une immunoglobuline intacte n'est donc pas le même que celui approprié pour le marquage d'un fragment d'AcM. L'utilisation d'IgG intactes implique théoriquement de réaliser des images plusieurs jours après l'injection du traceur afin d'obtenir un contraste d'image optimal en raison d'une clairance sanguine lente. Le spectre

d'émission du radioélément, la présence d'émissions gamma associées, est à considérer en termes de radioprotection, en fonction de l'activité à injecter. L'énergie et le parcours du positon déterminent la résolution. Les paires d'isotopes β^+/β^- ($^{124}\text{Iode}/^{131}\text{Iode}$, $^{86}\text{Yttrium}/^{90}\text{Yttrium}$, $^{64}\text{Cuivre}/^{67}\text{Cuivre}$) sont, de plus, intéressantes pour les développements de dosimétrie dans le contexte de la RIT. Enfin, la stabilité du marquage, la disponibilité et le coût du radioélément sont à prendre en compte. Le $^{68}\text{Gallium}$, par exemple, a l'avantage d'être disponible sous forme de générateurs directement accessibles dans les services cliniques pendant plus de six mois. Il émet un positon avec un rapport d'embranchement de 87,9 % et une énergie de 1,89MeV conduisant à une très bonne résolution intrinsèque. Cependant, étant donné sa période de 1,13 heure, plus courte que celle du ^{18}F , il ne permet le marquage que de molécules à distribution rapide comme des peptides, des anticorps fragmentés ou des immunoconjugués de petite taille. Le $^{89}\text{Zirconium}$ (^{89}Zr) et l' $^{124}\text{Iode}$ avec leurs périodes de plusieurs jours sont adaptés pour le marquage d'IgG intactes. Leurs spectres sont néanmoins plus complexes, notamment celui de l' $^{124}\text{Iode}$, ce qui n'est pas favorable théoriquement en termes de détection et de radioprotection. Des études ont démontré les performances favorables (linéarité, résolution spatiale) obtenues avec le ^{89}Zr .

Enfin, le $^{64}\text{Cuivre}$ (^{64}Cu) présente des propriétés physiques très favorables avec une période de 12,7 heures, pouvant être utilisé pour marquer un grand nombre de molécules de tailles différentes, et une énergie du positon de 653keV conduisant à une excellente résolution intrinsèque. Par ailleurs, sa période permet des enregistrements à visée dosimétrique et le $^{67}\text{Cuivre}$ est un émetteur β^- très favorable pour la RIT.

Le choix du vecteur

L'imagerie TEP utilisant des AcM intacts nécessitant généralement un délai minimum de 24h entre l'injection et l'acquisition des images, cette contrainte a encouragé le développement d'agents d'imagerie basés sur des fragments d'anticorps, plus petits, se distribuant plus vite. Ces vecteurs de synthèse comprennent notamment les fragments F(ab')₂ et Fab, les diabodies, les mini-bodies ¹⁰². Ils permettent en théorie une élimination rapide de la circulation systémique et une meilleure pénétration tumorale que les AcM intacts afin de réaliser une imagerie

avec un excellent contraste le jour même de l'administration. Les immunoconjugués basés sur ces fragments ont pour le moment démontré des résultats précliniques¹⁰³⁻¹⁰⁵ et des résultats cliniques encourageants^{106,107}.

Le radiomarquage

Les radionucléides peuvent être soit directement conjugués à un AcM, soit indirectement via un bras de liaison greffé sur un synthon, en fonction de leurs propriétés intrinsèques. Les radionucléides d'imagerie TEP les plus couramment utilisés en imagerie appartiennent à deux classes : les radio-halogènes et les radio-métaux.

Les radio-halogènes (entre autres ^{18}F , ^{75}Br , ^{76}Br), dont le principal représentant, en immunoTEP, est l' ^{124}I ode, sont généralement directement conjugués au vecteur biologique. La méthode d'iodation par substitution électrophile directe sur un résidu de tyrosine est la méthode la plus simple pour le marquage des protéines¹⁰⁸. Cette technique est couramment utilisée et fournit des résultats satisfaisants avec des anticorps ou des peptides non internalisés. Malheureusement, en cas d'internalisation, le catabolisme intracellulaire de l'anticorps et la déshalogénéation entraînent l'élimination de l'iode radioactif du tissu cible et une accumulation non cible, telle que la thyroïde, pour l'iode. Concernant le ^{18}F , bien que sa facilité de production en grande quantité, sa demi-vie et la faible énergie du positron émis en fasse un radionucléide polyvalent idéal pour l'imagerie TEP, la préparation de ^{18}F -conjugués nécessite une radiosynthèse longue et difficile. Au cours de la dernière décennie, malgré le fait que le marquage direct reste un défi non résolu, des progrès considérables ont été réalisés en ce qui concerne le marquage au ^{18}F des biomolécules et plusieurs stratégies ont été développées^{109,110}. La combinaison de fragments d'anticorps et de ^{18}F semble particulièrement intéressante car la demi-vie physique de ^{18}F serait bien adaptée à la demi-vie biologique des petits fragments.

A l'opposé, les radio-métaux, tels que ^{68}Ga , ^{64}Cu ou ^{89}Zr , nécessitent toujours l'utilisation d'agents chélatants bifonctionnels tels que le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique). L'anticorps d'intérêt est d'abord conjugué à l'agent chélateur par liaison covalente. L'anticorps modifié par un agent chélatant peut alors être utilisé afin de séquestrer le radionucléide pour donner un complexe stable. Cependant, les radionucléides métalliques présentent des chimies

de coordination diverses et, par conséquent, il existe un nombre important de chélateurs différents en fonction des radionucléides utilisés ^{111,112}.

Quel que soit le radionucléide, la stabilité est l'un des principaux facteurs à prendre en considération pour la sélection d'un agent chélateur approprié. Une autre importante propriété à prendre en compte est le devenir du radionucléide en cas de dissociation ou après le catabolisme des anticorps. Dans le cas idéal, les conjugués intacts s'accumulent et sont retenus sélectivement sur le site de la lésion cible, tandis que les radionucléides libres sont rapidement excrétés par les voies urinaires sans rétention intracellulaire dans les tissus non ciblés. Malheureusement, on observe fréquemment des fixations indésirables des radionucléides métalliques. Par exemple, de nombreuses études précliniques récentes ont rapporté une absorption osseuse significative du ⁸⁹Zr due à la présence de cations libres, déconjugués de leur agent chélatant ¹¹³. De même, des phénomènes de transmétallation ou de transchélation peuvent se produire *in vivo* lorsque le radiopharmaceutique rentre en compétition avec des protéines complexant les métaux, telles que la transferrine ou la céruloplasmine, entraînant des fixations indésirables du foie et des reins ¹¹⁴. Pour limiter ces phénomènes, la dissociation du radionucléide étant directement associée à une perte de qualité d'image, le développement de meilleurs agents chélatants afin d'améliorer à la fois la sélectivité et la stabilité reste d'actualité ¹¹².

Les systèmes de préciblage ou de ciblage en plusieurs étapes ont été développés dans le but d'obtenir une meilleure sélectivité et de limiter le temps de circulation de l'agent radio-marqué. Ils reposent sur la séparation entre l'administration, dans un premier temps, d'un agent ciblant les cellules tumorales, un dérivé d'AcM non radioactif possédant une double spécificité, l'une envers un antigène (Ag) tumoral, l'autre envers une molécule de bas poids moléculaire (PM) puis, dans un second temps, de cette molécule de bas PM radio-marquée.

Cette approche en plusieurs étapes, initialement développée pour améliorer la qualité des images, permet une reconnaissance spécifique de l'Ag tumoral et une élimination rapide de l'agent radio-marqué conduisant ainsi à une amélioration de la détection tumorale liée à un meilleur contraste des images (meilleur rapport tumeur/tissus sains). Cette technique de préciblage apparaît également intéressante pour des applications thérapeutiques, permettant une amélioration de la fixation

tumorale spécifique et ainsi une augmentation de la dose absorbée par la tumeur, sans altération de la tolérance ¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Quelques exemples d'application de l'immuno-TEP

La littérature scientifique s'est enrichie ces dernières années dans ce domaine, l'immuno-TEP apparaissant comme un outil majeur de diagnostic moléculaire à l'échelle du corps entier pour développer une démarche théranostique ou de diagnostic compagnon dans le contexte de la médecine personnalisée ^{118,119}. Appliquée à la RIT, l'immuno-TEP pourrait fournir des informations complémentaires sur le ciblage de la tumeur, la pharmacocinétique et l'accumulation du radio-conjugué dans les organes sains critiques permettant ainsi d'obtenir des données dosimétriques capitales pour le calcul de l'activité thérapeutique à administrer. Appliquée au diagnostic, cette nouvelle technique d'imagerie pourrait mieux évaluer l'extension d'une tumeur.

Plusieurs études cliniques sont maintenant rapportées dans la littérature, suggérant les potentialités de l'immuno-TEP, avec le ⁸⁹Zr ou l'¹²⁴I. Un exemple très prometteur concerne l'utilisation de l'AcM chimérique cG250 anti-carbonic anhydrase-IX (CAIX) marqué à l'¹²⁴I pour la caractérisation des masses rénales^{120,121}. Le CAIX est exprimé par plus de 90 % des carcinomes rénaux à cellules claires. La visualisation de son expression par imagerie peut permettre chez les patients présentant une masse rénale d'éviter une biopsie et de proposer d'emblée une chirurgie. La TEP au cG250-¹²⁴I a été évaluée dans une série de 26 patients porteurs de masses rénales. Une sensibilité de 94 % et une spécificité de 100 % ont été obtenues pour les carcinomes rénaux à cellules claires permettant de proposer l'approche d'immuno-TEP comme alternative à la biopsie considérée invasive. Le cas de faux négatif dans cette série de 26 patients était rapporté à une masse tumorale largement nécrotique.

Très récemment, l'équipe de Morris a démontré la faisabilité de l'immuno-TEP utilisant l'AcM anti-PMSA marqué au ⁸⁹Zr chez 50 patients porteurs d'adénocarcinome prostatique métastatique. Une analyse par lésion était effectuée pour valider les résultats de l'immuno-TEP en prenant pour Gold Standard les résultats du bilan conventionnel +/- l'histologie ¹²². Les auteurs démontraient

l'excellente performance de l'immuno-TEP pour la détection des lésions osseuses (lésions supplémentaires visualisées par rapport au bilan conventionnel) et des performances un peu moins bonnes, mais néanmoins identiques à celles du bilan conventionnel, pour les lésions des tissus mous.

L'immuno-TEP permettrait également de mieux sélectionner les candidats à la RIT en vérifiant l'expression tumorale de l'Ag et son accessibilité. Par exemple, il a été démontré que l'immuno-TEP utilisant l'Ac B-B4 anti-CD138 marqué à l' ^{124}I pouvait être utile pour détecter l'expression tumorale du CD138 et ainsi sélectionner les candidats potentiels à une RIT dans un modèle murin de cancer du sein métastatique triple négatif non candidat à un traitement hormonal ou à une immunothérapie anti-HER2 ¹²³. Les images d'immuno-TEP obtenues à partir de l' ^{124}I -B-B4 Mab étaient bien corrélées aux données de biodistribution issues du sacrifice des animaux. De la même façon, il a été montré que la distribution du ^{90}Y -Zevalin pouvait être prédite par l'immuno-TEP au ^{89}Zr -Zevalin afin de vérifier l'expression du CD20 avant la RIT ¹²⁴.

Jusqu'à présent, seules les méthodes invasives telles que la biopsie puis les analyses immuno-histochimiques pouvaient identifier les patients ayant le plus de chance de répondre à une immunothérapie, l'immuno-TEP pourrait être une alternative aux gestes invasifs pour sélectionner les patients candidats à une immunothérapie. Par exemple, dans le cadre du cancer du sein, les agents thérapeutiques anti-HER2 ne sont efficaces chez les patients ayant un cancer du sein HER2-positif. Il a été prouvé que l'immuno-TEP anti-HER2 utilisant un AcM marqué avec le ^{68}Ga , le ^{64}Cu ou le ^{89}Zr permettait d'identifier les lésions métastatiques exprimant HER2, y compris dans le cerveau ¹²⁵⁻¹²⁷. Bensch et al. ont également récemment publié un parfait exemple de cette application avec les premiers résultats chez l'homme d'une imagerie avec l'atézolizumab (anti-PD-L1) marqué au ^{89}Zr ¹²⁸. L'axe PD1/PD-L1 est un point de contrôle immunitaire important pour l'activation des cellules T. La surexpression de PD-L1 est associée à un pronostic plus défavorable dans une variété de cancers, mais ces patients ont généralement une réponse plus forte au traitement anti-PD-L1 comme l'atézolizumab ^{129,130}. L'expression tumorale de PD-L1 est habituellement évaluée par immunohistochimie ou séquençage de l'ARN. Dans l'étude de Bensch et al., les

réponses cliniques étaient mieux corrélées à l'intensité de fixation sur la TEP avant traitement que ces deux évaluations.

Cette première partie, à visée bibliographique, a fait l'objet de 2 revues de la littérature, publiées dans *International Journal of Molecular Sciences* (Articles fournis en Annexe)^{33,82}.

Travail de Thèse : Etudes expérimentales et
clinique

Objectifs du travail de thèse

Malgré d'importants progrès lors de cette dernière décennie, le MM reste encore une maladie incurable et l'identification de nouveaux biomarqueurs permettant de toujours mieux sélectionner les patients de mauvais pronostic éligibles à une thérapie plus intensive demeure d'actualité. Comme présentée dans la première partie, l'imagerie en médecine nucléaire s'inscrit parfaitement dans cette démarche en permettant d'observer *in vivo*, de façon non invasive, l'expression et la distribution des biomarqueurs accessibles dans les cibles tumorales. Cette hétérogénéité de signatures moléculaires peut être appréciée qualitativement ou quantitativement, par l'intermédiaire de multiples traceurs apportant des informations phénotypiques, métaboliques... complémentaires ou en explorant les distributions et fixations de chaque traceur individuellement.

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre de l'unité INSERM 1232 (Equipe 13) du CRCINA (Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie de Nantes-Angers) et de l'équipe de Médecine Nucléaire du CHU de Nantes. Il s'articule en 3 parties dont les objectifs sont les suivants :

1- La première partie de ce travail a été consacrée à l'évaluation pré-clinique d'anticorps ciblant le syndecan-1 ou CD138, un protéoglycane utilisé comme marqueur standard par de nombreux laboratoires pour l'identification et la purification de cellules myélomateuses.

2- La deuxième partie de ce travail est consacrée à l'exploration de paramètres quantitatifs d'analyse de l'imagerie TEP caractérisant l'hétérogénéité intra-tumorale de la distribution des radiotraceurs. L'objectif de cette partie est notamment de profiter des travaux expérimentaux précédents afin de corréliser les données de l'analyse de texture obtenues en TEP à celle obtenue en histologie.

3- La troisième partie de ce travail consiste en l'évaluation de la pertinence de certains de ces biomarqueurs (paramètres quantitatifs d'analyse de l'imagerie TEP) en clinique sur les données de la cohorte IMAJEM.

Première Partie : Evaluation pré-clinique d'anticorps
ciblant le syndecan-1 ou CD138

Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, le FDG, analogue du glucose, n'est pas un traceur spécifique et le développement d'imageries TEP, dites phénotypiques, est envisagé pour mieux caractériser les processus tumoraux à l'échelle du corps entier, en ciblant les biomarqueurs exprimés par les tumeurs ^{131,132}. La disponibilité d'anticorps hautement spécifiques a conduit au développement de nouveaux radiopharmaceutiques et la réalisation d'une imagerie spécifique, l'immunoTEP ^{89,133}. Les applications d'une telle imagerie sont multiples ; outre une amélioration de la détection tumorale et la stadification, il est possible d'envisager *in vivo* la caractérisation biologique des processus tumoraux, caractéristique pertinente lorsque des spectres biologiques et des comportements cliniques variables sont attendus, avec un impact sur la réponse aux traitements. De plus, l'immunoTEP pourrait permettre l'identification de cibles directement utilisables pour des protocoles de radiothérapie vectorisée ou de thérapies ciblées.

Parmi les antigènes potentiellement cibles, le CD138 ou syndécan-1 est une protéoglycane de surface cellulaire qui joue un rôle important dans la régulation de la signalisation cellulaire et qui agit comme médiateur de l'adhésion cellulaire ^{14,134}. Chez l'homme, il est exprimé par les cellules épithéliales, les précurseurs des cellules B et les plasmocytes normaux mais également de façon importante par les cellules myélomateuses viables de la moelle osseuse et du sang périphérique ^{135,136}. Actuellement, le CD138 est utilisé comme marqueur standard par de nombreux laboratoires pour l'identification et la purification de cellules myélomateuses. Par ailleurs, comme vu précédemment, un taux élevé de CD138 circulant plasmatique est associé à un mauvais pronostic de survie chez les patients atteints de MM ¹⁵. Par conséquent, le CD138 est une protéine potentiellement intéressante pour la thérapie. Son ciblage moléculaire à l'aide d'AcM a d'ailleurs été exploré par différents travaux de recherche pré-clinique et clinique et s'est révélé pertinent, témoignant ainsi de son bon niveau d'expression par les tumeurs ¹³⁷⁻¹⁴². Le CD138 peut donc aussi être considéré comme une cible intéressante pour une approche d'immunoTEP.

Le travail effectué dans cette première partie de thèse se situe dans la continuité de travaux déjà réalisés par l'équipe d'Oncologie Nucléaire du CRCINA, et notamment par le Docteur Marie Lacombe, qui avait, lors de son Master 2, évalué

la faisabilité de la TEP au ^{64}Cu couplée à l'anticorps monoclonal anti-mCD138 (clone 9E7.4, créé et caractérisé au sein de l'équipe) pour la détection des lésions osseuses dans un modèle murin syngénique orthotopique de MM (C57BL/KaLwRij et cellules 5T33). Si les premiers résultats obtenus par le Dr Lacombe semblaient montrer que l'imagerie phénotypique permettait une détection précoce du MM, certaines discordances dans les résultats et la survenue de difficultés techniques ont nécessité un complément d'investigation et la réalisation de nouvelles expérimentations.

Nous avons donc cherché, dans notre travail expérimental à confirmer les données précédemment observées sur l'apport de l'imagerie phénotypique par rapport à l'imagerie métabolique et à définir les paramètres optimaux de réalisation de l'immuno-TEP avec l'Ac anti-CD138.

Ce travail a été débuté lors de mon année de Master 2 et certains résultats seront repris ici pour une meilleure compréhension.

Les expérimentations ont été réalisées sur la microTEP Inveon (SIEMENS) sur le site de l'Ecole Vétérinaire ONIRIS puis après son déménagement sur le centre d'imagerie CIMA (Centre d'Imageries Multimodales Appliquées) sur le site de l'Hôtel Dieu CHU Nantes.

Ce travail expérimental s'est déroulé en plusieurs étapes :

- Chapitres 1 et 2 : Evaluation de la biodistribution de l'AcM anti-mCD138 couplé au ^{64}Cu chez des souris C57BL/KaLwRij et étude de l'apport de cette immuno-TEP pour la détection du MM dans un modèle murin syngénique (C57BL/KaLwRij et cellules 5T33) en implantation sous-cutanée et systémique, en comparaison avec la TEP-FDG et la TEP au $^{64}\text{CuCl}_2$.

- Chapitre 3 : Etude de comparaison des immuno-TEPs avec l'AcM anti-mCD138 radiomarquées au ^{64}Cu ou ^{89}Zr pour la détection du MM dans un modèle murin syngénique (C57BL/KaLwRij et cellules 5T33) en implantation sous-cutanée et systémique.

- Chapitre 4 : Etude de l'apport d'une dose de pré-charge avant l'immuno-TEP avec l'Ac anti-mCD138 pour la détection du MM dans un modèle murin syngénique (C57BL/KaLwRij et cellules 5T33).

Les étapes 1 et 2 ont fait l'objet d'un article publié dans *Oncotarget*¹⁴³ et l'étape 3 d'un article publié dans *International Journal of Molecular Sciences*¹⁴⁴ (Articles fournis en Annexes). Ces travaux ont également été présentés sous forme de posters aux congrès internationaux EANM 2018, PILM 2018 et au congrès national JFMN 2017.

Premier Chapitre - Evaluation de la biodistribution de l'Ac anti-mCD138 couplé au Cuivre 64 chez des souris C57BL/KaLwRij greffées avec des cellules 5T33 de MM murin.

Introduction

Dans ce premier travail d'expérimentation, la biodistribution d'un anticorps anti-mCD138 couplé au ^{64}Cu a été étudiée chez des souris C57BL/KaLwRij greffées en sous cutanée (SC), avec des cellules 5T33 de MM murin, le même modèle murin syngénique de MM que celui utilisé lors du travail de Master 2 de Marie Lacombe. L'anticorps monoclonal murin 9E7.4 a été employé. C'est un anticorps mis au point et produit par notre laboratoire¹⁴⁵. Il s'agit d'une immunoglobuline de rat de type IgG2a qui réagit spécifiquement avec la partie extra-membranaire du syndécan-1 murin et qui présente une très bonne affinité de l'ordre de 10^{-10}M . Un anticorps isotype-contrôle a également été introduit comme témoin négatif pour évaluer la liaison non spécifique des anticorps IgG2a, κ de rat aux cellules de souris.

Matériels et Méthodes

Lignées et cultures cellulaires :

A l'origine, la lignée cellulaire de MM murin 5T33 nous a aimablement été fournie par le Docteur Harvey Turner (Service de Médecine Nucléaire, Hôpital de Fremantle, Australie), avec la permission du Docteur Jiri Radl (Institut TNO, Leiden, Pays-Bas)¹⁴⁶.

Avant mon arrivée dans le laboratoire, les cellules 5T33 ont été transfectées par le gène codant pour la luciférase en utilisant une approche rétrovirale¹⁴⁷.

Les cellules 5T33-Luc(+) ainsi obtenues, tout comme les cellules originelles 5T33, ont été cultivées dans du milieu RPMI1640 (Gibco, Saint Aubin, France) contenant 2 mM de L-glutamine et 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (Laboratoires PAA/GE Healthcare Europe GmbH). Elles ont ensuite été incubées à 37°C, avec un taux de CO₂ de 5% et un taux d'humidité de 100 %. Les cellules ont

été maintenues à une concentration inférieure à $1,5 \times 10^6$ cellules/mL et ont été ensemencées à $0,1 \times 10^6$ cellules/mL deux jours avant toute utilisation *in vitro* ou *in vivo*.

Anticorps 9E7.4, anticorps anti-mCD138

La génération de l'anticorps anti-mCD138 a été réalisée par la société GENCECUST contre un peptide de 40 acides aminés spécifique du domaine extracellulaire du CD138 et sa caractérisation a été assurée au sein de l'équipe¹⁴⁵. L'anticorps 9E7.4 est une immunoglobuline de rat de type IgG2a, κ présentant une spécificité pour le CD138 avec une constante d'affinité de l'ordre de 10^{-10} M.

Anticorps Isotype contrôle IgG2a, κ

L'anticorps IgG2a κ de rat (R&D Systems ; réf 54447) a été choisi comme contrôle isotypique.

Modèle animal

Les expérimentations animales ont été réalisées sur des souris femelles C57BL/KaLwRij, âgées de 17 semaines. Les expérimentations effectuées dans cette étude ont été approuvées par les services vétérinaires (référence 00143.01).

Six souris ont été greffées en sous-cutané (SC) à l'aide de 2×10^6 cellules 5T33-Luc(+) sur les deux pattes, 10 jours avant les premières images TEP. Les tumeurs présentaient des tailles de 0,3 - 0,8 cm de diamètre.

Cuivre-64 (^{64}Cu)

Deux traceurs ont été utilisés : ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 spécifique du CD138 et l'isotype-contrôle ^{64}Cu -TE2A-Ig2a, κ .

Le ^{64}Cu est un isotope radioactif du cuivre, avec une période de 12,7 h, notamment émetteur de positons. Le ^{64}Cu utilisé dans notre étude était produit par

le cyclotron d'Arronax (GIP Arronax, Saint-Herblain, France) en utilisant la réaction $^{64}\text{Ni} (d,2n) ^{64}\text{Cu}$ et il était fourni en solution dans de l'acide chlorhydrique (HCl 0,1M), donc sous forme $^{64}\text{CuCl}_2$.

Le radiomarquage a été réalisé par les radio-chimistes du Centre de Recherche en Cancérologie-Immunologie Nantes-Angers (CRCINA, INSERM U1232, CNRS ERL6001, Nantes, France). L'anticorps 9E7.4 a été préalablement couplé à un agent chélatant le cuivre appelé TE2A-benzyl isothiocyanate (ZH195, UMR-CNRS 6521, Brest, France). Pour le radiomarquage, l'anticorps a été incubé avec une solution de 244 μL de ^{64}Cu produite par le GIP Arronax et 60 μL d'acétate d'ammonium 2,5M pendant 20 minutes à 40°C. Puis 10 μL d'EDTA ont été rajoutés (pH 7 ; 10 mM) et une nouvelle incubation de 5 minutes à 40°C a été réalisée. La réaction de radiomarquage a été évaluée par chromatographie couche mince (ITLC-SG, tampon citrate de sodium 0,1M pH 4,5) à 83%. L'immuno-conjugué marqué au ^{64}Cu a été purifié du ^{64}Cu libre par chromatographie d'exclusion de taille en utilisant une colonne PD-10 (Sephadex G25) et du PBS. La pureté radiochimique était finalement évaluée à 100% (ITLC-SG, tampon citrate de sodium 0,1M pH 4,5). A la fin du marquage, l'activité volumique était de l'ordre de 200 MBq/mL.

Déroulement de l'étude in vivo

Le protocole est représenté dans la Figure 3.

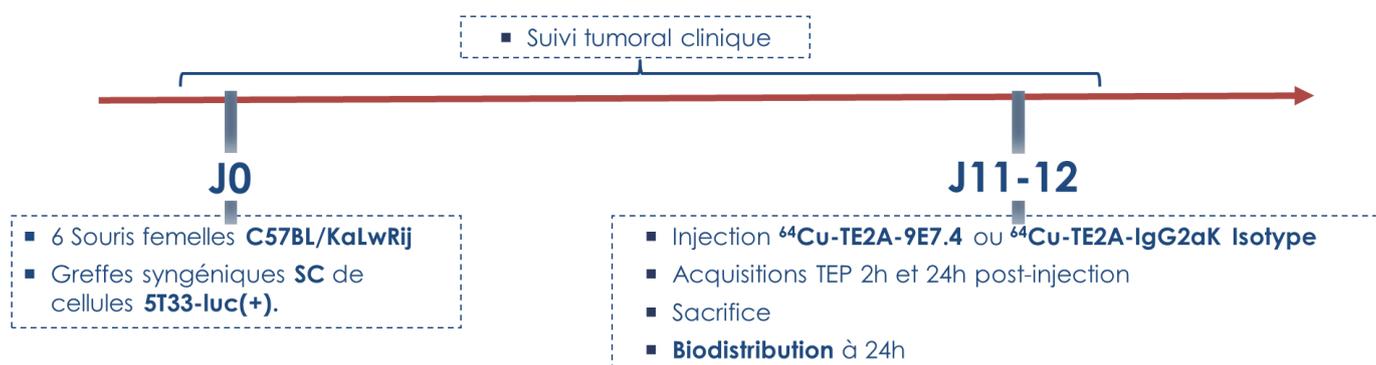


Figure 3: Protocole expérimental de l'évaluation de la biodistribution de l'Ac anti-mCD138 couplé au ^{64}Cu vs Isotype-Contrôle

Injection des traceurs

Trois souris ont été injectées en $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ et 3 souris en $^{64}\text{Cu-TE2A-Ig2a,\kappa}$.

Imagerie

Anesthésie

Afin de réaliser les acquisitions d'imagerie *in vivo*, les souris ont bénéficié d'une anesthésie gazeuse. Elles ont été placées dans une boîte d'induction hermétique où elles ont inhalé de l'isoflurane 4%. Une fois endormies, les souris ont été installées sur la table de la micro-TEP, où l'anesthésie a été poursuivie au masque (Isoflurane 2%). Dès la fin des images, les souris ont été replacées dans leur cage et surveillées visuellement afin de contrôler leur réveil.

TEP-TDM

Les images corps entier ont été acquises sur une TEP-TDM petit animal Inveon (Siemens Medical Solutions), équipée de détecteurs de type LSO (OxyorthoSilicate de Lutécium). Les images TDM ont été acquises en premier et utilisées pour la correction d'atténuation (paramètres du tube à rayon X : 80 kV ; 500 μA). Les images TEP ont été acquises pendant 20 minutes. Les sinogrammes 3D ont été reconstruits selon l'algorithme de reconstruction itérative 3D-OSEM (Order Subset Expectation Maximization) (sous-ensembles = 16, itérations = 2) puis l'algorithme MAP (Maximum A Priori) (itérations = 18). La résolution spatiale de la micro-TEP était de 1,5 mm. Chaque jour, l'étalonnage de la TEP à l'aide d'une source de Germanium-68 et le contrôle du centre du scanner étaient réalisés. Pour le ^{64}Cu , deux séries d'images des souris entières ont été acquises, 2 et 24 heures après l'injection afin d'étudier la distribution du signal et donc du radiotracer en fonction du temps. Le post-traitement des images a été réalisé à l'aide du logiciel « Inveon Research Workplace » de Siemens.

Etude de biodistribution

Pour les 6 souris, après l'imagerie au ^{64}Cu , un prélèvement veineux rétrobulbaire a été réalisé puis les souris ont été sacrifiées par élongation cervicale. Les organes (tumeur, foie, rein, muscle, rate, peau, os, cœur, poumons, cerveau, intestin, fémur, estomac, queue) ont été prélevés, pesés sur une balance de précision puis passés successivement au compteur gamma (temps de comptage : 30 secondes par tube). Afin de pouvoir analyser les résultats en fonction de l'activité injectée, une activité standard de référence (correspondant à l'activité injectée aux souris ou dose totale injectée) a été passée simultanément au compteur gamma. Pour chaque organe, le pourcentage de dose injectée par gramme (%DI/g) était calculé en rapportant l'activité de l'organe à son poids (en grammes) puis en le divisant par la dose totale injectée.

Résultats

Imagerie

TEP au ^{64}Cu couplé à l'anticorps anti-mCD138 (^{64}Cu -TE2A-9E7.4)

Trois souris ont bénéficié d'une imagerie TEP au ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 à 2h et 24h.

Toutes les souris présentaient sur les images acquises à 2 heures une fixation intense du secteur vasculaire et plus particulièrement du cœur, de l'aorte et des troncs supra-aortiques. A 24 heures, ces hyperfixations étaient moins intenses mais toujours visibles. Une fixation intense du foie et de la rate et plus modérée du tractus digestif était également visible chez toutes les souris, que ce soient 2h ou 24 h après l'injection du radio-traceur. La plupart des souris présentaient une activité buccale sur les images acquises 24 heures après l'injection du traceur. Concernant le secteur osseux, il a été mis en évidence un renforcement de fixation diffus de l'ensemble du squelette prédominant sur les dernières vertèbres lombaires, les articulations sacro-iliaques et coxo-fémorales ainsi que les genoux sur les images acquises à 2h et nettement diminué à 24h.

Toutes les souris présentaient une hyperfixation supérieure au bruit de fond environnant des masses sous-cutanées bilatérales sur les membres postérieurs à 2 h, se renforçant à 24 h (Figure 4).

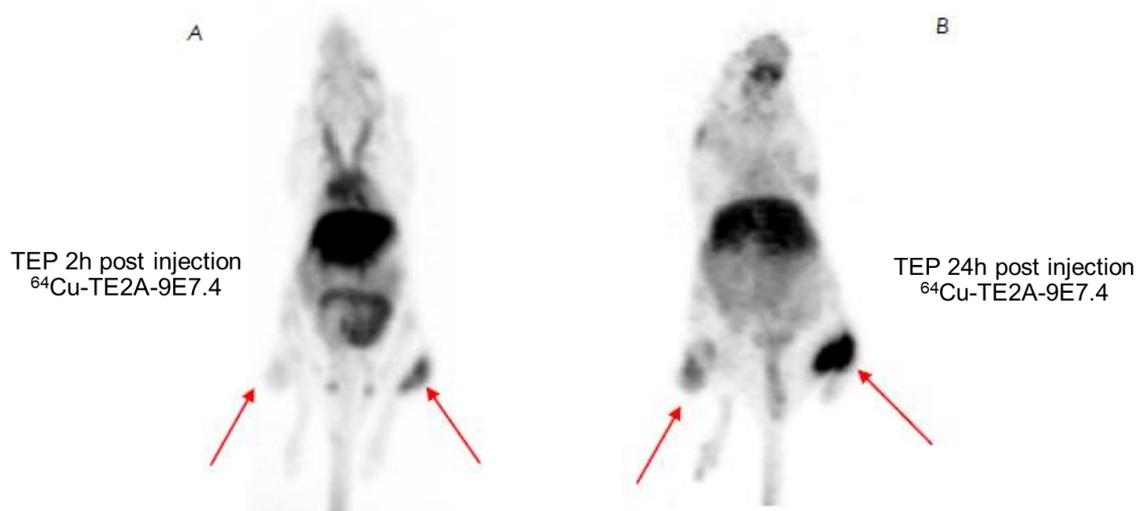


Figure 4: Imagerie TEP au ⁶⁴Cu couplé à l'anticorps anti-mCD138 à 2h (A) et 24h (B) d'une souris greffée SC présentant des hyperfixations des 2 tumeurs SC bilatérales.

TEP au ⁶⁴Cu couplé à l'anticorps Isotype contrôle (⁶⁴Cu-TE2A-Ig2a, κ).

Toutes les souris présentaient sur les images acquises à 2 heures une fixation intense du secteur vasculaire et de la vessie, diminuant à 24 heures. Concernant les tumeurs SC bilatérales, une hyperfixation était observée relativement stable aux deux temps de l'examen (Figure 5).

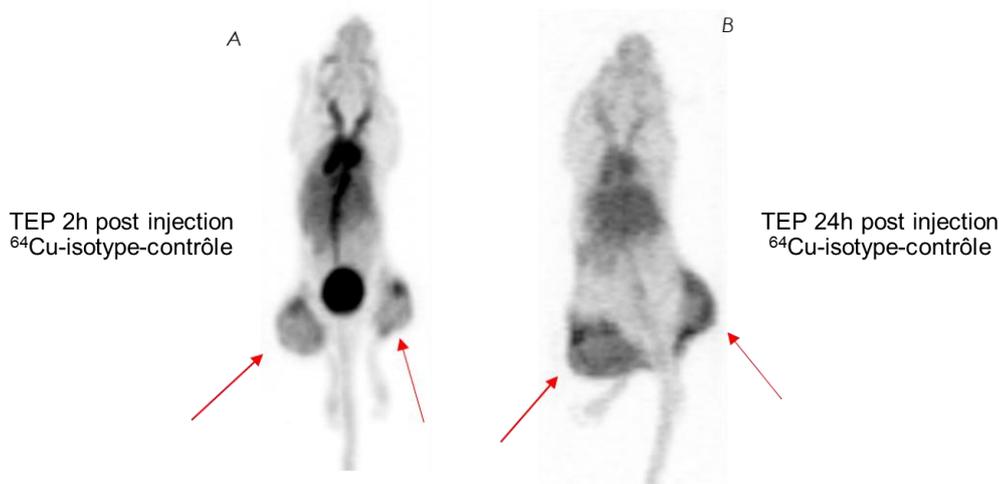


Figure 5: Imagerie TEP au ⁶⁴Cu couplé à l'isotype-contrôle à 2h (A) et 24h (B) d'une souris greffée SC.

Biodistributions

Les biodistributions permettent d'obtenir l'activité réelle de chaque organe. Les résultats sont présentés dans la Figure 6.

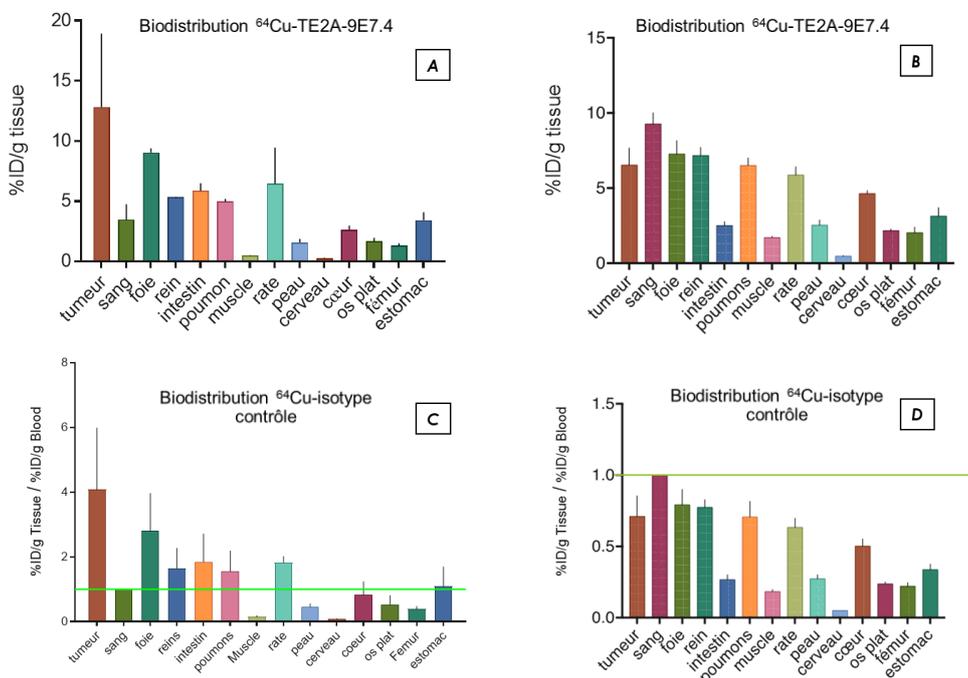


Figure 6: Biodistributions du ⁶⁴Cu couplé à l'anticorps anti-mCD138 et de l'isotope-contrôle obtenues par organe 24 h après l'injection des radiotraceurs, exprimées respectivement en %DI/g d'organe (A et B) et en rapport %DI/g d'organe / %DI/g de sang (C et D)

Sur les données de biodistribution de l'anticorps anti-mCD138 couplé au ^{64}Cu , ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 (Figures 6A et 6B), on a retrouvé une accumulation importante du radiotracer dans les tumeurs SC avec un %DI/g de $12,82 \pm 6,09$ % à 24 heures post-injection (PI) correspondant à un rapport tumeur sur sang élevé ($4,08 \pm 1,9$ à 24 h PI). Le radio-immunoconjugué ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 présentait une clairance sanguine rapide déterminée par la radioactivité restant dans le sang à 24 h PI ($3,47 \pm 1,28$ % ID/g). Une faible absorption musculaire a été observée de $0,49 \pm 0,03$ % ID/g à 24 h PI. Des doses relativement élevées de ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 ont néanmoins été notées dans plusieurs organes normaux comme le foie ($9,04 \pm 0,36$ % DI/g à 24 h PI) et la rate ($6,46 \pm 2,99$ % DI/g à 24 h PI). Tous les autres organes présentaient des concentrations d'activité de 5 % DI/g ou moins à 24 h PI. Pour contrôler la spécificité du ^{64}Cu -TE2A-9E7.4, des biodistributions de l'isotype ^{64}Cu -TE2A-IgG2ak à 24 heures PI ont été réalisées (Figures 6C et 6D). Elles ont montré une activité élevée persistante dans le sang ($9,26 \pm 0,75$ % DI/g à 24 h PI) et des fixations relativement élevées dans plusieurs organes normaux, y compris les tumeurs ($6,53 \pm 1,14$ % DI/g à 24 h PI), avec un très mauvais rapport tumeur/sang ($0,71 \pm 0,15$ à 24 h PI).

Discussion :

Les données de biodistribution ont permis de valider ce modèle murin d'étude de MM avec le système ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 et de mettre en évidence les performances de la TEP avec l'anti-mCD138 marqué au ^{64}Cu .

En continuité avec les travaux préliminaires réalisés par Marie Lacombe, nous avons travaillé sur le CD138 dans un modèle murin syngénique de MM. Ce modèle tumoral présente plusieurs avantages. Tout d'abord, l'utilisation d'animaux immuno-compétents permet grâce à la participation du système immunitaire de préserver les relations microenvironnement hôte/tumeur, qui sont importantes dans cette pathologie. De plus, après inoculation des cellules 5T33, le développement de la maladie est bien connu, reproductible, avec un délai de latence court permettant l'analyse de la progression tumorale. De plus, plusieurs études ont montré que ce

modèle avait des caractéristiques physiopathologiques proches du MM de l'homme¹⁴⁸.

Notre étude a utilisé le 9E7.4 couplé au ⁶⁴Cu. Comme discuté précédemment, la période physique du radioélément constitue un paramètre essentiel en immunoTEP: elle doit être adaptée à la période biologique du vecteur. Le ⁶⁴Cu du fait de sa période physique de 12,7 heures, autorise le marquage puis la délivrance du radiopharmaceutique hors du site de production. De plus, le type de rayonnements émis lors de la décroissance est adapté à l'imagerie TEP conduisant à une excellente résolution intrinsèque (β^+ : 17,4% ; $E_{\beta^+max} = 653$ keV) comme démontré par plusieurs études ¹⁴⁹⁻¹⁵¹. La principale difficulté de ce radioélément réside dans la nécessité d'un chélateur stable permettant de fixer le radio-isotope à la biomolécule vectrice ¹⁵². Les milieux biologiques sont en effet riches en cations métalliques, protéines chélatantes et enzymes réducteurs, susceptibles d'entrer en compétition avec le chélate et d'entraîner la dissociation du complexe cuivre-chélate. Ainsi, dans une étude récente, Roosenburg *et al* ont montré que suivant le type de chélate utilisé pour le couplage de l'anticorps avec le ⁶⁴Cu, les profils de biodistribution n'étaient pas les mêmes ¹⁵³. Une forte absorption par le foie et les autres organes comme les intestins était rapportée en raison de la modeste stabilité *in vivo* des différents chélateurs. Dans notre étude, c'est un dérivé du DOTA, le TE2A qui a été utilisé comme agent chélateur ¹⁵⁴. C'est un macrocycle dont la structure est plus adaptée à la stabilisation du cuivre *in vivo*¹⁵⁴, sans toutefois garantir une absence de relargage du cuivre sous forme Cu²⁺. Cette éventualité sera étudiée dans la prochaine partie.

Après analyse des images et des données de biodistribution, on a observé sur les images au ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 enregistrées à 2h une fixation intense du secteur vasculaire et plus particulièrement du cœur, de l'aorte et des troncs supra-aortiques. Ces fixations étaient beaucoup moins intenses à 24h. De même, le renforcement de fixation diffus de l'ensemble du squelette prédominant sur les dernières vertèbres lombaires, les articulations sacro-iliaques et coxo-fémorales ainsi que les genoux sur les images acquises à 2h apparaissait nettement diminué à 24h. Ces fixations vasculaires et osseuses traduisaient la distribution précoce progressive de l'immunoconjugué dans le secteur vasculaire, observation retrouvée dans la littérature ¹⁵⁵. Ces données ont également confirmé que l'acquisition à 24h PI

semblait être le point temporel optimal pour une imagerie avec un contraste satisfaisant.

Par ailleurs, une fixation intense du foie et de la rate et plus modérée du tractus digestif était également visible chez toutes les souris, que ce soit à 2h ou à 24h après l'injection du $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$. Plusieurs explications semblent plausibles. La première est une expression hépatique du CD138 soit par les microvillosités des membranes basales des hépatocytes soit liée à une hématopoïèse extra-médullaire¹⁵⁶. De manière générale, la plupart des antigènes cibles, surexprimés par les tumeurs, sont également présents de façon endogène, parfois de façon ubiquitaire, dans de nombreux tissus non cancéreux. La séquestration des AcM radiomarqués par ces sites « non-cibles » tels que le foie ou les antigènes circulants affecte donc négativement la fixation spécifique tumorale en diminuant la quantité de radiotraceurs disponibles^{157,158}. De plus, la fixation des AcM radiomarqués par les tissus normaux se produit généralement plus rapidement que dans les tissus tumoraux, dont la cinétique d'absorption est plus lente en raison d'une vascularisation intrinsèquement inorganisée et de pressions interstitielles élevées. Des stratégies ont été mises au point pour surmonter ces séquestrations d'AcM et notamment l'injection d'une pré-charge d'anticorps froids ou une modification de l'activité spécifique^{159,160}. La seconde explication est la fixation classique des AcM de type IgG aux récepteurs $\text{Fc}\gamma$ hépatiques (cellules de Kupffer) et aux follicules lymphoïdes primaires et secondaires de l'intestin (plaques de Peyer)¹⁶¹⁻¹⁶³ associée au catabolisme physiologique des IgG. Dans la littérature, jusqu'à 20% des IgG totales injectées sont ainsi décrites comme éliminées par le foie^{164,165}. La troisième possibilité est la fixation hépatique du cuivre, suite à un probable relargage de cuivre libre, puis intestinal par le biais d'un cycle entéro-hépatique physiologiquement connu. Si les 3 hypothèses émises sont vraisemblablement imbriquées dans notre modèle, le fait que les fixations physiologiques soient également retrouvées avec l'isotype-contrôle (mais de manière moins intense sur le tractus digestif), laisse penser que les deuxième et troisième mécanismes sont prépondérants. Une quatrième hypothèse a également été émise par Vanderkerken *et al* qui décrivaient la possible présence de cellules 5T33 au niveau hépatique et splénique dans un modèle IV¹⁶⁶. Cette dernière hypothèse semble moins probable dans un modèle de greffe SC.

Concernant les tumeurs SC bilatérales, l'analyse des données d'imagerie et de biodistribution a montré une hyperfixation des 2 tumeurs avec les 2 radiotraceurs. Le contraste était néanmoins nettement supérieur sur les images au ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 avec une fixation et un rapport tumeur/bruit de fond plus importants. On visualisait également une variation de ce rapport, avec une tendance à l'augmentation entre 2h et 24h pour les tumeurs imagées au ^{64}Cu couplé à l'anticorps anti-mCD138 et une stabilité pour les tumeurs imagées avec l'isotope contrôle. Cette fixation tumorale relativement faible, ce faible rapport tumeur/sang et cette distribution uniforme s'expliquaient par un effet non spécifique de perméabilité et de rétention (EPR) accru ^{167,168}.

Conclusion

L'immuno-TEP avec le ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 a permis l'obtention d'images avec un excellent rapport signal sur bruit sur les greffes SC. Les performances de cette imagerie dans un modèle orthotopique restent néanmoins à explorer notamment en comparaison aux traceurs existants. De plus, la potentielle implication de la fixation physiologique du traceur hépatique, splénique et digestive sur l'analyse devra être explorée ainsi que l'impact du cuivre libre sur les performances de l'imagerie.

Deuxième Chapitre - Etude de l'apport de l'immuno-TEP avec l'Ac anti-mCD138 pour la détection du MM dans un modèle murin syngénique (C57BL/KaLwRij et cellules 5T33) en implantation sous-cutanée et systémique, en comparaison avec la TEP-FDG et la TEP au $^{64}\text{CuCl}_2$.

Introduction

Lors de la précédente étape, nous avons montré que l'AcM $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ était capable de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales et permettait l'obtention d'images d'immunoTEP avec un contraste satisfaisant dans un modèle murin de souris C57BL/KaLwRij greffées en sous cutanée. En conséquence, les performances de l'anticorps anti-mCD138 couplé au ^{64}Cu ont ensuite été étudiées, dans un modèle orthotopique syngénique. Cette imagerie a été comparée à la TEP-FDG, et à une imagerie au $^{64}\text{CuCl}_2$, utilisé à la fois comme contrôle de la libération potentielle de cuivre par l'agent chélateur et comme sonde moléculaire propre. En effet, le cuivre joue un rôle critique dans la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la croissance tumorale ^{169,170} et l'utilisation du $^{64}\text{CuCl}_2$ a été rapportée comme prometteuse pour l'imagerie de divers types de cancers comme le cancer de la prostate et le mélanome ¹⁷¹⁻¹⁷³.

Matériels et Méthodes

Lignées, cultures cellulaires et modèle animal:

La même lignée cellulaire de myélome multiple murin 5T33-luc(+) et la même espèce de souris femelles C57BL/KaLwRij que précédemment décrites dans la première étape ont été utilisées.

Pour le modèle orthotopique, une dissémination médullaire a été simulée par injection IV de cellules tumorales de MM. Pour ce modèle expérimental disséminé, un million de cellules 5T33-Luc(+) (injection de 100 μL d'une solution à 10.10^6 cellules/mL) ont été greffées par voie intra-veineuse (IV) dans une veine de la queue chez 8 souris, 34 jours avant les premières images TEP. Neuf souris supplémentaires

ont été greffées en SC à l'aide de 2×10^6 cellules 5T33-Luc(+) sur les deux pattes, 10 jours avant les premières images TEP. Ces greffes ont permis l'obtention de tumeurs de tailles comprises entre 0,3 - 0,8 cm de diamètre.

Traceurs

Trois traceurs ont été utilisés : le FDG, le ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 et le $^{64}\text{CuCl}_2$ pour l'analyse du tropisme naturel du cuivre.

Comme précédemment, le ^{64}Cu utilisé était produit par le cyclotron d'Arronax (GIP Arronax, Saint-Herblain, France) et il était fourni sous forme $^{64}\text{CuCl}_2$.

La technique de radiomarquage a été décrite dans la première partie. Son rendement et l'activité spécifique après purification du bioconjugué étaient respectivement de $95 \pm 2,8 \%$ et $188 \pm 27 \text{ MBq/mg}$ et son immunoréactivité était de $81 \pm 7 \%$.

Déroulement de l'étude in vivo

Le protocole est représenté dans la Figure 7.

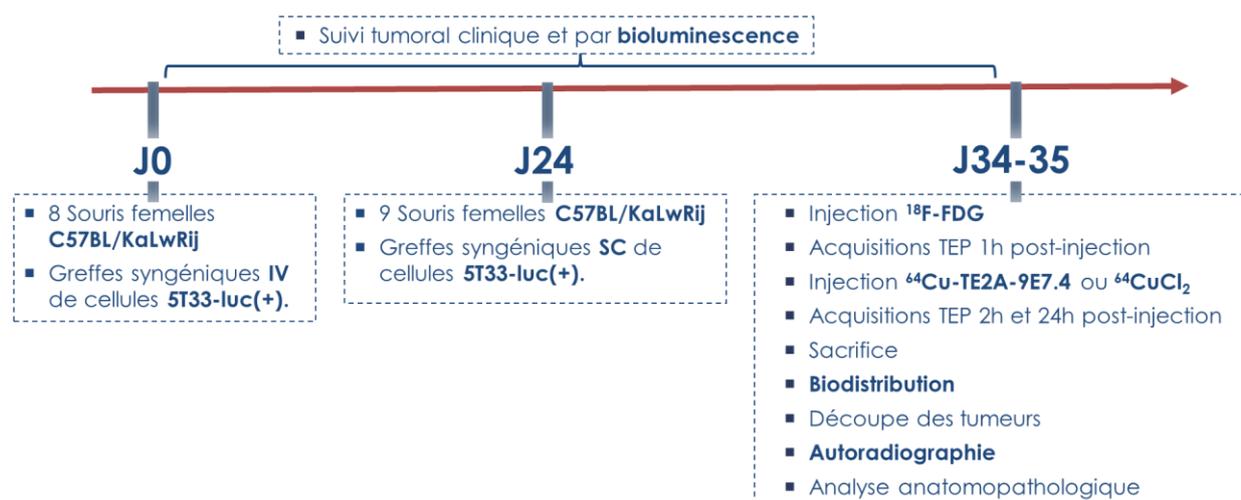


Figure 7 : Protocole expérimental de l'évaluation de la biodistribution de l'AcM anti-mCD138 couplé au ^{64}Cu vs FDG et $^{64}\text{CuCl}_2$

Injection des traceurs

Parmi les souris greffées en SC, 3 souris ont été imagées au FDG puis $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ et 6 souris au FDG et $^{64}\text{CuCl}_2$. Cinq souris greffées en IV ont été imagées au FDG et $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ et 3 souris au FDG et $^{64}\text{CuCl}_2$.

Bioluminescence

La bioluminescence a été réalisée afin de localiser et suivre la progression tumorale chez les souris. Les souris ont été anesthésiées par injection intra péritonéale de solution anesthésique (25 mL de Ketamine à 10 mg/mL, (Panpharma); 3 mL de Xylazine à 2%, (Bayer) ; 10 mL de PBS - 100 $\mu\text{L}/10$ g). Les images ont été acquises pendant 30 secondes dans deux positions, ventrale puis dorsale, par caméra refroidie de type PhotonIMAGER TM (Biospace Lab, France), 10 minutes après l'injection intra-péritonéale de 100 μL de luciférine (Interchim, 12mg/mL). Les images ont été analysées à l'aide du logiciel M3Vision TM (Biospace Lab, France).

Imagerie

Les protocoles d'imagerie sont les mêmes que décrits en première partie. Seules les différences sont détaillées ci-après.

TEP-FDG

Les souris ont reçu approximativement 10 MBq de FDG en IV. Elles étaient à jeun depuis au moins 6 heures pour éviter l'hyperinsulinisme et limiter la fixation myocardique mais gardaient un accès libre à l'eau. Pour éviter les fixations musculaires striées, les souris étaient anesthésiées immédiatement après l'injection du traceur et jusqu'à la fin de l'acquisition des images.

TEP au $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$

La première partie ayant montré que l'acquisition à 24h post-injection était optimale, seule cette dernière a été réalisée.

TEP au $^{64}\text{CuCl}_2$

Pour le $^{64}\text{CuCl}_2$, deux séries d'images des souris entières ont été acquises, 2h et 24h après l'injection.

Etude de biodistribution

Le déroulement des études de biodistribution a déjà été décrit dans la première étape. Ces dernières ont été réalisées chez les 3 souris greffées SC et imagées 24h PI de $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$, chez 3 souris greffées SC et imagées 2h PI de $^{64}\text{CuCl}_2$, chez 3 souris greffées SC et imagées 24h PI de $^{64}\text{CuCl}_2$.

Cryostat

Des tumeurs représentatives SC et des atteintes lésionnelles chez les souris greffées IV ont été prélevées puis congelées par immersion dans une solution de 2-Méthylbutane froid et conservées dans de la carboglace. Les pièces ont été découpées à l'aide d'un Cryostat (Leica CM 3050 Biosystems®) et déposées sur lames Superfrost, sans paraffine. Les coupes étaient sériées pour l'autoradiographie et l'immunomarquage.

Autoradiographie

Le système Beaver® (Ai4R, Nantes, France) a été utilisé pour réaliser les acquisitions autoradiographiques. Il s'agit d'un autoradiographe numérique fonctionnant en comptage pur de la radioactivité. Pour le ^{64}Cu , les électrons Auger issus de la décroissance étaient comptés en priorité par le détecteur (énergie moyenne = 6 keV). Ce système est en effet sensible à tous les émetteurs de particules chargés (électrons, positons, particules alpha), mais insensible aux photons X et gamma. La résolution spatiale annoncée par le constructeur est d'environ 50 μm pour le ^{64}Cu . La technologie utilise un détecteur gazeux ultra-sensible à microstructures amplificatrices d'électrons. L'analyse des images a été réalisée sur le logiciel dédié, Beamage®.

Analyse anatomopathologique et immunohistochimique

Les organes prélevés ont été prélevés puis conservés dans du formaldéhyde (4%) et inclus en paraffine. Afin d'analyser la structure histologique des tumeurs, une coloration standard à l'Hématoxyline-Phoxine-Safran et des immuno-marquages par l'anticorps primaire anti-mCD138-Dylight 650 (40 µg/mL), un contrôle isotypique-Dylight 650 (40 µg/mL) et du DAPI (1,25 µg/mL), ont été effectués par la plateforme microPicell. Le scanner de lames Nanozoomer HAMAMATSU®[®], installé sur la plateforme technique d'imagerie cellulaire, a été utilisé pour réaliser les images d'immunofluorescence. La lecture a été effectuée sur le logiciel dédié (NDPview).

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism version 7.0. Les différences de fixation des radiotraceurs ont été vérifiées au moyen d'un test non paramétrique de Mann-Whitney. L'évaluation de la sensibilité et de la précision du ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 et de la TEP-FDG dans le modèle de maladie disséminée a été effectuée en utilisant comme référence la bioluminescence et l'acquisition TDM de la TEP-FDG. Une valeur de *p* inférieure à 0,05 a été jugée significative.

Résultats

Expériences de biodistribution ex vivo

Les résultats de la biodistribution ex vivo chez les souris à 24h PI de ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 dans le modèle SC de MM étaient similaires à ceux de la première étape avec une fixation tumorale élevée ($9,5 \pm 4,5$ % DI/g à 24 h PI).

La biodistribution du ⁶⁴CuCl₂ a été déterminée à 2h et 24h PI (Figure 8). Le ⁶⁴CuCl₂ a montré une accumulation rapide dans les tumeurs ($7,47 \pm 2,52$ % ID/g à 2h PI) qui a légèrement diminué avec le temps ($2,87 \pm 0,32$ % ID/g à 24h PI). En parallèle, était observée une clairance sanguine significative entre 2h PI ($3,9 \pm 0,28$ % ID/g) et 24h PI ($1,43 \pm 0,29$ % ID/g), entraînant des rapports tumeur/sang stables ($1,88 \pm 0,59$ à 2h PI et $2,05 \pm 0,34$ à 24h PI). Des doses relativement élevées

de $^{64}\text{CuCl}_2$ ont été observées dans des organes non cibles comme le foie, les reins, les poumons, l'intestin et l'estomac. A l'exception du foie ($19,45 \pm 2,47$ % DI/g à 2h PI ; $13,48 \pm 1,13$ % DI/g à 24h PI) et des reins ($24,40 \pm 2,12$ % DI/g à 2h PI ; $9,73 \pm 0,76$ % DI/g à 24h PI), ces fixations élevées n'étaient plus significatives à 24h PI.

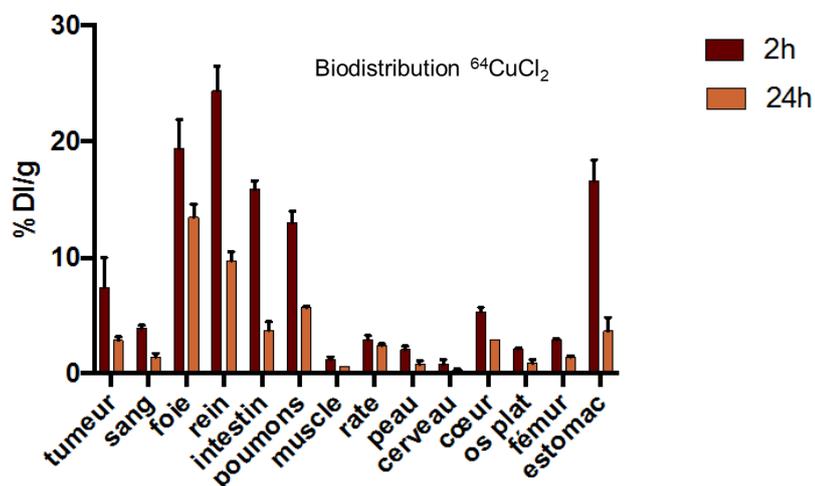


Figure 8: Biodistributions du $^{64}\text{CuCl}_2$ obtenues par organe 2h et 24 h après injection, exprimées en %DI/g d'organe

Dans le modèle SC

Imagerie TEP

Les observations issues de la biodistribution ont été confirmées par les expériences d'imagerie TEP (Figure 9 et 10). Ces dernières ont aidé à mieux visualiser les distributions in vivo de $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ et $^{64}\text{CuCl}_2$ dans le temps.

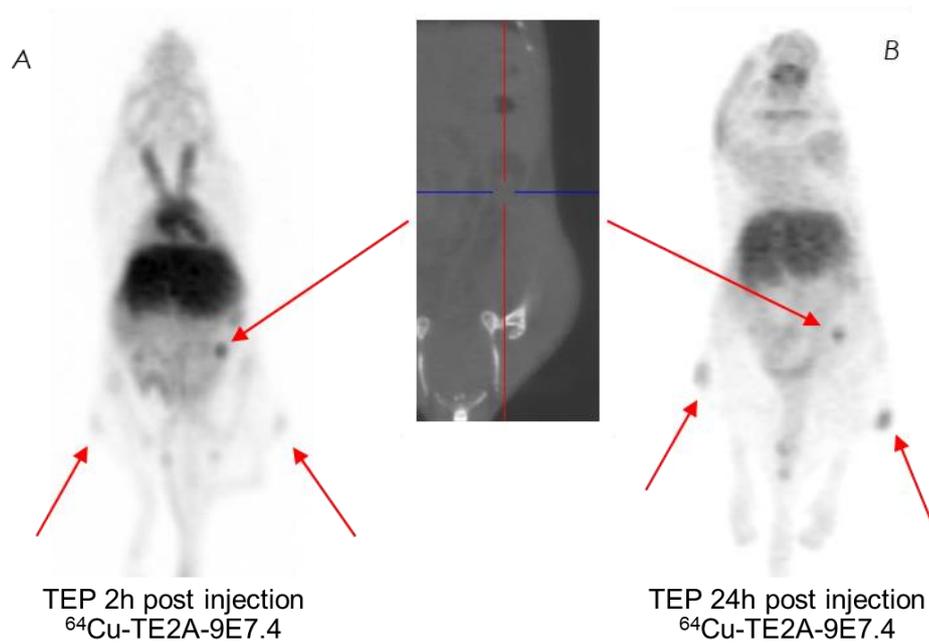


Figure 9: Imagerie TEP à 2 h (A) et à 24 h (B) post-injection de ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 montrant des fixations dans les deux tumeurs sous-cutanées et d'un ganglion lymphatique iliaque (les tumeurs sont indiquées par les flèches rouges).

Sur les images TEP obtenues après injection de $^{64}\text{CuCl}_2$, les tumeurs SC étaient clairement visibles aux deux temps mais avec une accumulation modeste (Figures 10A et 10B). De plus, l'hypersignal et le contraste ont diminué entre 2 h et 24 h PI. Une importante fixation hépatique, rénale et splénique était observée aux deux temps

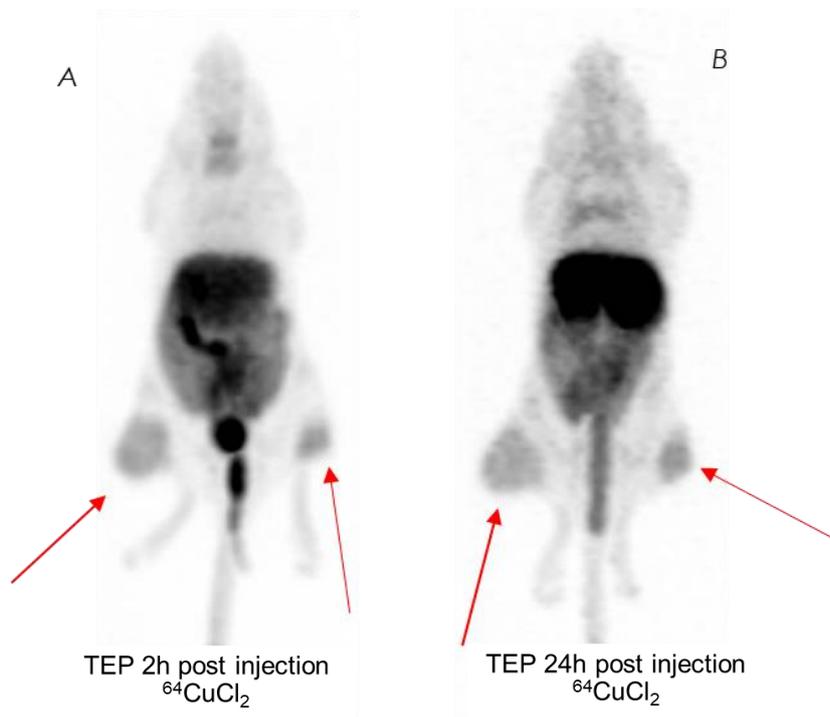


Figure 10: Imagerie TEP à 2 h (A) et à 24 h (B) post-injection de ⁶⁴CuCl₂ montrant des fixations dans les deux tumeurs sous-cutanées (les tumeurs sont indiquées par les flèches rouges).

La comparaison entre les analyses de quantification des images TEP obtenues après 24h PI de ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 et ⁶⁴CuCl₂ a montré une absorption plus élevée dans les tumeurs pour le premier traceur ($9,5 \pm 4,5$ vs $2,32 \pm 0,45$ respectivement pour ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 et ⁶⁴CuCl₂ à 24h PI ; $p = 0,0286$; test non paramétrique).

Autoradiographie

Des acquisitions d'autoradiographie ont été réalisées sur des tumeurs SC de souris respectivement imagées avec du ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 et du ⁶⁴CuCl₂ (Figure 11).

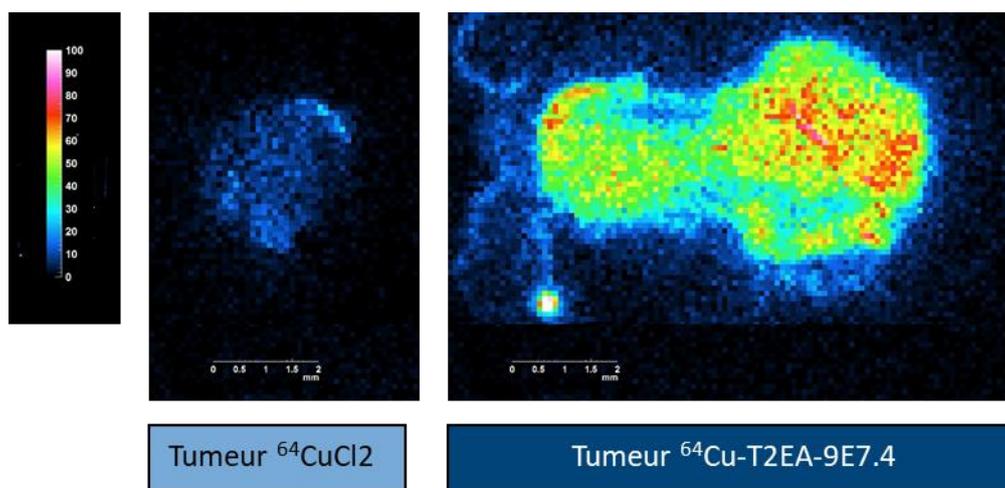


Figure 11: Acquisitions en autoradiographie Beaver de coupes sériees réalisées sur les tumeurs SC de souris respectivement injectées en $^{64}\text{CuCl}_2$ et $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$

Premièrement, l'acquisition de coupe tumorale obtenue avec le $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ a révélé une grande hétérogénéité dans la distribution du vecteur. Deuxièmement, la mesure des coups/ mm^2 a révélé une différence significative ($583,3 \pm 54,3 \pm 54,3$ vs $3277 \pm 316,6$ respectivement pour $^{64}\text{CuCl}_2$ et $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$; $p = 0,0008$; test non paramétrique) entre les deux traceurs, ce qui reflète l'excellente fixation observée avec le radioimmunoconjugué.

Dans le Modèle Orthotopique

Imagerie TEP

Pour établir un modèle de maladie disséminée, des souris ont été injectées par IV et la distribution des lésions tumorales a été suivie et évaluée par bioluminescence. Ces souris ont développé des lésions crâniennes, de la colonne vertébrale, du sacrum et des membres.

Les images TEP obtenues à 1h PI de FDG ont montré une distribution physiologique du FDG dans le cerveau, le cœur, les muscles et les intestins (Figures 12 et 13). À l'exception des lésions de la voûte crânienne, la fixation était corrélée avec les images de bioluminescence, mais avec une intensité limitée dans les tumeurs (Figures 12, 13 et 14). Sur l'imagerie TEP avec le $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$, en plus des fixations physiologiques également observées dans le modèle SC, les métastases osseuses et ganglionnaires étaient distinguées avec d'excellents rapports

tumeurs/bruit de fond. L'imagerie avec le ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 a permis de détecter toutes les lésions observées en imagerie par bioluminescence et a également permis de détecter une atteinte crânienne de souris (Figure 13), indiscernable sur les images de TEP-FDG. Un contraste plus élevé a été observé à 24h PI par rapport aux images réalisées à 2h PI.

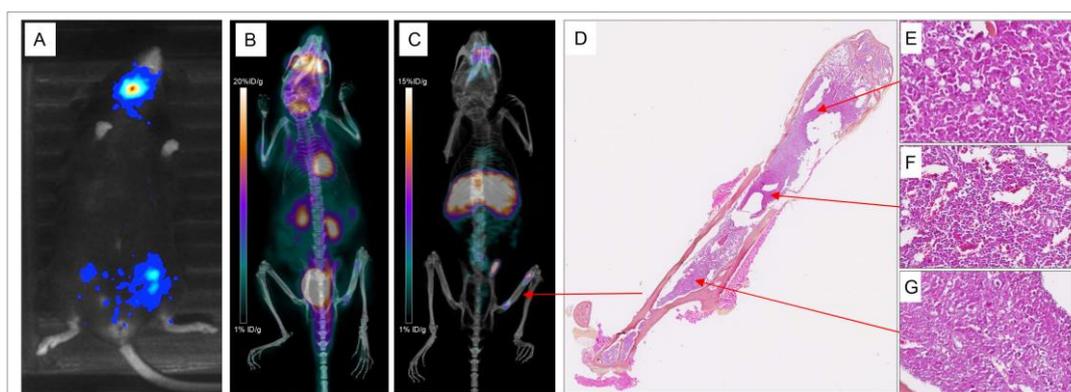


Figure 12: Différentes explorations réalisées chez une souris, greffée en IV : bioluminescence (A), TEP-FDG (B), TEP au ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 (C) et analyse anatomopathologique du fémur gauche en coloration à l'Hématoxyline-Phoxine-Safran (D) retrouvant deux infiltrats plasmocytaires (E et G) séparés par de la moelle saine (F)

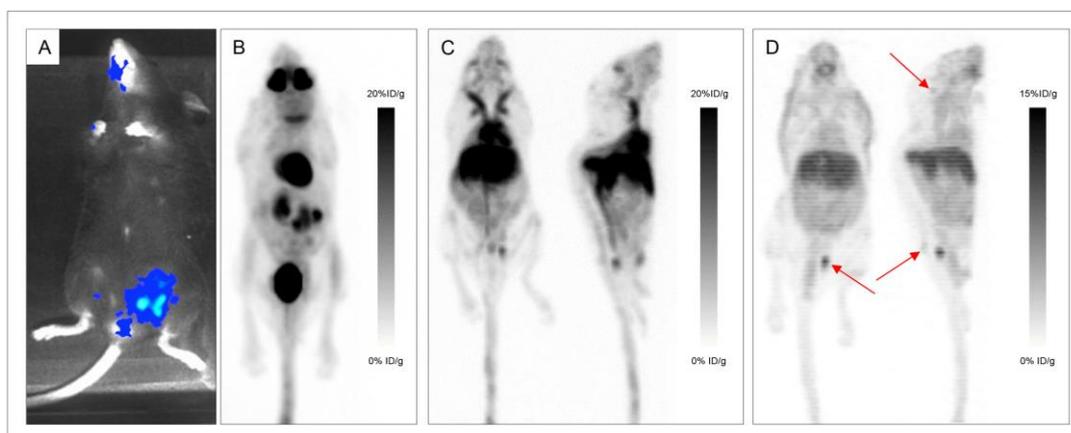


Figure 13: Imagerie par bioluminescence (A), TEP-FDG (B), TEP au ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 à 2h (C) et 24 h post injection (D) montrant des fixations dans le crâne, le sacrum et l'aile iliaque gauche (Les tumeurs sont indiquées par les flèches).

L'imagerie TEP réalisée à 2h et 24 h PI de $^{64}\text{CuCl}_2$ a montré, comme pour l'imagerie TEP chez les souris du modèle SC, une intensité de fixation élevée hépatique et rénale à tous les temps. Concernant la fixation tumorale, cette dernière était peu marquée, avec un contraste moindre que sur les images TEP-FDG (Figure 14) voire inexistante (Figure 15).

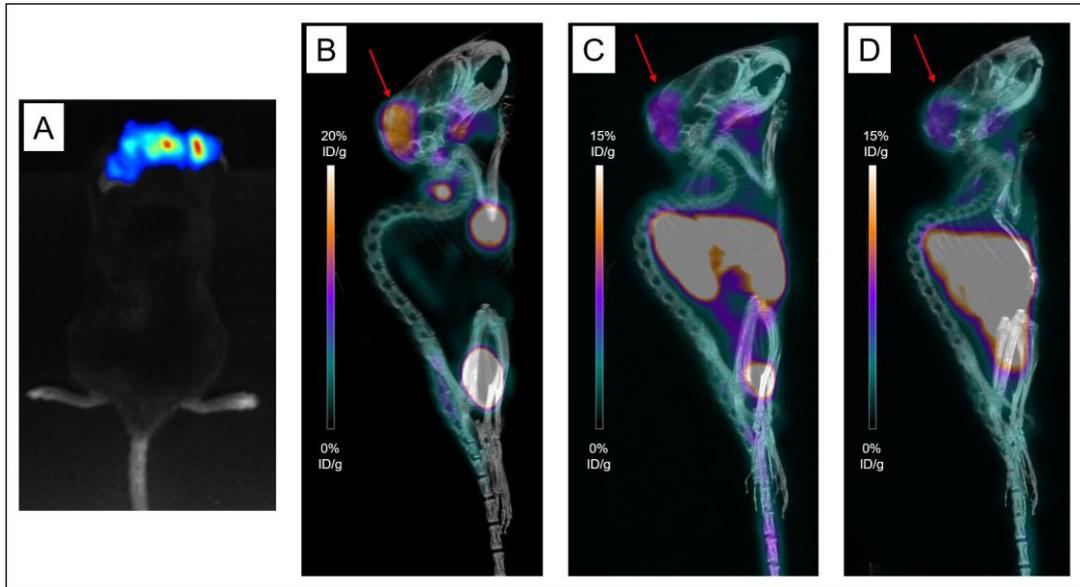


Figure 14: Imagerie par bioluminescence (A), TEP-FDG (B), TEP au $^{64}\text{CuCl}_2$ à 2h (C) et 24 h post injection (D) montrant des fixations dans le crâne (Les tumeurs sont indiquées par les flèches).

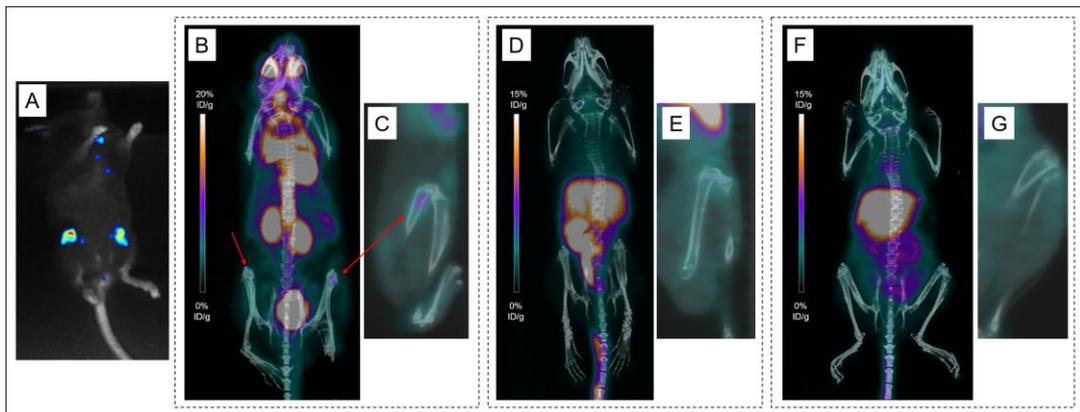


Figure 15: Imagerie par bioluminescence (A) et TEP-FDG (B), montrant des fixations dans les deux fémurs (les tumeurs sont indiquées par des flèches). Aucune absorption significative n'a été observée sur les images TEP 2 h (D) et 24 h (F) après l'injection de $^{64}\text{CuCl}_2$. Images sagittales représentatives du fémur gauche en imagerie TEP (C, E, G).

Histologie

Des tumeurs représentatives SC et deux fémurs ont été collectés pour analyse morphologique. L'analyse des tumeurs SC a révélé de nombreux plasmocytes atypiques et de grande taille. L'analyse morphologique des fémurs a montré une moelle osseuse riche et normale dans le fémur considéré comme négatif sur les images TEP au $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$. Le fémur considéré comme positif sur les images TEP au $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ a montré une moelle osseuse sensiblement normale entourée de

deux infiltrats cellulaires dont la morphologie et les caractéristiques sont similaires à celles de la tumeur SC.

Discussion

Comme nous l'avons précédemment vu, le MM semble être une pathologie candidate pour l'immunoTEP ¹⁷⁴. Bien que les données récentes de la littérature suggèrent que la TEP-FDG soit une technique prometteuse pour l'évaluation du MM avec une valeur tant diagnostique que pronostique, le développement d'un traceur plus spécifique du myélome semble intéressant. Ce travail démontre pour la première fois l'efficacité de l'immuno-TEP anti-CD138 et du ⁶⁴CuCl₂ pour détecter les lésions MM dans un modèle préclinique.

La précédente partie a démontré la fixation significative du ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 chez des souris porteuses de tumeurs SC de MM. Dans cette seconde étape, nous avons cherché à évaluer ce traceur dans un modèle orthotopique. Comme représenté dans les Figure 12 et Figure 13, les images réalisées 24h PI de ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 ont montré un excellent contraste tumoral pour la détection des lésions disséminées. La TEP au ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 a semblé présenter de meilleures performances et obtenir de meilleures résolutions en contraste que la TEP-FDG. En effet, en TEP-FDG, malgré les précautions prises en terme d'anesthésie et de chauffage pour réduire le métabolisme cellulaire ^{175,176}, il a persisté un bruit de fond important expliqué par l'activité métabolique résiduelle des cellules notamment musculaires. De plus, la TEP-FDG présentait beaucoup plus de fixations non spécifiques (musculaire et graisses brunes). Enfin, une lésion crânienne observée en bioluminescence a été retrouvée chez une souris en TEP au ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 et non visible en TEP-FDG (Figure 13). Des études de sensibilité et spécificité n'ont néanmoins pas pu être réalisées devant les performances relatives de la bioluminescence. En effet, comme démontrée lors de l'étude de tumeurs sous-cutanées en bioluminescence par Klerk *et al*, la détermination de la masse tumorale absolue est rendue difficile, d'une part par l'extinction de la bioluminescence par les composants des tissus, d'autre part par l'absence de localisation exacte des lésions tumorales en raison de la résolution spatiale limitée ¹⁷⁷. Deux hyperfixations pathologiques (Figure 12) ont par ailleurs

été comparées à une analyse anatomopathologique, seul réel examen de référence, confirmant l'excellente sensibilité et spécificité du ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 dans le MM.

Cette bonne performance est particulièrement soulignée par le modèle murin utilisé. En effet, dans la littérature, l'utilisation répandue de modèles de xéno greffes sous-cutanées permet habituellement d'évaluer facilement la charge tumorale. Les fixations physiologiques observées dans les organes de clairance tels que le foie et les reins sont théoriquement un inconvénient majeur de l'utilisation d'un modèle de tumeurs syngéniques et orthotopiques car pouvant potentiellement masquer des tumeurs disséminées. De plus, l'utilisation d'un modèle syngénique permet d'accéder à la distribution réelle du vecteur, qu'il soit lié à la fixation épitopique ou à la fixation due au fragment Fc, complexifiant l'analyse des données de biodistribution.

Cette étape a également permis d'étudier un éventuel relargage du cuivre sous forme Cu^{2+} . Etant donné l'impossibilité d'injecter du cuivre sous la forme cationique, nous avons choisi d'injecter aux souris du cuivre sous forme $^{64}\text{CuCl}_2$ afin d'étudier le devenir du métal *in vivo*. Il a d'ailleurs été récemment démontré que le ^{64}Cu sous sa forme ionique pouvait être utilisé directement comme sonde pour l'imagerie TEP de divers types de cancers ¹⁷². Il est intéressant de noter que le MM pourrait encore une fois être un bon candidat; un chélateur du cuivre, l'ATN-224, induisant une mort cellulaire programmée dans les cellules de MM et soulignant le rôle essentiel de cet ion dans cette pathologie ¹⁷⁸. Notre étude est, à notre connaissance, le premier rapport qui explore le potentiel du $^{64}\text{CuCl}_2$ pour l'imagerie du MM. Les résultats des études de biodistribution et des images TEP ont révélé une absorption significative du $^{64}\text{CuCl}_2$ dans les tumeurs SC de MM. Le $^{64}\text{CuCl}_2$ a effectivement montré une accumulation rapide dans les tumeurs SC qui a légèrement diminué avec le temps. Des résultats similaires ont déjà été rapportés dans divers modèles murins de cancers tels que le mélanome, le cancer colorectal, le cancer de la prostate, avec des valeurs d'absorption ou des cinétiques hétérogènes ^{150,171-173,179-181}. L'absorption du $^{64}\text{CuCl}_2$ par les tumeurs est effectivement très variable, dépendant du profil des divers transporteurs, protéines-chaperonnes et molécules de liaison du cuivre et non simplement du niveau d'expression de Ctr1 (Copper transporter 1 protein), comme l'ont démontré certains chercheurs ^{173,180}. Avec une absorption de $7,47 \pm 2,52$ % DI/g à 2 h PI, les performances du $^{64}\text{CuCl}_2$ dans notre étude semblent similaires aux expériences réalisées sur des xéno greffes de mélanome, rapportées

précédemment^{171,182}. Une absorption relativement élevée du $^{64}\text{CuCl}_2$ a également été observée dans des organes non cibles comme le foie, les reins, les poumons, l'intestin et l'estomac. Ces résultats concordent avec les conclusions de la littérature¹⁷². Néanmoins, comparativement aux données obtenues avec l'AcM $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$, la fixation hépatique et digestive du $^{64}\text{CuCl}_2$ était plus importante (respectivement pour le foie, $13,48 \pm 1,13$ % DI/g à 24h PI de $^{64}\text{CuCl}_2$ et $9,04 \pm 0,36$ % DI/g à 24 h PI du $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$). L'analyse des données des différentes imageries, de la biodistribution et de l'autoradiographie Beaver a également montré une hyperfixation tumorale nettement supérieure sur les images au $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ avec un rapport tumeur/bruit de fond plus important. On visualise aussi une variation de ce rapport, avec une tendance à l'augmentation entre 2h et 24h pour les tumeurs imagées au ^{64}Cu couplé à l'anticorps anti-mCD138 et une diminution pour les tumeurs imagées au $^{64}\text{CuCl}_2$.

De même, les performances du $^{64}\text{CuCl}_2$ ont montré leur limite dans le modèle orthotopique et la détection des lésions osseuses disséminées. En effet, même si la plupart des tissus (comme les os et le cerveau) présentaient une absorption relativement faible du $^{64}\text{CuCl}_2$, le rapport tumeur/sang et donc le contraste restait faible avec des performances même inférieures à la TEP-FDG. Ainsi, bien que l'exploration du métabolisme du cuivre comme biomarqueur d'imagerie dans le MM semble intéressante, le $^{64}\text{CuCl}_2$ n'apparaît pas comme un radiotraceur efficace dans cette pathologie. Tout le contraire du $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$.

Conclusion

Cette seconde étape a permis de valider les études de biodistribution du système $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ et de mettre en évidence les performances de la TEP avec l'anti-mCD138 marqué au ^{64}Cu par rapport au FDG ou au $^{64}\text{CuCl}_2$. Le potentiel de ce dernier traceur pour l'imagerie TEP du MM reste incertain. La très bonne sensibilité de l'immunoTEP avec le $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ en fait une piste de recherche à développer en clinique. Néanmoins, du fait du tropisme hépatique du cuivre et de la potentielle présence de cuivre libre, il paraît essentiel de développer un nouvel agent chélatant ou d'essayer le marquage d'un autre radioisotope peut-être à demi-vie plus longue, afin de minimiser l'impact de ces derniers. En effet, l'utilisation d'une

immunoglobuline intacte permet théoriquement de réaliser des images plusieurs jours après l'injection du traceur et le ^{89}Zr avec sa période de plusieurs jours paraît adapté^{183,184}. Cette hypothèse sera explorée dans l'étape suivante.

Troisième Chapitre - Etude de comparaison des immuno-TEPs avec l'Ac anti-mCD138 pour la détection du MM dans un modèle murin syngénique (C57BL/KaLwRij et cellules 5T33) en implantation sous-cutanée et systémique, radiomarquées au ^{64}Cu ou ^{89}Zr .

Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, pour l'immuno-TEP, le choix du radionucléide reste une question fondamentale⁸². Combinant des demi-vies appropriées pour la biodistribution des AcM et des propriétés d'émission favorables pour l'imagerie TEP, le ^{64}Cu et le ^{89}Zr ont monopolisé l'attention des équipes de recherche durant la dernière décennie avec un avantage pour le second en terme de nombre d'études^{183,185}. Cependant, la libération de ^{89}Zr par le radiotraceur, rapportée par certains, peut représenter un inconvénient pour l'imagerie des lésions osseuses¹¹³ et donc pour l'évaluation du MM. En parallèle, le tropisme hépatique du ^{64}Cu est également un inconvénient. Dans ce travail, un nouveau traceur basé sur le 9E7.4 marqué au ^{89}Zr a été évalué en utilisant la desferrioxamine B (DFO) comme agent chélateur. Ces résultats ont été comparés à ceux de la TEP-FDG et à l'imagerie par bioluminescence comme standards et à ceux de l'imagerie TEP à l'oxalate de ^{89}Zr comme contrôle de la libération potentielle de ^{89}Zr par le chélateur. De plus, afin d'évaluer le radioimmunotraceur anti-CD138 optimal, nous avons comparé ces données à celles obtenues dans les Chapitres 1 et 2.

Matériels et Méthodes

Lignées, cultures cellulaires et modèle animal:

La même lignée cellulaire de myélome multiple murin 5T33-luc(+), la même espèce de souris femelles C57BL/KaLwRij et les mêmes modèles que précédemment décrits ont été utilisés. Douze souris ont été greffées en SC et sept souris en IV.

Traceurs

Trois traceurs ont été utilisés : le FDG, le ^{89}Zr -DFO-9E7.4 et l'oxalate de ^{89}Zr .

Préparation du ^{89}Zr -DFO-9E7.4

Le DFO est l'agent chélatant le plus couramment utilisé dans les études sur les radio-immunoconjugués marqués au ^{89}Zr . Le P-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine B (DFO-SCN) a été acheté à Macrocyclics (Dallas, États-Unis). Le DFO-9E7.4 a été préparé conformément aux protocoles publiés¹⁸⁶ en conjuguant le DFO-SCN au 9E7.4 AcM pour ensuite chélater le ^{89}Zr ($t_{1/2} = 78.4$ h ; β^+ , 22.7%, $E\beta^+ \text{ max} = 897$ keV). Brièvement, un échantillon de 4 mg/mL de 9E7.4 a été préparé dans une solution saline de tampon borate (0,3 M, pH 9,0). Le DFO-SCN fraîchement dissous dans du diméthylsulfoxyde a été ajouté au mélange avec un rapport molaire AcM:chélateur de 1:5. La conjugaison s'est déroulée pendant 3 h à température ambiante sur un bloc agitateur. Le DFO-9E7.4 a été purifié de l'excès de DFO-SCN par dialyse membranaire à 50 kDa Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) avec 0,25 M de tampon acétate de sodium (pH 5,5) comme tampon de dialyse et concentré à 1,5 mg/mL.

Pour le marquage du ^{89}Zr , sous agitation constante, 185 MBq d'oxalate de ^{89}Zr ont été ajustés à un pH de 7,2 dans un tampon HEPES (0,5 M) et Na_2CO_3 (2 M). Enfin, 330 μL de DFO-9E7.4 (1,5 mg/mL) ont été ajoutés et le pH a été réajusté à 7,5 à l'aide du tampon HEPES (0,5 M). Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 60 minutes. La pureté radiochimique a été déterminée par chromatographie sur couche mince ITLC-SG à l'aide d'un tampon citrate (pH 4,5 ; 0,1 M) et était de 93,8%. L'immunoconjugué a donc été ensuite purifié par chromatographie d'exclusion à l'aide d'une colonne PD-10 (Sephadex G25, GE Healthcare, Chicago, Illinois, États-Unis). La pureté radiochimique a finalement été réévaluée par ITLC-SG. L'immunoréactivité de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 a été déterminée à l'aide de billes magnétiques (Pierce, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) marquées avec un peptide de 40 acides aminés reconnu par l'anticorps 9E7.4 conformément au protocole du fournisseur. La pureté radiochimique et l'immunoréactivité étaient respectivement de 98 % et 80 ± 5 %. A la fin du radiomarquage, l'activité spécifique du ^{89}Zr -DFO-9E7.4 était de $5 \pm 0,8$ MBq/100 μL (116 ± 13 MBq/mg).

Préparation de l'oxalate de ^{89}Zr

L'oxalate de ^{89}Zr fourni a été neutralisé avec du Na_2CO_3 (2 M) et dilué avec une solution saline (NaCl à 0,9%) pour obtenir une concentration finale d'oxalate de 10 mM.

Déroulement de l'étude *in vivo*

Le protocole est représenté dans les Figure 16 et Figure 17.

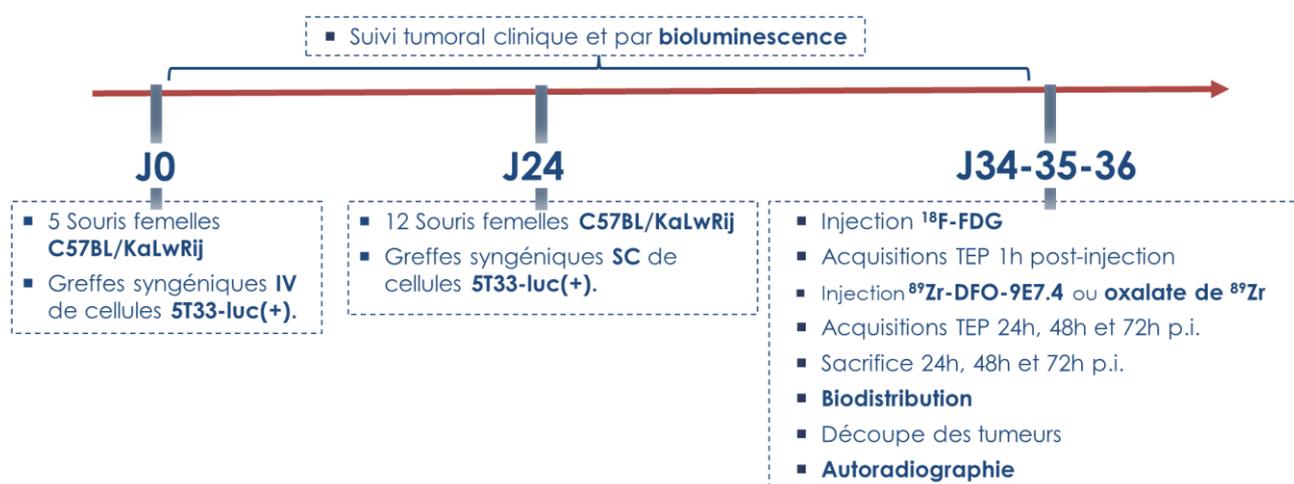


Figure 16: Protocole expérimental de l'évaluation de la biodistribution de l'AcM anti-mCD138 couplé au ^{89}Zr vs FDG et Oxalate de ^{89}Zr

Pour le modèle SC, neuf souris ont été imagées au FDG puis avec l'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4 et trois avec le FDG puis l'oxalate de ^{89}Zr .

Pour le modèle orthotopique, cinq souris ont été imagées avec le FDG et l'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4. Deux souris ont bénéficié d'une TEP-FDG et d'une TEP au ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 au cours d'une première session, puis une semaine plus tard d'une nouvelle TEP-FDG et d'une TEP au ^{89}Zr -DFO-9E7.4.

Une souris sans greffe a été imagée avec de l'oxalate de ^{89}Zr comme témoin.

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism version 7.00. La significativité des différences de fixation a été évaluée à l'aide d'un test non paramétrique de Mann-Whitney. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été jugée significative.

Résultats

Expériences de biodistribution ex vivo

Les résultats de la biodistribution ex vivo réalisée à 24 h et 72 h PI sont présentés dans la figure 18. Dans l'étude menée à 24 h PI de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 (figure 18A et figure 18B) dans le modèle SC, le traceur a montré une accumulation correcte dans les tumeurs qui a diminué à 72 h PI. Une clairance sanguine significative entre 24 h PI et 72h PI du ^{89}Zr -DFO-9E7.4 a été observée, entraînant une augmentation concomitante du rapport tumeur/sang. Le radio-immunoconjugué a également montré des doses relativement élevées dans plusieurs organes comme le foie, la rate et les intestins. Une faible absorption musculaire a été observée à 24h et 72h PI. Tous les autres organes présentaient des concentrations d'activité de 5 % DI/g ou moins à 24 h avec une activité décroissante à 72 h PI. Seuls les os plats et les fémurs ont montré une activité croissante entre 24 h et 72 h PI. Afin de contrôler la libération potentielle de ^{89}Zr , des expériences de biodistribution de l'oxalate de ^{89}Zr ont été effectuées à 24 h PI (figure 18C et figure 18D). Ces études ont montré une forte fixation osseuse et relativement élevée dans plusieurs organes normaux, y compris le sang et les tumeurs, avec un très mauvais rapport tumeur/sang.

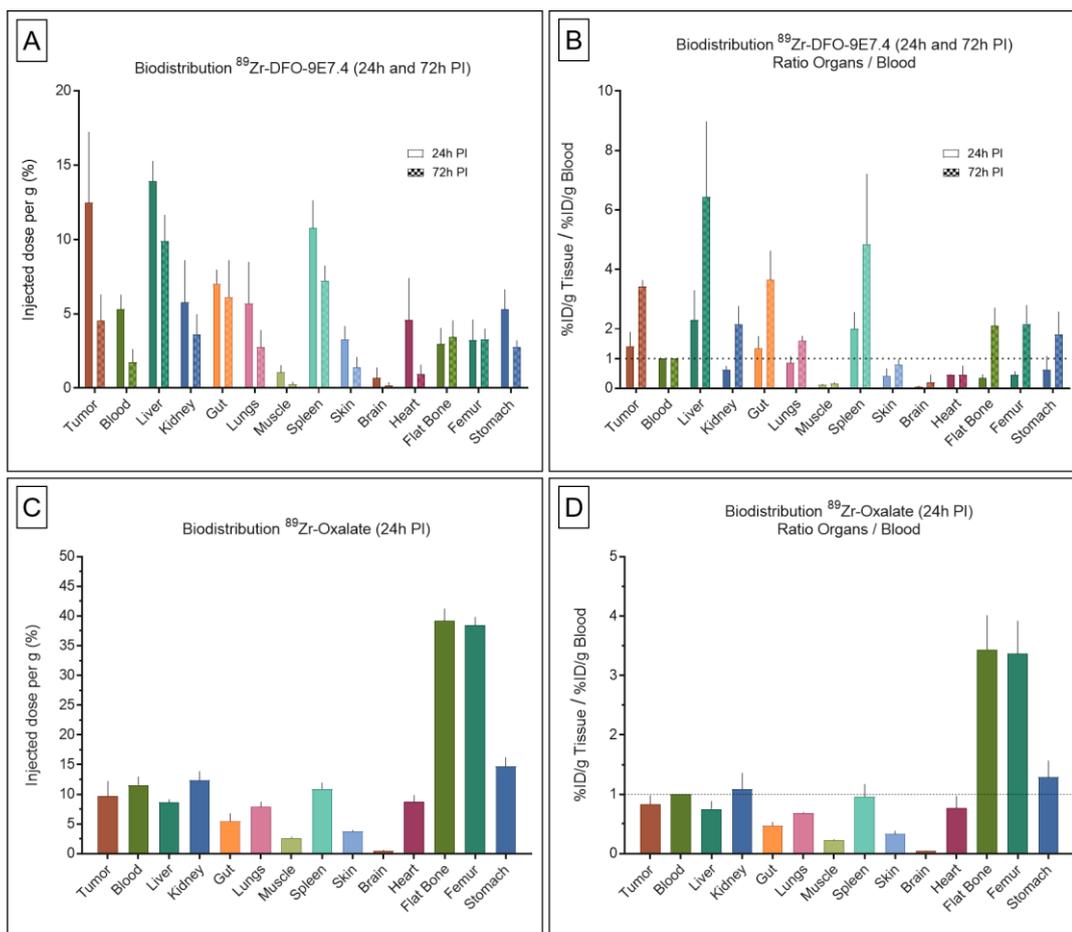


Figure 18: Résultats de la biodistribution et rapports organes/sang de l'AcM $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ et de l'oxalate de ^{89}Zr chez des souris porteuses de tumeurs. Résultats de biodistribution ex vivo (A) et rapports organes/sang (B) de l'AcM $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ à 24 h et 72 h post-injection, dans le modèle de tumeur sous-cutanée ($n = 3$ pour chaque groupe). Résultats de la biodistribution ex vivo (C) et rapports organes/sang (D) de $^{89}\text{Zr-oxalate}$ à 24 h PI ($n = 3$).

Imagerie TEP

Dans le modèle SC

In vivo, comme précédemment, le ciblage des lésions de MM par l'AcM $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ a d'abord été évalué dans un modèle SC. Les différentes séquences d'imagerie TEP (figures 19 et 20) ont confirmé les données de biodistribution et aidé à visualiser les distributions in vivo de l'AcM $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ dans le temps. Sur les images TEP obtenues à 24 heures PI, les tumeurs SC étaient clairement visibles avec le $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ (figure 19A) tout en présentant une fixation très modeste avec l'oxalate de ^{89}Zr (figure 19C), le FDG étant utilisé comme témoin (figure 19B). La

figure 20 illustre la décroissance progressive du contraste des tumeurs SC de 24 h PI, 48 h PI à 72 h PI et l'augmentation notable de l'absorption osseuse (prédominante sur les articulations coxo-fémorales, épaules et genoux). Une augmentation des fixationq hépatique, splénique et digestive était observée au cours du temps. En raison de cette accumulation de ^{89}Zr sur les os, significative dès 48 h PI, le point de 24 h PI semble être le meilleur temps pour l'imagerie immuno-TEP avec ce radio-immunoconjugué.

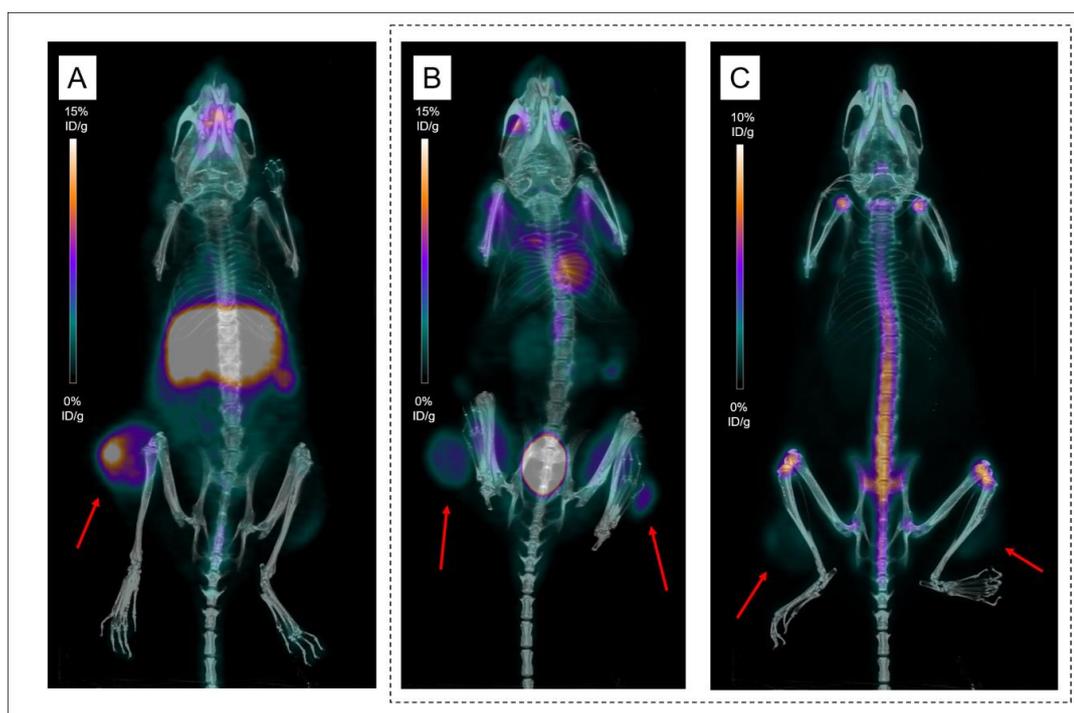


Figure 19: Imagerie TEP après injection de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 (A), FDG (B) et oxalate de ^{89}Zr (C) chez des souris porteuses de tumeurs SC. (Les tumeurs sont indiquées par des flèches rouges)

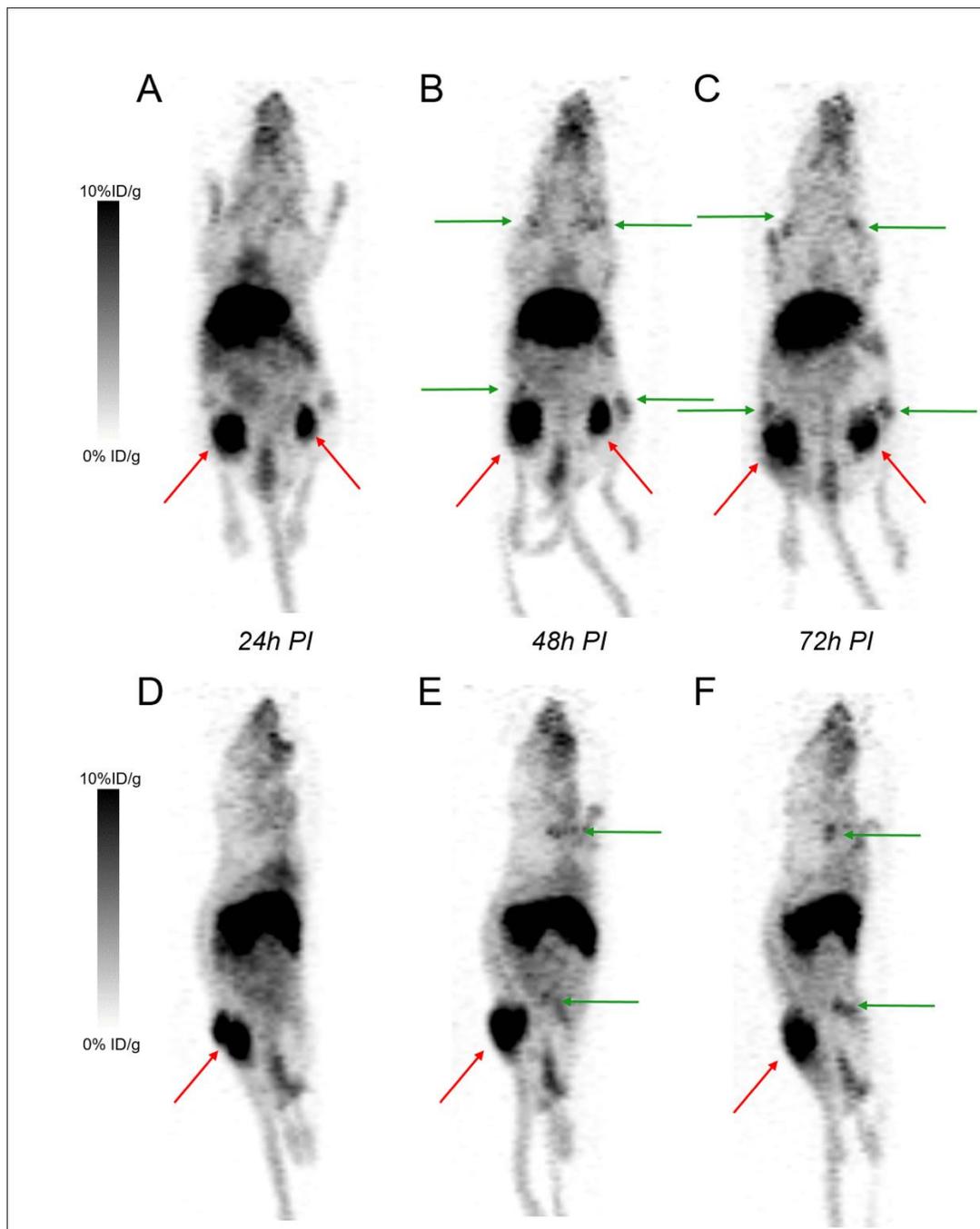


Figure 20: Imagerie TEP à 24 h (A;D), 48 h (B;E) et 72 h (C;F) post-injection de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 dans le modèle SC (Les tumeurs sont indiquées par des flèches rouges, et les fixations osseuses non spécifiques par des flèches vertes)

Dans le modèle orthotopique

Les souris injectées par voie IV ont développé des lésions dans le crâne, la colonne vertébrale, le sacrum, les ailes iliaques et les membres.

L'imagerie TEP PI de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 a été effectuée à 24 h, 48 h et 72 h (figure 21). En plus des fixations physiologiques également observées dans le modèle SC, les lésions osseuses étaient facilement identifiables présentant d'excellents rapports tumeur/bruit-de-fond. L'imagerie TEP avec l'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4 a permis de détecter toutes les lésions observées sur l'imagerie par bioluminescence. Un contraste élevé était observé à tous les temps d'imagerie, mais, comme dans le modèle SC, les images TEP réalisées à 24 heures PI semblaient moins gênées par les fixations osseuses aspécifiques (Figure 21).

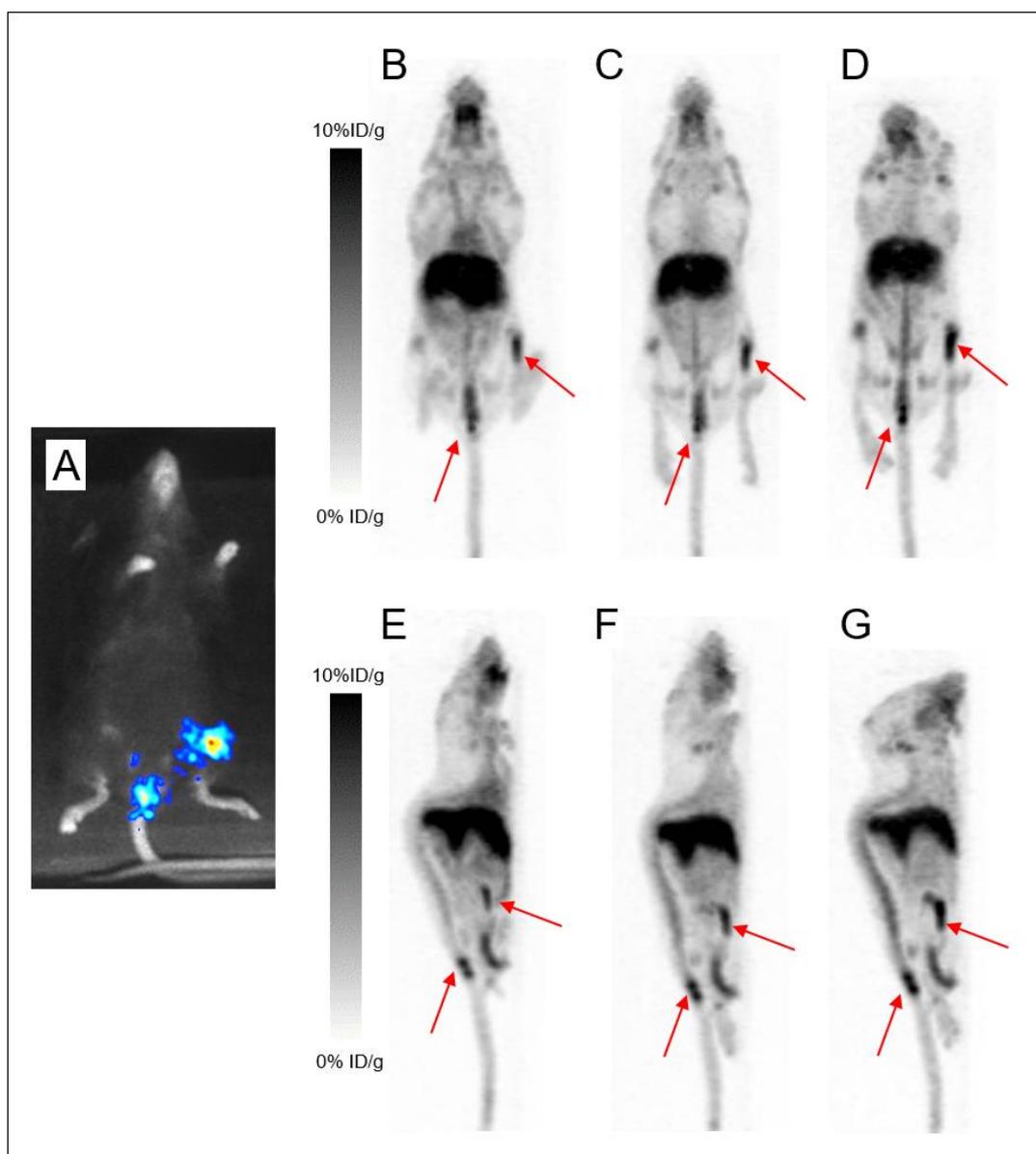


Figure 21 : Imagerie par bioluminescence (A) et Imagerie TEP 24 h (B;E), 48 h (C;F) et 72 h post injection (D;G) de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 dans le modèle disséminé

Focus sur le compartiment osseux

La fixation osseuse du ^{89}Zr a été étudiée plus en détail dans un groupe représentatif de souris présentant des lésions fémorales, imagées à 24h PI et 48h PI, (figure 22). Les deux fémurs de chacune des souris ont été prélevés et des acquisitions autoradiographiques ont été effectuées. Une accumulation d'activité a été observée sur les images de TEP et d'autoradiographie dans les constituants minéralisés des os (os compact et épiphyses) avec des intensités similaires entre l'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4 à 48h PI et l'oxalate de ^{89}Zr . Cette forte affinité apparente du ^{89}Zr pour les os et les articulations a clairement entravé la bonne visualisation des lésions de MM dans le compartiment cellulaire de la moelle osseuse, à 48 h PI comparativement aux images réalisées à 24 h PI (Figure 22).

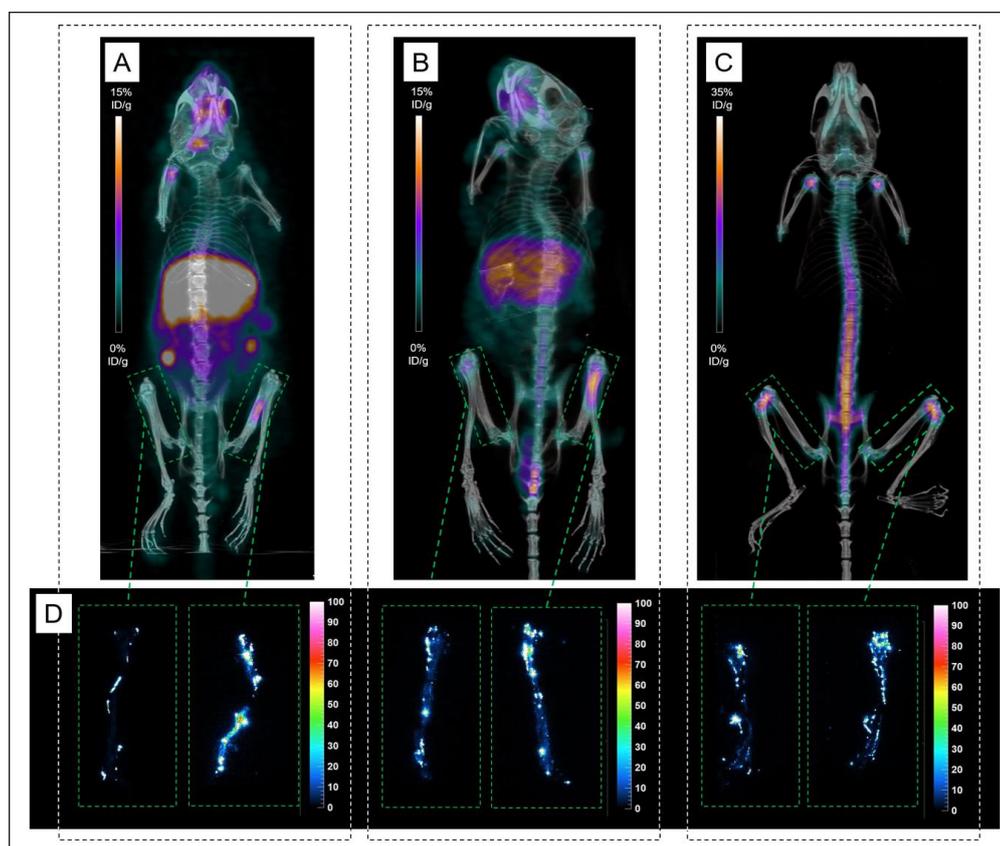


Figure 22: Imagerie TEP et acquisitions d'autoradiographie numérique réalisées sur des fémurs de souris imagés au ^{89}Zr -DFO-9E7.4 ou oxalate de ^{89}Zr . Imagerie TEP 24h (A) et 48h (B) après l'injection de ^{89}Zr -DFO-9E7E7.4 de souris montrant des lésions fémorale gauches. Imagerie TEP 24h après injection d'oxalate de ^{89}Zr (C). Acquisitions en autoradiographie numérique réalisées sur les fémurs des souris (D).

La figure 23 illustre la modification du contraste observé dans le modèle orthotopique visible pour certaines souris dès 24h PI. En effet, l'imagerie TEP à 24h PI de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 des souris présentées sur les Figure 23B, Figure 23C, Figure 23E, et figure 23F a montré des fixations osseuses multiples correspondant à des lésions de MM visibles par bioluminescence. Cependant, une fixation articulaire symétrique des épaules et genoux a également été observée (Figure 23E et figure 23F.), correspondant à des foyers osseux faussement positifs dus à la présence de ^{89}Zr libre.

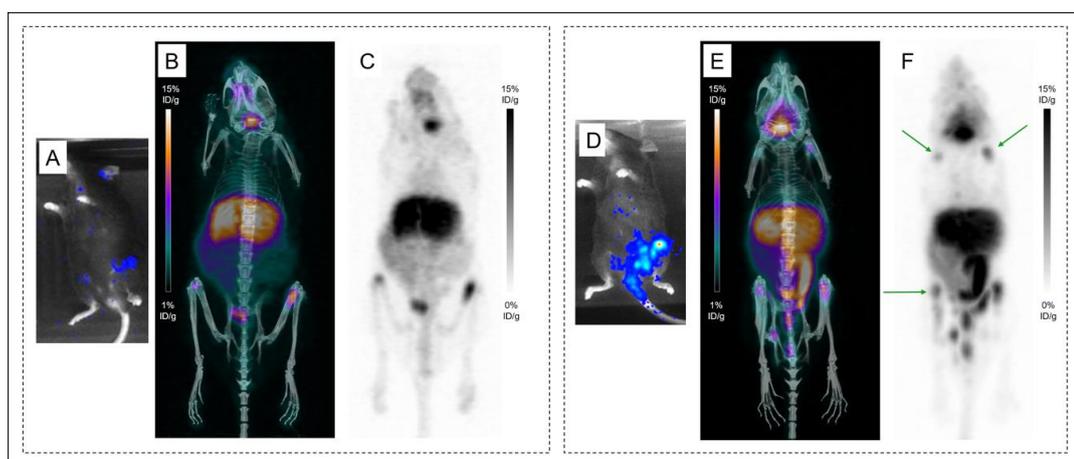


Figure 23: Modification du contraste dans le modèle disséminé imagé avec l'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4 à 24h. Imagerie par bioluminescence (A) révélant des lésions dans les deux fémurs. Images TEP 24 h après l'injection de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 (B et C) montrant une fixation de ces mêmes lésions dans les deux fémurs. Imagerie par bioluminescence (D) révélant des lésions dans le sacrum, le fémur gauche et les deux ailes iliaques. Images TEP 24 h après l'injection de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 (E et F) montrant une fixation correspondante dans le sacrum, le fémur gauche et les ailes iliaques. De multiples foyers osseux faussement positifs ont également été observés (indiqués par des flèches vertes).

Comparaison des deux radio-immunoconjugués

Sur les mêmes souris

Afin de déterminer le meilleur radio-immunoconjugué dans le cadre de l'imagerie TEP antiCD138 de lésions de MM, le 9E7.4 marqué au ^{89}Zr et celui marqué au ^{64}Cu ont été comparés. L'AcM ^{64}Cu -TE2A-9E7.4, d'abord, puis l'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4, sept jours plus tard, ont été utilisés pour une série d'imagerie chez deux souris. Des images avec un excellent contraste tumoral ont été obtenues (Figure 24). Les images TEP ont été réalisées 24 h PI, ce délai apparaissant optimal pour les deux traceurs.

Les deux traceurs TEP ont permis la détection de toutes les lésions observées par bioluminescence. Une lésion du crâne d'une des 2 souris a été visualisée sur l'imagerie TEP avec l'AcM $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$, (Figure 24.E), non retrouvée sur les images TEP-FDG (Figure 24.B). Cette lésion était identifiable sur l'imagerie TEP PI de $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ avec un contraste tumeur/tissu normal plus élevé. Ceci s'explique probablement par une progression tumorale dans l'intervalle de sept jours séparant les deux immuno-TEP; progression illustrée par la visualisation de l'atteinte crânienne sur les deuxièmes images de TEP-FDG (Figure 24.F).

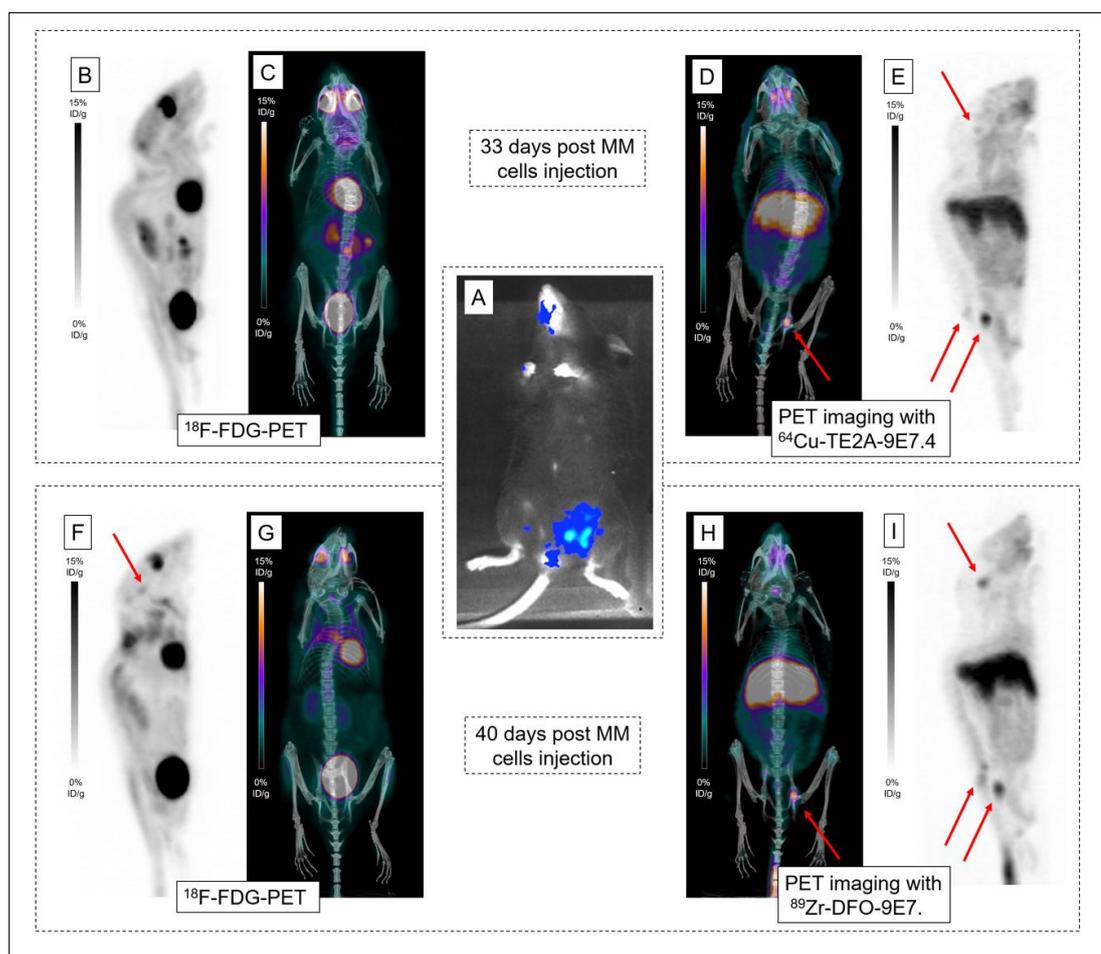


Figure 24: Comparaison d'imagerie TEP avec les AcM $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ et $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$. Imagerie par bioluminescence (A) révélant des lésions de la colonne vertébrale et de l'aile iliaque gauche. TEP-FDG (B; C) et imagerie TEP à 24 h post-injection de $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ (D;E), réalisées 33 jours après injection des cellules de myélome multiple. TEP-FDG (F;G) et imagerie TEP à 24 h post-injection de $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ (H;I), réalisées 40 jours après injection des cellules. Les lésions identifiables ont été repérées par des flèches rouges dans le crâne, la colonne vertébrale et l'aile iliaque gauche.

Entre les expérimentations des Chapitres 2 et 3.

Malgré des intensités de fixation similaires sur les tumeurs et organes, quelques différences dans la métabolisation des AcM marqués au ^{89}Zr ou au ^{64}Cu ont été observées à 24h PI, comme le montrent les données de biodistribution (Figure 25), extraites des Figure 6 et Figure 18. L'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4 a effectivement montré des activités discrètement supérieures à celles du ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 dans le foie ($13,92 \pm 1,36$ % DI/g contre $9,04 \pm 0,36$ % DI/g, respectivement, à 24 h PI ; $p = 0,133$; test non paramétrique) et une accumulation plus importante dans les os ($3,1 \pm 1,15$ versus $1,48 \pm 0,29$, respectivement, à 24 h PI ; $p = 0,006$; test non paramétrique), la rate et le sang. Il en a résulté des ratios tumeurs/sang nettement plus élevés pour l'immunoconjugué marqué au ^{64}Cu ($4,08 \pm 1,09$ contre $1,42 \pm 0,24$, respectivement, pour le ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 et le ^{89}Zr -DFO-9E7.4 à 24 h PI ; $p = 0,0391$; test non paramétrique). De même, des rapports tumeurs/os significativement plus élevés étaient observés avec le ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 (Figure 26) ($8,59 \pm 3,64$ pour le ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 à 24 h PI contre $4,13 \pm 1,06$ et $1,35 \pm 0,32$ pour le ^{89}Zr -DFO-9E7.4 à 24 h et 72 h PI respectivement ; $p = 0,0127$; test non paramétrique).

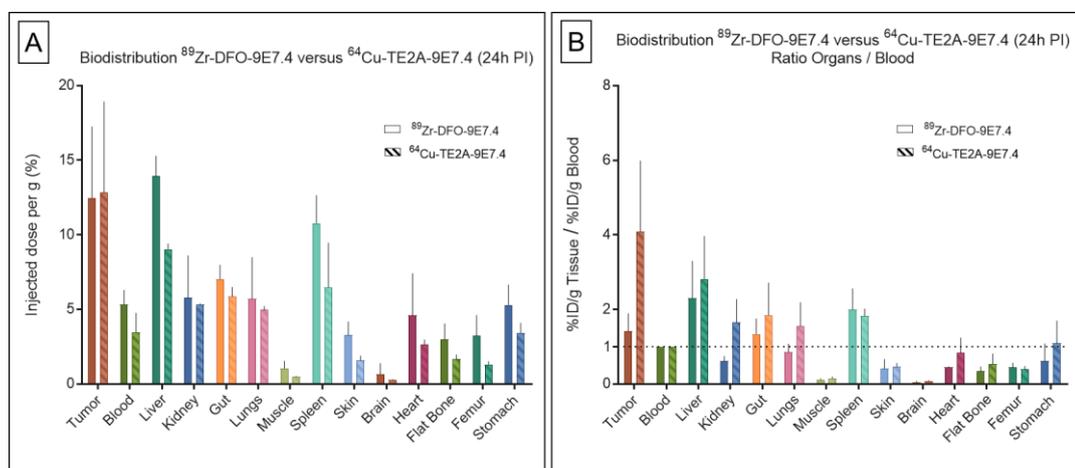


Figure 25: Résultats de la biodistribution (A) et rapports organes/sang des AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4 et ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 (B) chez des souris porteuses de tumeurs. ($n = 3$ pour chaque groupe). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la dose radioactive injectée par gramme de tissu (% ID/g) et présentées en moyenne \pm écart-type.

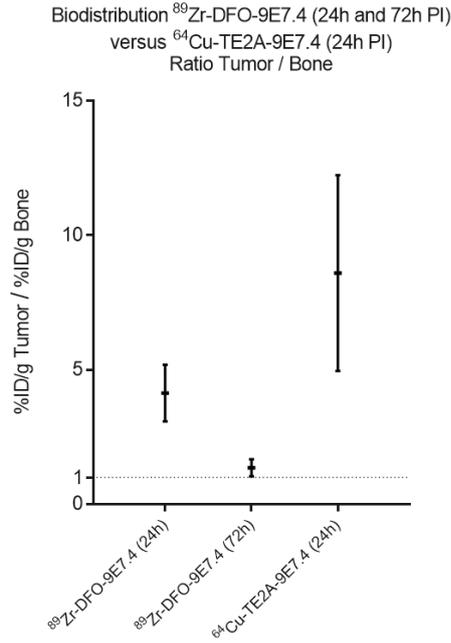


Figure 26: Rapports tumeurs/os de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 et ^{64}Cu -TE2A-9E7.4. dans le modèle tumoral sous-cutané (n = 3 pour chaque groupe).

Discussion

Au cours des dernières années, l'immunoTEP s'est imposée comme un outil prometteur de la médecine personnalisée dans le contexte des stratégies de traitement multimodal⁸². Dans ce contexte, les propriétés favorables du ^{89}Zr pour l'imagerie des AcM ont entraîné un intérêt croissant pour cet isotope et son utilisation¹⁸³. Nous avons évalué dans ce travail les performances de cet isotope comme alternative au ^{64}Cu pour l'imagerie des lésions de MM avec l'anti mCD138 9E7.4.

Cette étude a montré que l'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4 se liait efficacement aux tumeurs exprimant CD138 et permettait l'acquisition d'une imagerie TEP satisfaisante dans notre modèle murin syngénique. Le radio-immunoconjugué affichait de bonnes propriétés de ciblage, permettant une bonne résolution en contraste dès 24h PI. Les images ont montré d'excellents rapports tumeur/bruit-de-fond et bien que le contraste ait diminué à 48h PI et 72h PI, les tumeurs restaient clairement visibles avec le ^{89}Zr -DFO-9E7.4. Les données de biodistribution concordaient bien avec ces résultats issus de la TEP et montraient une fixation

tumorale maximale de l'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4 à 24h PI ($12,47 \pm 4,77$ % DI/g) qui diminuait avec le temps. Dans l'ensemble, le ^{89}Zr -DFO-9E7.4 présentait une accumulation nettement plus faible dans les tissus non cibles avec une activité décroissante à 72h PI, sauf dans le foie, qui affichait la deuxième activité la plus intense à 24h PI ($13,92 \pm 1,36$ % DI/g) et des temps de résidence supérieurs. Seuls les os plats ($2,97 \pm 1,07$ % ID/g à 24h PI et $3,43 \pm 1,12$ % ID/g à 72h PI) et les fémurs ($3,22 \pm 1,38$ % ID/g à 24h PI et $3,30 \pm 0,70$ %ID/g à 72h PI) ont montré une activité croissante entre 24h et 72h PI. De telles observations n'avaient pas été notées avec le ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 et sont cohérentes avec certaines études précliniques décrivant la transchelation progressive in vivo du ^{89}Zr dans le temps¹¹³.

A ce jour, le DFO est le chélateur le plus couramment utilisé dans les études sur les radio-immuno-conjugués marqués au ^{89}Zr ^{183,186}. Cependant, malgré la bonne stabilité du complexe ^{89}Zr -DFO sur une courte période de temps dans les études précliniques, des délais de circulation in vivo prolongés entraînent une libération substantielle de ^{89}Zr du DFO et une augmentation de la fixation à l'os du ^{89}Zr ^{113,187-190}. Comme le montrent les images TEP, des dépôts osseux de ^{89}Zr ont été observés de façon marquée aux épiphyses des humérus, des tibias et des fémurs à 48 h PI et 72 h PI (figures 20 et 21), mais aussi dès 24h PI. En effet, en raison d'une forte affinité pour le phosphate, le ^{89}Zr est incorporé à l'hydroxyapatite, aux phosphates constitutifs des os et particulièrement dans les épiphyses où la formation osseuse est plus active^{113,191}. Ceci est illustré par la TEP et l'imagerie par autoradiographie (Figure 22) où départager visuellement l'os minéralisé du compartiment médullaire présentant les lésions tumorales semblait moins évident à 48 h PI qu'à 24 h PI. Les images TEP avec l'AcM ^{89}Zr -DFO-9E7.4 se « transforment » ainsi lentement mais sûrement en images TEP à l'oxalate de ^{89}Zr avec le temps. Or, la stabilité des isotopes après chélation et le devenir des radionucléides libres sont des questions fondamentales pour la sélection des isotopes dans la conception d'un radiotraceur¹⁹². En effet, la dissociation du complexe ^{89}Zr -DFO pourrait nettement réduire l'efficacité de l'immuno-TEP pour l'imagerie des lésions osseuses, la fixation non spécifique du ^{89}Zr libre aux sites de renouvellement osseux pouvant induire de faux positifs osseux. Cet inconvénient est notamment illustré à la Figure 23, où de multiples foyers osseux faussement positifs sont observés.

Ainsi, bien que le ^{89}Zr possède un grand potentiel, cet isotope apparaît actuellement limité pour les études précliniques et la transition en clinique notamment dans l'exploration des patients atteints de MM. Dans les modèles oncologiques murins, de nombreuses métastases surviennent dans les métaphyses et les épiphyses des os longs. Ces sites conjuguent en effet, un remodelage osseux actif et un flux sanguin élevé avec des sinusoides fenestrées qui prédisposent à l'embolisation et la croissance des cellules tumorales^{193,194}. La fixation du ^{89}Zr libre préférentiellement sur ces sites a également un impact direct sur l'immuno-TEP et son utilisation en tant que compagnon à la planification thérapeutique. De multiples études précliniques ont ainsi rapporté l'utilisation d'AcM marqués au ^{89}Zr avec des doses élevées retrouvées dans le compartiment osseux, ce qui (bien que non systématiquement décrit ou commenté) a clairement modifié l'interprétation des images TEP^{188-190,195,196}. Ces résultats sont également en accord avec les données issues de la littérature sur l'utilisation de l'immuno-TEP avant la RIT avec une grande disparité rapportée entre la distribution des conjugués ^{89}Zr et des conjugués RIT^{124,197,198}. Sans parler du fait que ces études précliniques ont été réalisées dans des modèles de xénogreffes de tumeurs humaines qui surestiment généralement l'absorption tumorale, ces dernières étant la seule source d'expression de l'antigène par opposition au modèle murin syngénique.

En ce qui concerne les données cliniques, la plupart des études ne rapportent que de minimes fixations à l'os. Le remaniement osseux physiologique chez l'homme étant significativement plus lent que chez les rongeurs, la libération de ^{89}Zr ne semble pas empêcher l'utilisation de ce radionucléide chez les patients¹⁹⁹⁻²⁰². Toutefois, des travaux récents faisant état d'un taux élevé de foyers faux-positifs osseux avec l'utilisation de trastuzumab marqué au ^{89}Zr chez des patientes atteintes d'un cancer du sein^{203,204} laissent planer le doute sur l'intérêt de ce couple radionucléide/chélateur.

Dans cette étape, les AcM ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 et ^{89}Zr -DFO-9E7.4 ont été également directement comparés afin de choisir le meilleur traceur. Comme vu précédemment, le ^{89}Zr et le ^{64}Cu libres s'accumulent respectivement dans les os et le foie. Pourtant, la synthèse de nos données montre des activités similaires de 9E7.4 marqués au ^{89}Zr et au ^{64}Cu dans le foie ($13,92 \pm 1,36$ % DI/g contre $9,04 \pm 0,36$ % DI/g, respectivement, à 24 h PI), voire même un peu supérieures pour le ^{89}Zr . Ce

résultat semble concorder avec les chiffres rapportés sur la fixation classique des AcM de type IgG aux récepteurs Fc γ associée au catabolisme hépatique physiologique des IgG^{164,165}. La responsabilité du cuivre libre dans la fixation hépatodigestive observée apparaît également selon ces données moins franche. En parallèle, les accumulations osseuses de ⁸⁹Zr-DFO-9E7.4 étaient supérieures à celles de ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 (3.1 ± 1.15 contre 1.48 ± 0.29 , respectivement, à 24 h PI ; $p = 0.0061$; test non paramétrique) alors que le contraire était observé à 24 h PI pour le ratio tumeur/sang (1.42 ± 0.24 contre 4.08 ± 1.09 ; $p = 0.0391$; test non-paramétrique). En ne tenant compte que de ces facteurs, le 9E7.4 marqué au ⁶⁴Cu semble être le meilleur traceur pour l'imagerie immuno-TEP. Cette conclusion est en accord avec la seule autre étude qui a comparé directement ces deux radionucléides dans un modèle préclinique²⁰⁵, mais aussi avec deux travaux récents décrivant le développement de deux traceurs pour l'immuno-TEP utilisant l'anticorps humain CD38 daratumumab marqués au ⁸⁹Zr²⁰⁶ et au ⁶⁴Cu²⁰⁷, respectivement, dans des modèles murins de xénogreffe. Même si différentes méthodologies étaient appliquées, le radioimmunoconjugué marqué au ⁶⁴Cu semble être le meilleur choix. Le développement d'un meilleur agent chélateur du ⁸⁹Zr, tel que décrit dans une étude récente de Heskamp et al²⁰⁸, pourrait changer ce classement à l'avenir.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons démontré que des anticorps anti-CD138 marqués au ⁶⁴Cu et au ⁸⁹Zr étaient capables de détecter les lésions de MM dans des modèles murins SC et IV avec une sensibilité élevée, surpassant celle de la TEP-FDG. Le radioimmunoconjugué marqué au ⁶⁴Cu semble être le meilleur de ces 2 traceurs, la stabilité du couple ⁸⁹Zr-chélateur compromettant les performances de l'exploration du compartiment ostéo-médullaire, primordiale dans ce modèle néoplasique. Le développement de nouveaux chélateurs du ⁸⁹Zr permettra peut-être de faire évoluer cette situation dans les années à venir^{208,209}. L'anticorps ⁶⁴Cu-anti-CD138 apparaît donc comme un nouvel agent radiopharmaceutique prometteur en immunoTEP du MM.

Toutefois, afin d'optimiser au mieux les performances de cette imagerie, il apparaît nécessaire d'essayer de diminuer les fixations physiologiques extra-

tumorales de ce traceur. Comme vu précédemment, l'expression de CD138 par les membranes des hépatocytes et le catabolisme des IgG semblent des explications plausibles à ce bruit de fond sur l'imagerie TEP. Cette optimisation et notamment l'impact d'une dose de pré-charge seront évalués dans le prochain chapitre.

Quatrième Chapitre – Optimisation de l’immuno-TEP avec l’Ac anti-mCD138 pour la détection du MM dans un modèle murin syngénique (C57BL/KaLwRij et cellules 5T33) : Etude de l’apport d’une dose de pré-charge.

Introduction

Comme nous l’avons vu lors des précédents chapitres, l’AcM 9E7.4 couplé au ^{64}Cu a montré de bonnes performances pour la détection des lésions de MM dans un modèle murin syngénique. Néanmoins, cette immunoTEP anti-mCD138 est également marquée par une fixation hépatique, splénique et digestive. Ces dernières étant retrouvées sur les images TEP après injection de 9E7.4 marqué au ^{89}Zr , le relargage de cuivre libre ne peut être tenu comme seul responsable de cette fixation. De même, également partiellement visible sur les images réalisées après injection de l’isotype-contrôle, l’expression du CD138 par les microvillosités des membranes basales des hépatocytes n’apparaît pas non plus comme la seule explication plausible. La troisième hypothèse considérant la fixation des AcM de type IgG aux récepteurs $\text{Fc}\gamma$ hépatiques et intestinaux associée au catabolisme physiologique des IgG semble donc jouer un rôle prépondérant dans cette fixation. Comme rapporté plus haut, dans la littérature, cette élimination est décrite comme « accaparant » jusqu’à 20% des IgG totales injectées ^{164,165}, chiffres similaires à ceux décrits dans notre travail. Dans un objectif d’optimisation de l’imagerie TEP, nous avons exploré dans ce chapitre l’impact d’une dose de pré-charge sur l’imagerie TEP avec l’AcM 9E7.4 couplé au ^{64}Cu . En effet, il est généralement admis que l’injection d’AcM non marqués potentialise la fixation tumorale en saturant les sites de liaison non cibles. La validité de cette hypothèse a donc été testée dans notre modèle.

Matériels et Méthodes

Lignées, cultures cellulaires et modèle animal:

La même lignée cellulaire de myélome multiple murin 5T33-luc(+), la même espèce de souris femelles C57BL/KaLwRij et le même modèle SC que précédemment décrits ont été utilisés.

Traceur

Seul un AcM anti-CD138 marqué au ^{64}Cu a été utilisé. Afin de minimiser un éventuel relargage de ^{64}Cu libre, et suite aux travaux de Anne-Sophie Navarro^{210,211}, le chélateur TE2A a été remplacé par le p-SCN-Bn-TE1PA, ce dernier présentant un meilleur rendement de couplage, une meilleure stabilité *in vivo* et aboutissant à une meilleure immunoréactivité.

La technique de radiomarquage, similaire à celle du TE2A, a déjà été décrite précédemment. L'activité spécifique après purification du bioconjugué était de 108.4 MBq/mg et son immunoréactivité était de $84.2 \pm 1.3 \%$.

Déroulement de l'étude *in vivo*

Le protocole initialement programmé est représenté dans la Figure 27.

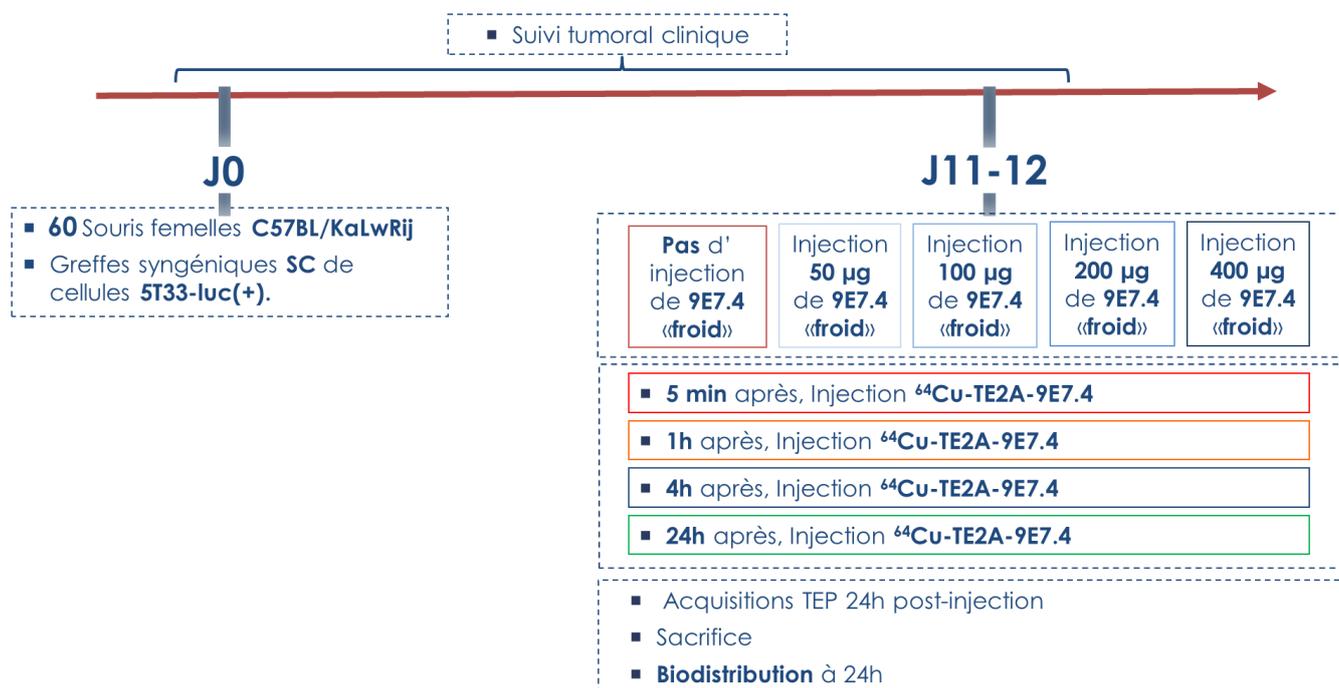


Figure 27: Protocole expérimental initial de l'évaluation de la biodistribution de l'AcM anti-mCD138 couplé au ^{64}Cu avec pré-charge d'AcM « froids »

Pré-charge et injection des traceurs

Pour étudier l'effet d'une modification de la dose d'anticorps « froids » injectée, 50 µg, 100 µg, 200 µg ou 400 µg de 9E7.4 devaient être injectés en pré-charge. Pour évaluer l'effet de la variation du temps entre l'injection de 9E7.4 « froid » et l'administration de ^{64}Cu -TE1PA-9E7.4, la dose de pré-charge devait être injectée 5 min, 1h, 4h, ou 24 h avant-injection (AI) de ^{64}Cu -TE1PA-9E7.4. Trois souris par groupe de dose et délai, étaient prévues pour cette expérimentation.

En raison de la malencontreuse conjugaison de problèmes techniques, une modification du nombre de groupe s'est avérée nécessaire. En se basant sur les données de la littérature et notamment les travaux de Houghton et al ²¹², seuls les doses de 50 µg ou 100 µg et les délais de 4h et 24h ont été conservés. Le protocole expérimental est représenté dans la Figure 28.

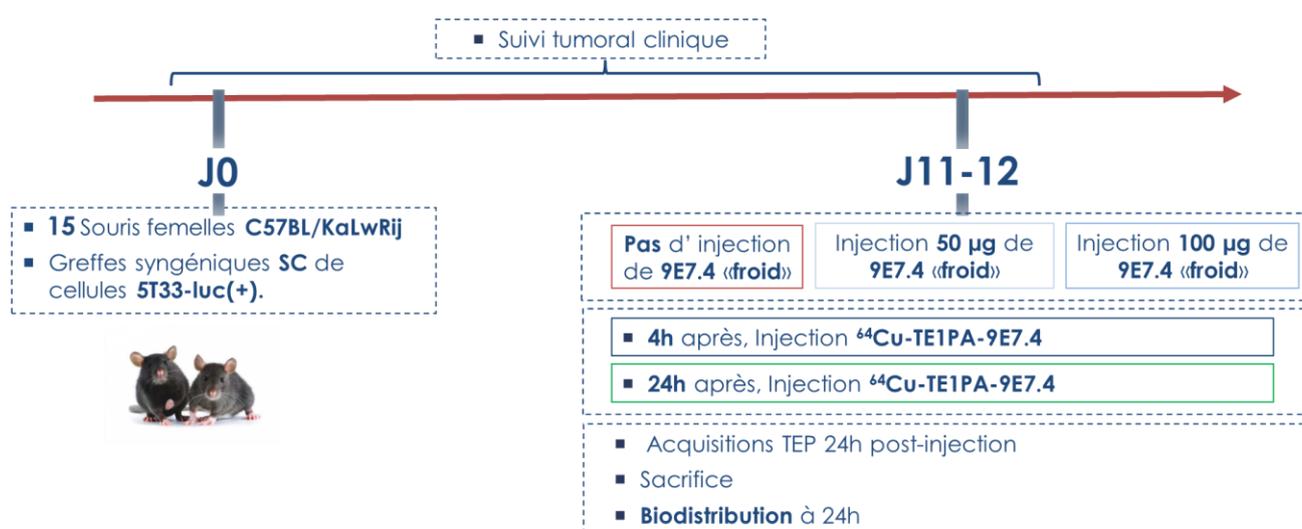


Figure 28: Protocole expérimental initial de l'évaluation de la biodistribution de l'AcM anti-mCD138 couplé au ^{64}Cu avec pré-charge d'AcM « froids »

Imagerie

Les protocoles d'imagerie sont les mêmes que décrits précédemment.

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism version 7.00. La significativité des différences de fixation a été évaluée à l'aide d'un test non paramétrique de Mann-Whitney. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été jugée significative.

Résultats

Expériences de biodistribution *ex vivo*

Les résultats de la biodistribution *ex vivo* sont représentés dans les Figure 29 et Figure 30.

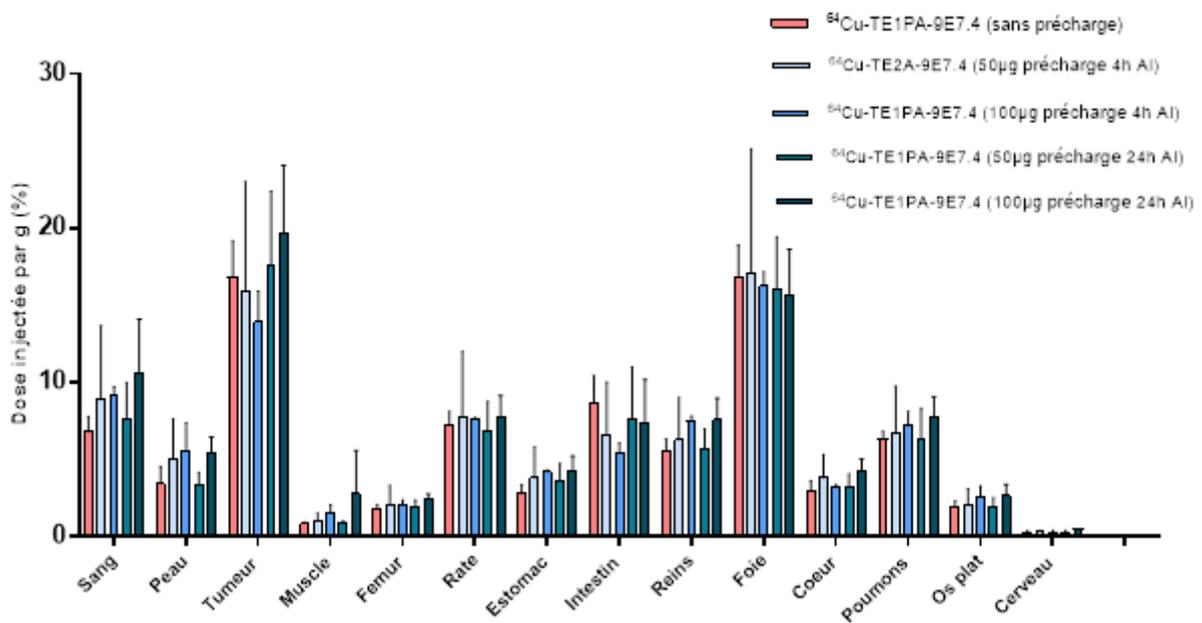


Figure 29: Résultats de la biodistribution de l'AcM ^{64}Cu -TE1PA-9E7.4 avec pré-charge chez des souris porteuses de tumeurs SC

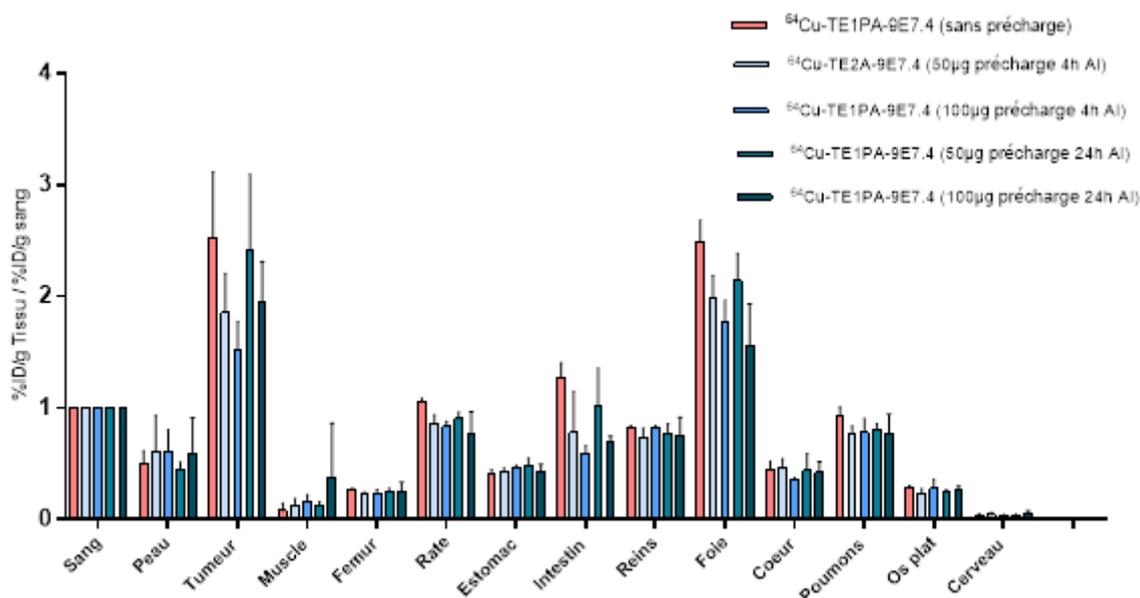


Figure 30: Résultats des ratios tissus/sang de l'AcM $^{64}\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ avec pré-charge chez des souris porteuses de tumeurs SC

Les données de biodistribution (Figure 29) ont permis de comparer les différentes combinaisons de doses et délais de pré-charge par rapport à l'absence de pré-charge d'anticorps froids. Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe contrôle sans pré-charge et les autres groupes, quels que soient le délai ou la dose. Les souris ayant bénéficié d'une dose de pré-charge semblaient présenter une discrète majoration du signal sanguin associée à une diminution des ratios tumeur/sang et foie/sang notamment pour les groupes 100µg, mais sans valeur significative.

Imagerie TEP

Les images TEP réalisées 24 h après injection de l'AcM $^{64}\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ en fonction des combinaisons de pré-charge sont représentées dans la Figure 31. Aucune différence significative n'a été mise en évidence.

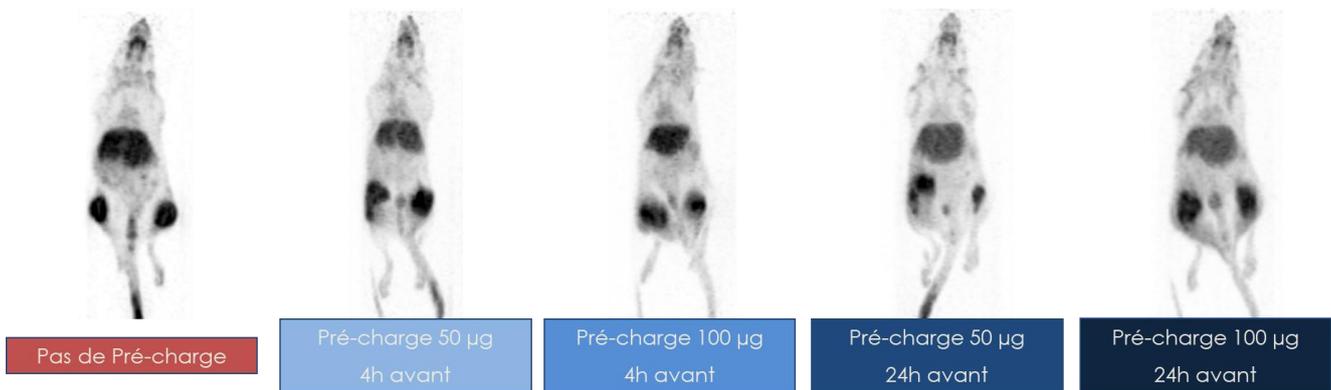


Figure 31: Images TEP réalisées 24 h après injection de l'AcM ^{64}Cu -TE1PA-9E7.4 en fonction des combinaisons de pré-charge chez des souris porteuses de tumeurs SC

Discussion

Dans notre modèle, contrairement aux résultats décrits par Houghton ²¹², l'injection d'une dose de pré-charge, quels que soient le délai ou la dose, n'a montré aucune différence significative avec l'absence de pré-charge sur les données de biodistribution ou les images TEP.

Malgré l'utilisation courante de la technique de la pré-charge d'anticorps froids, peu d'études ont finalement prouvé son bénéfice ou son explication physiologique. Cette pratique repose en réalité sur une étude de dosimétrie de phase I/II sur l'ibritumomab tiuxétan marqué à l' ^{111}In chez six patients ²¹³. Chez trois de ces patients, une pré-charge de 100 mg/m² de rituximab a été administrée, tandis que les trois autres patients ont reçu une dose de 250 mg/m². Cette seconde option avait finalement été retenue comme la meilleure car aucune différence n'avait été observée en imagerie et en dosimétrie et qu'il était possible que cette dose plus élevée de rituximab entraîne une réponse clinique accrue. Cependant, dans cette étude, aucune comparaison n'avait été faite avec la distribution sans dose de pré-charge. De plus, cette étude a évalué l'impact d'une pré-charge avec le rituximab, un anticorps chimérique, sur le ciblage d'un deuxième anticorps anti-CD20 radiomarqué, l'ibritumomab, un anticorps murin.

D'autres travaux ont, depuis, retrouvé des conclusions intéressantes. Ainsi, en se basant sur l'étude de Schiele et al ²¹⁴, Muylle et al ont comparé les distributions du rituximab marqué au ^{89}Zr avec et sans pré-charge chez des patients atteints d'une

récidive de lymphome B CD20+ ²¹⁵. Bien que cette étude ait été menée auprès d'un petit groupe de patients, il existe des différences frappantes en ce qui concerne l'influence de la pré-charge standard de rituximab froid (250 mg/m²). Chez les patients présentant une déplétion en lymphocytes B, ce qui représente la majorité des patients actuellement traités par RIT, la pré-charge de rituximab non marquée influait négativement le ciblage des lésions tumorales en entraînant une saturation partielle des récepteurs CD20 présents sur les cellules lymphomateuses. En revanche, chez les deux patients sans altération du taux de lymphocytes CD20+ circulants, la pré-charge de rituximab froid a entraîné une nette réduction de la dose d'irradiation au corps entier, une réduction significative de l'absorption de la radioactivité dans la rate, et amélioré la fixation tumorale.

L'impact positif ou négatif de la pré-charge n'a pu être établi dans notre modèle. Ceci suggère probablement que la dose de pré-charge minimale requise pour voir une saturation des antigènes cibles ou non-cibles n'a pas été atteinte et que celle-ci se situe à une dose supérieure à 100µg d'AcM froids. Toutefois, il est important d'émettre 2 mises en gardes. Premièrement, si la fixation des AcM de type IgG aux récepteurs Fcγ hépatiques apparaît dans notre modèle comme la cause principale, les AcM administrés ne représentant qu'une petite fraction des anticorps endogènes totaux, il est peu probable que cette voie soit facilement saturée¹⁶³. Deuxièmement, ces résultats restent également difficiles à interpréter du fait du changement de chélateur. En effet, comparativement aux données obtenues avec le ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4, la fixation hépatique était plus importante avec le ⁶⁴Cu-TE1PA-9E7.4 (respectivement : 9,04 ± 0,36 % DI/g à 24 h PI du ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 et 16,87 ± 2,04 % DI/g à 24 h PI du ⁶⁴Cu-TE1PA-9E7.4).

Toutefois, l'hétérogénéité inhérente à la distribution des radiopharmaceutiques dans les lésions cibles et les organes normaux suggère qu'une approche individualisée, adaptée au patient, apparaît essentielle notamment dans l'optique secondaire de la mise en place d'une thérapie. En effet, plusieurs paramètres jouent un rôle clé dans la quantité de radioconjugués nécessaire pour assurer des taux sériques optimaux, tels que la charge tumorale, le volume de la rate, la quantité d'antigènes circulants, l'hétérogénéité des tumeurs ou l'emplacement/l'accessibilité de l'atteinte tumorale¹⁵⁹. L'imagerie TEP apparaît alors comme un outil prometteur pour l'évaluation de l'influence de ces multiples facteurs sur le ciblage des tumeurs, pour

évaluer l'occupation des récepteurs par les anticorps monoclonaux et pour définir la dose thérapeutique biologiquement efficace. Ainsi, entre autres^{216,217}, Menke-van der Houven van Oordt et al. ont récemment rapporté une étude d'immunoTEP avec des anticorps monoclonaux anti-récepteur-3 du facteur de croissance épidermique humain (HER3) (GSK2849330) marqués au ⁸⁹Zr chez 6 patients atteints de tumeurs HER3 positives²¹⁸. L'effet de doses thérapeutiques de GSK2849330 sur l'absorption tumorale a été évalué comme indicateur de l'occupation des récepteurs mais a également été modélisée par une analyse pharmacocinétique compartimentale de Patlak afin de représenter la liaison et l'internalisation du GSK2849330 par les cellules tumorales. Des études d'imagerie dans de plus larges groupes de patients restent néanmoins nécessaire pour confirmer la valeur prédictive du niveau d'occupation des récepteurs déterminé par l'immunoTEP sur le résultat thérapeutique chez les patients traités¹⁵⁹.

Conclusion

Dans ce chapitre, l'impact positif ou négatif de la pré-charge n'a pu être établi dans notre modèle. Ceci montre néanmoins que la quantité de radioconjugués nécessaire pour assurer des taux sériques optimaux dépend de plusieurs paramètres et que l'imagerie TEP apparaît comme un outil prometteur pour l'évaluation de l'influence de ces multiples facteurs sur le ciblage des tumeurs. La réalisation de nouvelles expériences de pré-charge à des doses supérieures doit être discutée dans notre modèle. Toutefois, afin de s'affranchir de la fixation des AcM de type IgG aux récepteurs Fc γ hépatiques, l'utilisation, au lieu d'une immunoglobuline entière, d'un fragment F(ab')₂, limitant la dégradation secondaire de l'anticorps par le foie, sans baisser la fixation tumorale, constituerait une solution envisageable.

Conclusion de la première partie

L'imagerie TEP a transformé la médecine nucléaire diagnostique et est devenue, depuis une dizaine d'années, un outil essentiel dans la prise en charge en oncologie et notamment en hématologie. Avec le développement continu de cette modalité d'imagerie, de nouveaux traceurs TEP apparaissent nécessaires pour répondre aux problèmes posés par certaines pathologies comme le MM, dans lesquelles les méthodes d'imagerie classiques restent perfectibles. L'immuno-PET, combinant la sensibilité et la résolution d'une caméra TEP avec la spécificité d'un AcM, s'inscrit parfaitement dans cette approche.

Ce travail a démontré pour la première fois dans un modèle murin syngénique de MM, l'intérêt des AcM marqués au ^{64}Cu comparés aux AcM marqués au ^{89}Zr . La très bonne sensibilité de cet examen ainsi que l'amélioration des performances de détection par rapport à la TEP-FDG en font une piste de recherche à traduire vers la clinique à visée diagnostique mais également théranostique. En effet, son utilisation comme compagnon de planification thérapeutique, tant en association à un AcM radiomarqué, émetteur β ou α , qu'à un AcM « froid » apparaît essentielle. Dans ce contexte, toutefois, le choix de la cible CD138 est plus discutable, le CD38 semblant une cible plus pertinente. En effet, malgré des résultats pré-cliniques de RIT prometteurs^{139,145}, les données cliniques sont beaucoup moins encourageantes. En monothérapie, l'indatuximab ravtansine (BT062), anticorps anti-CD138 conjugué à un agent cytotoxique antimétabolite, le dérivé maytansinoïde, n'a permis un contrôle de la maladie que dans 50% des patients et 78 % dans le cadre d'une polychimiothérapie^{140,141,219}. A l'inverse, le daratumumab, anticorps ciblant le CD38, s'est imposé dans le traitement du MM, seul et en association avec le traitement standard, en première ligne et en rechute, chez le sujet non éligible à la greffe mais également en première ligne du patient éligible au traitement intensif²²⁰⁻²²³. Le daratumumab représente une avancée majeure dans le traitement de cette pathologie. Il est probable qu'il sera intégré dans le traitement de tous les stades de la maladie au cours des prochaines années. Le développement d'un traceur anti-CD38 basé sur cette molécule permettant la prédiction de l'efficacité du traitement et servant de base à des approches théranostiques pour les patients atteints de MM, se révèle être une magnifique opportunité pour le futur de l'immunoTEP. Une réorientation de nos travaux et de la stratégie d'équipe vers le CD38 en lieu et place

du CD138 semble donc nécessaire, d'autant plus que trois études ^{206,207,224}, utilisant le ⁶⁴Cu ou le ⁸⁹Zr ont récemment été publiées dont une présentant les premières injections et images chez l'homme. Ces travaux, au-delà de la preuve de concept, se sont néanmoins heurtés avec le CD38 aux mêmes difficultés que notre équipe, gage, s'il en est, que notre expérience avec le CD138 et ces enseignements ne peuvent qu'être bénéfiques dans cette transition.

A suivre...

Deuxième Partie : Exploration de paramètres
quantitatifs d'analyse de l'imagerie TEP caractérisant
l'hétérogénéité intra-tumorale de la distribution des
radiotraceurs à partir des données d'expérimentation
animale

Introduction :

L'analyse semi-quantitative via la SUVmax demeure aujourd'hui l'index de quantification de l'intensité de fixation du FDG le plus couramment utilisé en pratique clinique. Récemment, de nombreux travaux se sont intéressés à la mesure de l'hétérogénéité du radiotracer au sein du volume tumoral. En effet, comme vu précédemment, il est bien connu que les tumeurs présentent souvent une large hétérogénéité biologique, cellulaire et tissulaire. Or une méthode non invasive d'évaluation de l'hétérogénéité tumorale, en particulier en cette ère de la médecine personnalisée, pourrait donc permettre d'extraire des caractéristiques utiles dans le cadre de l'évaluation tumorale et de mieux sélectionner les patients de mauvais pronostic pour une thérapie plus intensive. Bien que les images de TEP-FDG souffrent d'une résolution spatiale modeste, l'analyse de la distribution du traceur dans la tumeur pourrait ainsi apporter une meilleure caractérisation de la lésion que la SUVmax ou le volume métabolique tumoral. Sur la base de cette hypothèse, plusieurs travaux ont étudié l'hétérogénéité tumorale en calculant des indices de texture sur les images TEP-FDG au diagnostic^{225,226}. Néanmoins, seul le travail d'Orlhac et al a s'est concentré, sans succès, sur l'éventuelle relation entre l'hétérogénéité texturale des images TEP-FDG et les caractéristiques histologiques de la tumeur²²⁷.

Dans ce contexte et dans le cadre de l'étude préclinique de la première partie, l'objectif de ce (bref) travail était d'étudier la relation entre les indices de texture dérivés des images TEP avec l'anti-CD138m-DFO-⁸⁹Zr, les images autoradiographiques et les images histologiques afin de déterminer si les indices mesurés sur une échelle TEP sont représentatifs des caractéristiques observées sur une échelle microscopique (images autoradiographiques) et au niveau cellulaire (images histologiques).

Matériels et méthodes :

Lignées, cultures cellulaires, modèle animal et protocole:

La même lignée cellulaire de myélome multiple murin 5T33-luc(+), la même espèce de souris femelles C57BL/KaLwRij et le même modèle SC que précédemment décrits ont été utilisés. Deux souris ont été greffées en SC et ont bénéficié d'une injection de ^{89}Zr -DFO-9E7.4 puis imagées en TEP 24h PI. Comme décrit précédemment, les tumeurs SC ont ensuite été prélevées, congelées, découpées à l'aide d'un Cryostat et déposées sur lames Superfrost, sans paraffine. Les coupes étaient sériées pour une nouvelle analyse en TEP mais également en autoradiographie.

Traitement des images TEP et d'autoradiographie:

Le traitement des images a été fait comme décrit dans la littérature^{227,228}. Brièvement, les images TEP ont été reconstruites sans post-filtrage avec deux tailles de voxel différentes (0.78 x 0.78 mm² et 0.39 x 0.39 mm²). Les images d'autoradiographie ont été analysées avec leur résolution native (0.05 x 0.05 mm²) mais également rééchantillonnées aux tailles de voxel de la TEP et lissées avec un filtre gaussien (SD = 677 μm) pour correspondre à la résolution spatiale des images TEP. Les images ont été recalées selon la méthode d'information mutuelle. Une segmentation par « k-means clustering » a été réalisée (3 classes). Pour chaque image bidimensionnelle sélectionnée et chaque modalité, l'intensité maximale dans la région tumorale d'intérêt a été calculée et un ré-échantillonnage des intensités de voxel sur 64 niveaux de gris a été réalisé. Après cette étape, plusieurs indices de texture ont été extraits à partir de la matrice de co-occurrence, la matrice de longueurs de zones homogènes et la matrice de longueurs de plages comme décrits²²⁷⁻²³⁰. Ces indices ont été sélectionnés en raison de leur robustesse précédemment démontrée²²⁷.

Statistiques

Les corrélations entre les différents paramètres d'hétérogénéité mesurés en autoradiographie et en TEP ont été étudiées à l'aide du coefficient de corrélation des rangs de Spearman.

Seules les valeurs de $p \leq 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

Un exemple des différentes images reconstruites selon différentes tailles de voxel est présenté dans la Figure 32.

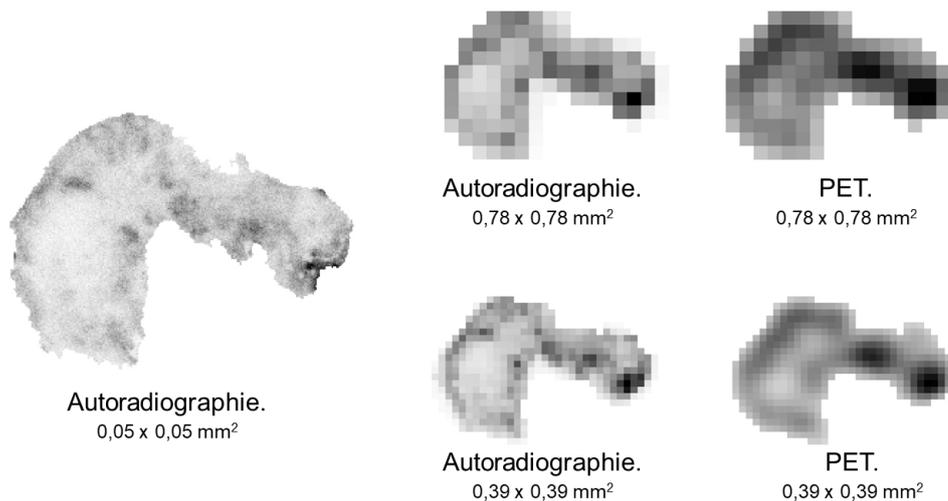


Figure 32: Exemple d'images d'autoradiographie et TEP reconstruites selon différentes tailles de voxel

Seuls 3 paramètres de texture présentaient une corrélation significative ($r > 0,7$; $p < 0,001$ avec un intervalle de confiance de 95% : $r \in [0,5; 1,0]$) entre les images TEP et les images d'autoradiographie (Entropie, Energie et ZLNU pour Zone Length Non Uniformity). Seul l'indice ZLNU calculé sur la taille originale du voxel d'autoradiographie ($0,05 \times 0,05 \text{ mm}^2$) reste corrélé avec l'indice extrait sur les images TEP. La Figure 33 met en évidence cette corrélation.

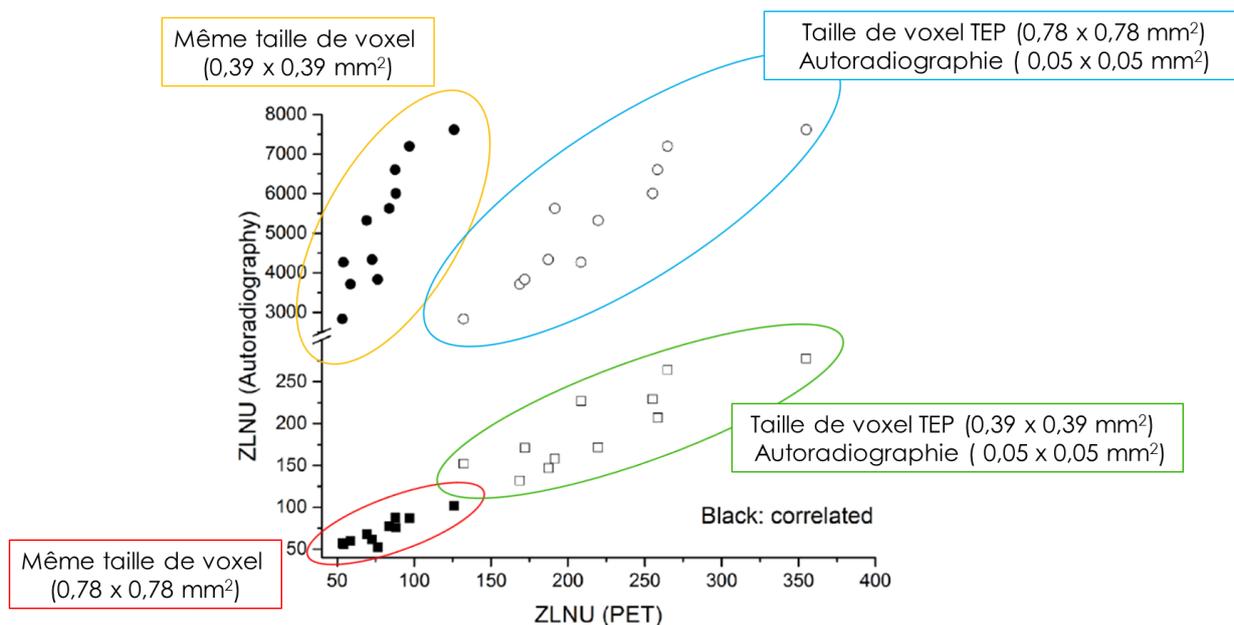


Figure 33: Corrélation de l'indice ZLNU (Zone Length Non Uniformity) entre les images TEP et en autoradiographie

Discussion

L'analyse de texture existe depuis plusieurs décennies et a été initialement développée pour l'étude des images aériennes et satellites. Son utilisation a depuis été étendue à l'analyse quantitative de l'ensemble des images médicales²³¹. Elle permet de quantifier objectivement les hétérogénéités d'une zone d'image qui ne peuvent être appréciées à l'œil nu en évaluant les variations des niveaux de gris des voxels contenus dans le volume d'intérêt et leur position dans l'image.

De nombreux travaux s'intéressant à l'exploitation plus complète de ces analyses de texture sur les données TEP semblent montrer aujourd'hui un potentiel intérêt de ces paramètres en complément des indices déjà existants et utilisés couramment, comme le volume et les SUV^{69,225,230}. De façon simple, il est reconnu que même si l'origine clonale d'un cancer est généralement unique, les tumeurs ne se développent pas uniformément et montrent une forte hétérogénéité cellulaire intra- et inter-tumorale. Cette observation s'explique notamment par les interactions des cellules cancéreuses avec leur microenvironnement, l'accumulation de mutations au cours du

développement tumoral ainsi que par les phénomènes de néoangiogénèse, hypoxie, nécrose et métabolisme glucidique, autant de facteurs conditionnant également l'agressivité de la tumeur et la résistance thérapeutique. Ainsi, les tumeurs avec une forte hétérogénéité intrinsèque ont un pronostic plus péjoratif. Étant donnée la nature microscopique de la tumeur et de son microenvironnement aux alentours d'une dizaine de μm , il paraît illusoire, compte-tenu d'une résolution spatiale de l'ordre de 3-4 mm, que l'imagerie TEP puisse évaluer précisément cette dernière. Néanmoins, même si le développement tumoral n'est pas uniforme, il peut être considéré comme tel à un niveau local. Chaque voxel contiendrait alors une information moyennée des phénomènes physiopathologiques sous-jacents. C'est sur cette hypothèse que se fonde l'analyse de texture qui permettrait alors d'accéder à un plus grand nombre d'informations de manière non-invasive et répétée sur les tissus, sans nécessiter d'acquisitions supplémentaires et sans les biais d'échantillonnages inhérents aux biopsies.

Malgré l'idée attrayante que l'image TEP puisse refléter la biologie de la tumeur sous-jacente, aucune preuve d'une relation directe entre les images TEP-FDG et les caractéristiques histologiques de la tumeur n'a encore été publiée. L'étude d'Orlhac et al est, à notre connaissance, le seul travail ayant cherché à évaluer ce lien. Ce travail a montré, comme le nôtre, une corrélation entre l'hétérogénéité dérivée des images TEP et celle calculée sur les images autoradiographiques en utilisant des indices tels que l'Entropie ou ZLNU. Dans le travail d'Orlhac et al, aucun lien n'a par contre été retrouvé entre les indices de textures et la distribution spatiale des cellules tumorales en histologie ou leur densité. Cette absence de corrélation s'explique probablement par le choix du FDG et de ses « témoins » en histologie. En effet, la fixation du FDG reflète avant tout le métabolisme glucidique plutôt que la densité cellulaire. Toutefois, examiner ce dernier en histologie paraît compliqué, car conjuguant tant l'activité des transporteurs GLUTs que celle d'enzymes telles que l'hexokinase. L'utilisation d'un immunoconjugué, plus spécifique, semble donc une bonne approche pour limiter ces difficultés et pour comparer réellement la distribution du même traceur en TEP, en autoradiographie et en histologie.

Dans notre étude, cette dernière étape n'a malheureusement pu être réalisée en raison de problèmes techniques récurrents lors de l'acquisition des images de fluorescence initialement prévues.

Conclusion

Ce travail, bien qu'incomplet, a confirmé la corrélation entre l'analyse de texture des images TEP et celles d'autoradiographie et montré la robustesse d'indices tels que ZLNU malgré les différences de résolution ou la taille des voxels. En effet, l'analyse de texture connaît actuellement un essor particulièrement important ces dernières années. Un grand nombre de paramètres issus de différentes méthodes et matrices de calcul ont été décrits et il est aujourd'hui nécessaire d'identifier parmi ces derniers ceux qui apportent une information quantitative fiable, robuste, reproductible et enfin non redondante et complémentaire des indices déjà existants et utilisés couramment, comme le volume et les SUV. Il reste toutefois un effort de standardisation à mettre en œuvre ainsi que des études permettant de donner une meilleure compréhension de la base biologique des caractéristiques de texture calculables sur les images TEP-FDG. Cette étape apparaît nécessaire avant une complète application des indices en routine clinique et une potentielle combinaison de la radiomique à la génétique ou à la clinique en vue d'une caractérisation phénotypique tumorale dans l'optique de la médecine personnalisée.

Troisième Partie : Exploration de paramètres
quantitatifs d'analyse de l'imagerie TEP caractérisant
l'hétérogénéité intra-tumorale de la distribution des
radiotraceurs à partir des données cliniques

Introduction :

Malgré d'importants progrès dans la prise en charge de cette pathologie, le pronostic du MM reste sombre avec une médiane de survie proche de 4 ans. La connaissance de facteurs pronostiques demeure nécessaire afin d'identifier au mieux les patients à haut risque de rechute et/ou de décès, et de permettre la mise en place de stratégies thérapeutiques adaptées au niveau de risque de la pathologie. Comme vu précédemment, certains travaux s'accordent sur un intérêt pronostique de la TEP-FDG^{31,33}. Au bilan initial, le nombre de LF^{36,37}, la SUVmax³⁷ et les paramètres volumiques⁴¹ semblent corrélés à une moins bonne PFS chez les patients atteints de MM. De façon similaire, plusieurs études ont montré une corrélation entre la normalisation de la TEP-FDG avant maintenance et une meilleure PFS, malgré des critères d'interprétation utilisés différents³⁵⁻³⁷. Par exemple, l'étude IMAJEM a rapporté la valeur de l'analyse visuelle de la TEP-FDG, en utilisant le bruit de fond hépatique comme seuil de positivité. Selon ces critères, les patients dont la TEP-FDG était négative avant maintenance, présentaient une PFS significativement améliorée³⁵. Dans cette population, une négativation précoce après 3 cycles de chimiothérapie par RVD était également associée à une meilleure PFS bien que cette observation ne soit pas statistiquement significative. Comme rapportée dans le lymphome^{4,232,233}, l'analyse semi-quantitative de la TEP-FDG pourrait permettre d'améliorer les performances pronostiques de cette imagerie intermédiaire. L'objectif de ce travail était donc d'évaluer la valeur pronostique de la TEP-FDG précoce effectuée après 3 RVD en utilisant la diminution de la SUVmax, dans la population de patients MM, présentant une maladie ayant une avidité pour le FDG, incluse dans l'étude prospective multicentrique française IMAJEM. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Clinical Cancer Research*²³⁴(Article en Annexe).

Matériels et méthodes :

Patients

Il s'agit d'un travail ancillaire au protocole IMAJEM du groupe IFM, qui fait partie de l'étude IFM/DFCI2009 (identifiant ClinicalTrial.gov : NCT01309334). Les objectifs, les critères d'inclusion et d'exclusion ont déjà fait l'objet d'un rapport²³⁵. Brièvement, l'essai clinique IFM/DFCI vise à évaluer une prise en charge thérapeutique par RVD (bras A) vs une association de RVD et autogreffe (bras B),

suivie d'une maintenance par du lénalidomide, en première ligne, chez des patients atteints de MM, âgés de moins de 65 ans. Un sous-groupe de 134 patients a été recruté dans l'étude prospective IMAJEM dont l'objectif principal était de comparer le taux de détection des lésions osseuses par IRM et TEP-FDG au diagnostic, après trois cycles de RVD et avant maintenance³⁵.

TEP-FDG

Pour ce travail, les images TEP-FDG réalisées lors du bilan initial et après trois cycles de RVD (TEP intermédiaire) ont été prises en compte. Chacun des 18 centres participant à cette étude a appliqué sa propre procédure d'acquisition pour l'imagerie des patients. Avant chaque TEP-FDG, les patients étaient à jeun depuis au moins quatre heures et la glycémie était contrôlée par un glucomètre au moment de l'examen pour un taux requis < 150 mg/dL. L'acquisition des images était réalisée entre 60 et 80 minutes après l'injection de ^{18}F FDG (de 3 à 7 MBq/kg) et la même procédure a été répétée pour chacun des deux examens TEP-FDG requis dans ce protocole. Les données de TEP-FDG des 18 centres ont été collectées et relues de manière centralisée. Pour la présente analyse, seuls les patients présentant des LFs considérées comme FDG-avides, définies par une fixation lésionnelle supérieure à celle du foie, ont été inclus. Chez ces patients atteints de LFs, des atteintes diffuses ostéo-médullaires (IMD) et des LEMs ont également été observées.

Pour les images de TEP-FDG initiales et précoces, le calcul de la SUVmax était effectué à partir des valeurs de SUVmax de la LF la plus fixantes sur chacun des 2 examens (de topographie parfois différente entre les 2 examens).

Le pourcentage de différence de SUVmax (ΔSUVmax) entre la TEP initiale et la TEP intermédiaire a été calculé comme précédemment décrit²³⁶. Dans l'éventualité d'une négatification complète de la TEP intermédiaire, sans lésion individualisable, la SUVmax était fixée à 1 sur cet examen. Les patients présentant une nouvelle lésion à 3 mois, suspecte de maladie progressive, étaient exclus de cette analyse.

En plus de la SUVmax, une analyse visuelle utilisant l'échelle standardisée en 5 points de Deauville (DS) sur la lésion présentant une fixation résiduelle la plus

intense était effectuée sur la TEP-FDG intermédiaire²³⁷. Les patients étaient classés en DS 1-2-3 ou DS 4-5.

A des fins de comparaison, un Δ SUVmax quel que soit le type d'atteintes tumorales (LFs, LEMs ou IMD) a également été considéré entre la TEP-FDG initiale et la TEP-FDG intermédiaire. Afin de minimiser d'éventuels faux-positifs dus à un hypermétabolisme ostéo-médullaire diffus réactionnel post-chimiothérapie, étaient exclus de cette analyse les patients dont la SUVmax sur la TEP-FDG intermédiaire portait sur une IMD, si cette dernière n'était pas présente sur la TEP initiale.

Étant donné que les valeurs de SUVmax peuvent présenter des biais significatifs et en raison de la variance potentielle due à la nature multicentrique de cette étude²³⁸, une normalisation de la SUVmax a été effectuée avec la SUVmax hépatique (ratio SUVmax FL / SUVmax hépatique), comme déjà rapporté avec succès chez des patients atteints de lymphome de Hodgkin par Annunziata et al²³⁹. Le pourcentage de différence de cette SUVmax normalisée a été décrit comme Δ rSUVmax dans notre étude et a été évalué en utilisant la même population que pour le Δ SUVmax. Une analyse similaire a également été réalisée en considérant le Δ rSUVmax entre la lésion la plus intense (qu'elle soit une LF, une LEM ou une IMD) au bilan initial et après trois cycles de RVD comme décrit précédemment.

Statistiques

La PFS était définie comme la période s'écoulant de la fin des 3 cycles de RVD à la date d'une éventuelle progression documentée de la maladie, du décès du patient, quelle qu'en soit la cause ou de la dernière date de suivi. L'association à la PFS a été examinée à l'aide d'un modèle de régression de Cox à une variable et en considérant les paramètres quantitatifs (SUVmax, Δ SUVmax ou Δ rSUVmax) comme des variables dichotomisées. Étant donné que la PFS était significativement prolongée dans le groupe autogreffé de la population IMAJEM (médiane de survie de 50 mois contre 36 mois, respectivement), un ajustement par bras de traitement a été effectué. L'âge, l'hémoglobine, le R-ISS et la réponse biochimique après trois cycles de RVD selon les critères IMWG ont également été considérés dans cette analyse univariée. Une correction de tests multiples a été effectuée en utilisant l'approche Benjamini-Hochberg. Les paramètres démontrant une association

significative avec la PFS en univarié ont ensuite été évalués à l'aide d'une analyse multivariée de Cox ne comprenant pas plus de quatre variables compte tenu du nombre d'événements observés (20 progressions) (au moins 5 événements par variable). Les critères R-ISS et la réponse biochimique ont également été inclus dans le modèle multivarié. Le seuil optimal de $\Delta\text{SUV}_{\text{max}}$ a été établi à partir de « maximally selected rank statistics » de l'ensemble R « maxstat » et utilisé pour comparer les groupes à risque élevé et à faible risque pour les paramètres quantitatifs en choisissant le seuil associé à une relation avec la survie la plus significative. Les « hazard ratio » (HR) et les valeurs de p associées ont été calculés pour chaque paramètre quantitatif dichotomisé. Les courbes de survie ont été réalisées par la méthode de Kaplan-Meier et la différence a été évaluée par un test de « log-rank ». Une valeur de $p < 0,05$ a été jugée statistiquement significative. Tous les tests ont été réalisés avec R version 3.4.1 (R Foundation, Vienne, Autriche).

Résultats

Parmi les 134 patients inclus dans l'étude IMAJEM, 71 patients présentant des lésions hypermétaboliques d'intensité supérieure au bruit de fond hépatique ont été considérés pour cette analyse (Figure 34). Les caractéristiques démographiques et cliniques de ces patients étaient semblables à celles de l'ensemble de la population IMAJEM. Trente-huit patients ont été traités dans le groupe A et 33 dans le groupe B. Notre cohorte comprenait 71 patients atteints de FL (100 %), 46 patients (65 %) d'IMD et 6 patients (8 %) de LEM au bilan initial.

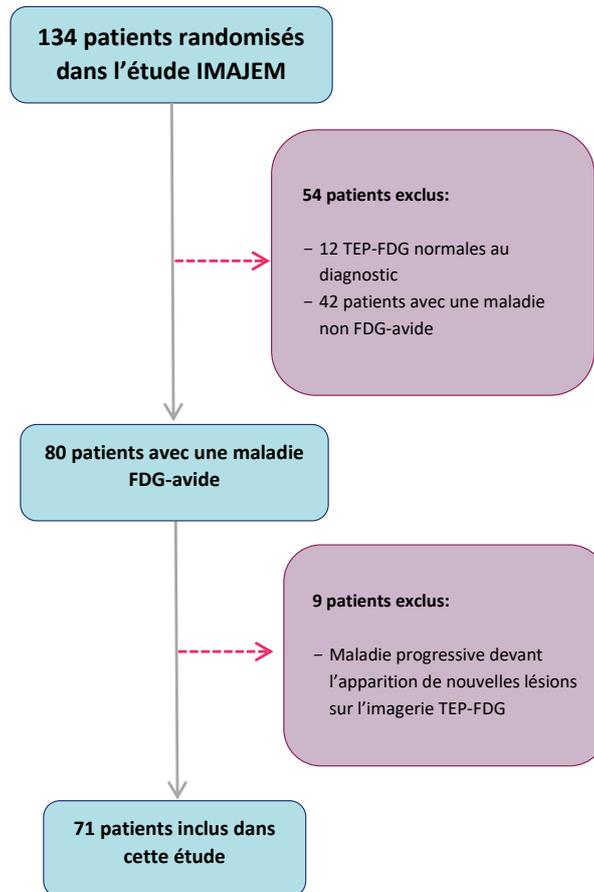


Figure 34: Diagramme de flux d'inclusion des patients

Au diagnostic, la valeur médiane de SUVmax des FLs était de 6,4 (allant de 3,5 à 27,1) avec 65 (92 %) des 71 patients présentant une valeur de SUVmax supérieure à 4,2. Sur la TEP-FDG intermédiaire, 45 patients (64 %) présentaient encore au moins une LF, 25 (35 %) une IMD et 2 (2 %) une LEM. La valeur médiane résiduelle de SUVmax était de 1,7 (allant de 1,0 à 15,0).

Les valeurs des paramètres étudiés sont résumées dans le Tableau 3. La durée médiane du suivi était de 21,5 mois. Douze progressions sont survenues dans le bras A et huit dans le bras B.

Tableau 3: Caractéristiques des patients et paramètres TEP-FDG au diagnostic et après 3 cycles de RVD

Paramètres	
<i>Au diagnostic</i>	
Age (années) (médiane, intervalle)	61 (37 – 65)
Sexe (homme) (%)	44 (62)
R-ISS I/II/III (%)	12 (17)/45 (63)/14 (20)
Hémoglobine (g/dL) (médiane, intervalle)	10.0 (8.0 – 14.0)
Présence d'une IMD (%) / LEM (%)	47 (66) / 6 (8)
Médiane de SUVmax (intervalle)	6.4 (3.5 – 27.1)
<i>Après 3 cycles de RVD</i>	
Réponse Biochimique : MS/RP/TBRP/RC (%)	0 (0)/27 (47)/27 (47)/3 (6)
FL or LEM résiduelle DS: 1-3(%) ; 4-5 (%)	42 (59) ; 29 (41)
Médiane de SUVmax des LFs résiduelles (intervalle)	1.7 (1.0 – 15.0)
Médiane de Δ SUVmax en % (intervalle)	-71 (-96 – +62.5)
de Δ SUVmax \leq -25% (%)	56 (79)
de Δ SUVmax $>$ -25% (%)	15 (21)

R-ISS: Revised International Staging System; SUVmax: maximum standardized uptake value; DS: Echelle de Deauville; LF: Lésion Focale; RVD: lenalidomide, bortezomib and dexamethasone; MS: Maladie stable; RP: Réponse partielle; TBRP: Très bonne réponse partielle; RC: réponse complète; IMD: infiltration ostéo-médullaire diffuse; LEM: Lésion extra-médullaire

Les résultats issus de l'analyse univariée sont présentés dans le Tableau 4. Seul le Δ SUVmax calculé sur les LFs les plus intenses était significativement associé à une meilleure PFS (p=0,003 après correction de tests multiples). Deux exemples sont illustrés dans la Figure 35. Il est intéressant de noter que l'analyse visuelle de la TEP intermédiaire en utilisant DS 1-3 vs 4-5, la valeur de SUVmax sur la TEP intermédiaire ou les facteurs pronostiques connus tels le score R-ISS, n'étaient pas corrélés à une meilleure PFS selon l'analyse univariée (Tableau 4).

Tableau 4: Analyse univariée des facteurs associés à la PFS après trois cycles de RVD

Paramètres	Hazard ratio	Intervalle de confiance 95%	Valeurs de p
Age (>50)	2.15	0.83 – 5.61	0.12
R-ISS II à III	2.35	0.90 – 6.13	0.08
Hémoglobine (>9.4g/dL)	2.08	0.82 – 5.28	0.12
Réponse Biochimique (\geq TBRP)	0.37	0.13 – 1.06	0.06
DS (4-5 vs 1-3)	1.95	0.78 – 4.92	0.11
Δ SUVmax (>-25%)	4.54	1.85 – 11.11	<0.009

En gras: les valeurs de p significatives après correction de tests multiples

R-ISS: Revised International Staging System; TBRP: Très bonne réponse partielle; DS: Echelle de Deauville; SUVmax: maximum standardized uptake value.

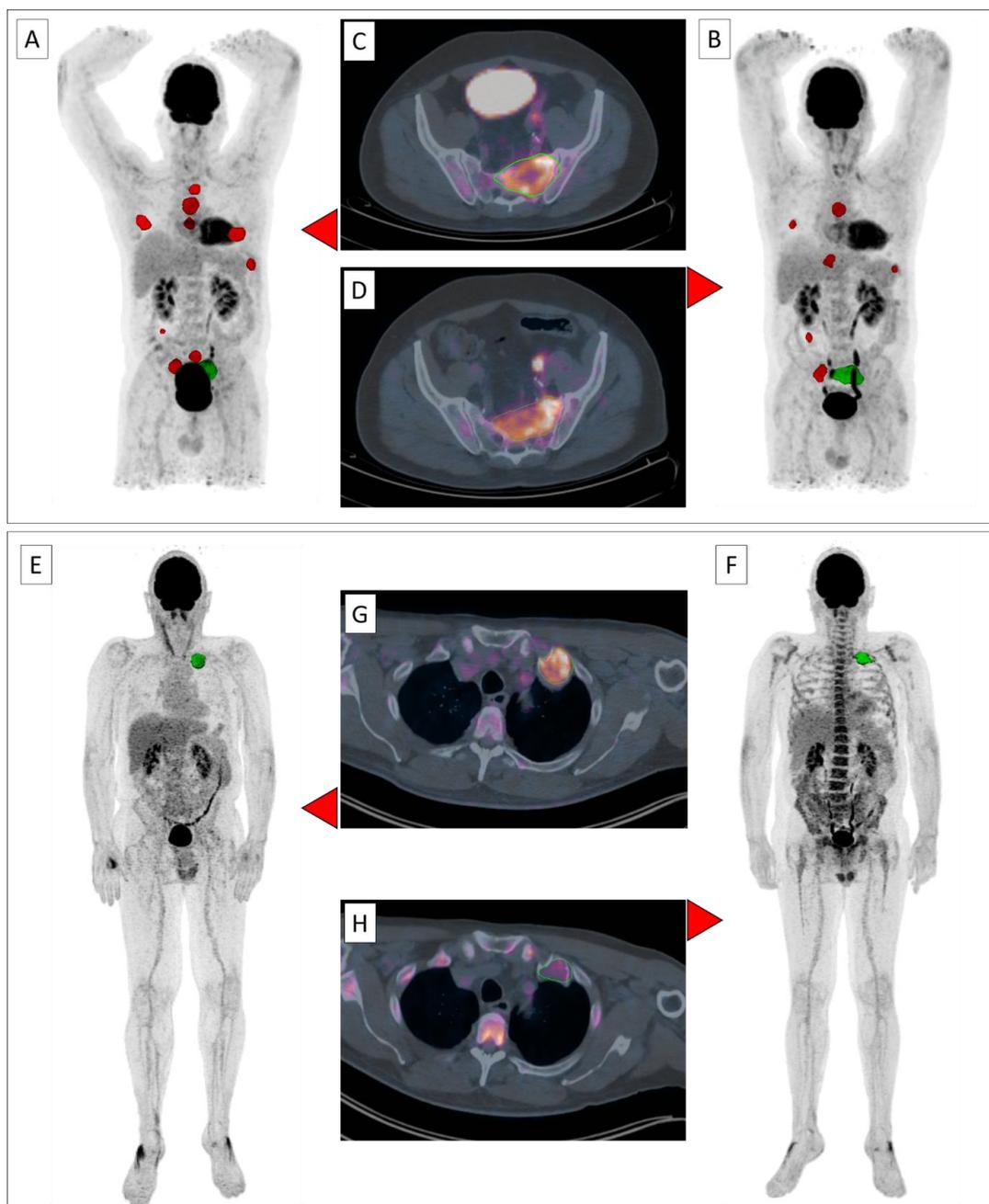


Figure 35: Deux exemples de calcul de $\Delta\text{SUV}_{\text{max}}$ chez des patients atteints de MM sur des TEP-FDG acquises au diagnostic et après trois cycles de RVD. Toutes les LF sont représentées en rouge. Les $\Delta\text{SUV}_{\text{max}}$ entre les TEP-FDG acquises au diagnostic (A,E) et après chimiothérapie (B,F) ont été calculées sur la LF la plus intense (représentée en vert). Le premier patient présentait une LF sur le sacrum (C-D) avec un $\Delta\text{SUV}_{\text{max}}$ de -17,8% et a rechuté de son MM après 4,8 mois. Le $\Delta\text{SUV}_{\text{max}}$ pour le deuxième patient présentant une LF sur la deuxième côte gauche (G-H) était de -83,9% et la rechute est survenue après 21,5 mois.

Après analyse des courbes de Kaplan-Meier pour le $\Delta\text{SUV}_{\text{max}}$, les patients du groupe à risque élevé ($(\Delta\text{SUV}_{\text{max}} > -25 \%)$) présentaient une médiane de PFS de

22.6 mois. La médiane de PFS dans les groupes de patients caractérisés par un niveau de risque faible ($\Delta\text{SUVmax} \leq -25\%$) n'était pas atteinte avec un $\text{HR} = 4.41$ ($p < 0.001$) (Figure 36). Les résultats étaient semblables après ajustement sur le bras de traitement ($p = 0.005$).

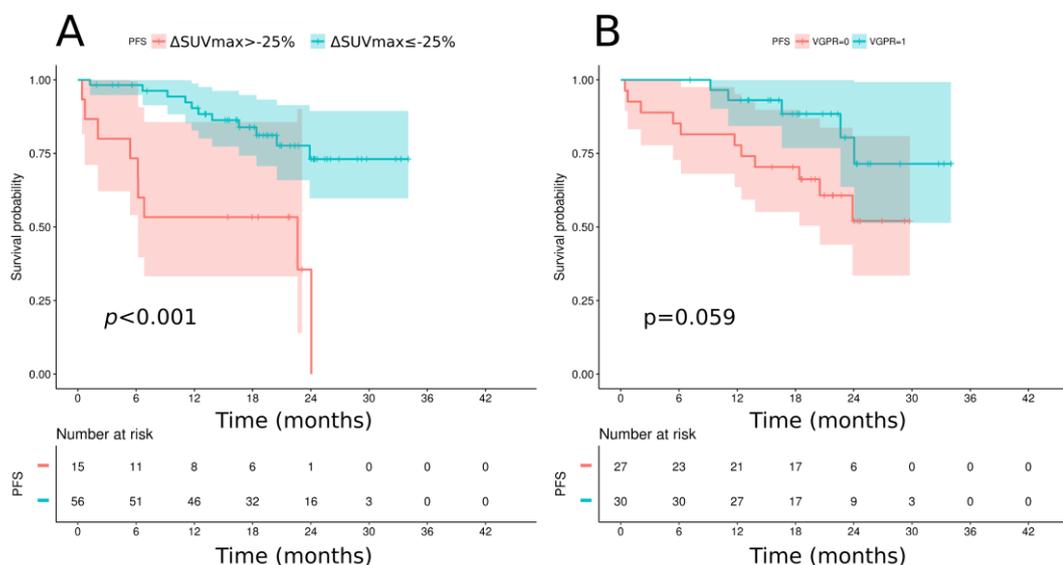


Figure 36: Courbes de Kaplan-Meier pour la PFS selon le ΔSUVmax de la LF la plus intense et la réponse biochimique après trois cycles de RVD

En analyse multivariée, le ΔSUVmax ($p = 0,001$, $\text{HR} = 5,56$; IC à 95 % : 1,96 - 15,81) et une réponse biochimique, après trois cycles de RVD, meilleure que la TBRP ($p = 0,025$, $\text{HR} = 0,29$; IC à 95 % : 0,1 - 0,85) sont apparus comme des facteurs pronostiques indépendants avec néanmoins un HR plus élevé pour le ΔSUVmax .

L'incorporation des LEMs et des infiltrations ostéo-médullaires diffuses n'a pas modifié les résultats de cette analyse (Tableau 5) excepté que seul le ΔSUVmax conservait une valeur pronostique significative après analyse multivariée ($p = 0.023$; $\text{HR} = 3.41$; 95% CI: 1.18 - 9.84).

Une évaluation similaire a été effectuée en utilisant la normalisation hépatique de la SUVmax (Tableau 5). Les courbes de survie du $\Delta\text{rSUVmax}$ présentaient une tendance similaire, avec une bonne stratification entre les groupes à risque élevé et à faible risque ($\text{HR} = 3,26$; IC à 95 % : 1,22 - 8,73 ; $p = 0,007$) et une PFS médiane de 22,6 mois vs non atteinte, respectivement. Ces résultats étaient similaires en

tenant compte de tous les types de lésions et de la normalisation par la SUVmax hépatique (Tableau 5).

Tableau 5: Analyses univariée et multivariée sur la PFS après trois cycles de RVD de différentes définitions de la variation du SUVmax

Paramètre	Analyse Univariée		Analyse Multivariée ^a		
	HR (95 % CI)	<i>P</i>	Paramètre	HR (95 % CI)	<i>P</i>
Δ SUVmax ^{LF}	4.54 (1.85 – 11.11)	<0.001	Δ SUVmax	5.56 (1.96 – 15.81)	0.001
			TBRP ou meilleure	0.29 (0.10 – 0.85)	0.025
Δ rSUVmax ^{LF}	3.33 (1.35 – 7.69)	0.008	Δ rSUVmax	3.02 (1.12 – 8.16)	0.029
			TBRP ou meilleure	0.32 (0.11 – 0.92)	0.035
Δ SUVmax ^{LF-IMD-LEM}	3.43 (1.31 – 9.03)	0.012	Δ SUVmax ^{LF-IMD-LEM}	3.41 (1.18 – 9.84)	0.023
Δ rSUVmax ^{LF-IMD-LEM}	3.65 (1.27 – 10.47)	0.016	Δ rSUVmax ^{LF-IMD-LEM}	2.87 (0.96 – 8.63)	0.060

^a Modèle multivarié incluant Δ SUVmax, R-ISS et réponse biochimique (TBRP ou meilleure) (n=57)

LF: Lésion Focale; IMD: infiltration ostéo-médullaire diffuse; LEM: Lésion extra-médullaire ; TBRP: Très bonne réponse partielle;

Δ SUVmax^{LF} : pourcentage de différence entre les SUVmax de LFs au diagnostic et sur la TEP intermédiaire

Δ rSUVmax^{LF}: pourcentage de différence entre les SUVmax de LFs au diagnostic et sur la TEP intermédiaire, normalisées sur les SUVmax hépatiques.

Δ SUVmax^{LF-IMD-LEM} : pourcentage de différence entre les SUVmax de LF, IMD ou LEM au diagnostic et sur la TEP intermédiaire, normalisées sur les SUVmax hépatiques.

Δ rSUVmax^{LF-IMD-LEM}: pourcentage de différence entre les SUVmax de LFs au diagnostic et sur la TEP intermédiaire, normalisées sur les SUVmax hépatiques.

En gras: les valeurs de *p* significatives

Discussion

Cette étude a permis de démontrer la valeur pronostique d'une diminution précoce de la SUVmax après trois cycles de traitement chez les patients atteints de MM FDG-avides. Ce travail est le premier à rapporter la pertinence de cette

variation du ΔSUVmax dans un essai clinique prospectif, chez des patients atteints de MM traités de manière homogène, en première ligne, avec un traitement comprenant des inhibiteurs du protéasome et des médicaments immunomodulateurs.

Dans la littérature, la plupart des autres études se sont concentrées sur l'intérêt et la valeur pronostique de la TEP-FDG en fin d'induction. Seul le travail d'Usmani et al a rapporté la valeur pronostique significative de la TEP-FDG après sept jours de traitement d'induction par deux cycles de VTD-PACE (bortézomib, thalidomide, dexaméthasone ; perfusions continues de cisplatine, doxorubicine, cyclophosphamide, étoposide pendant 4 jours ; protocole Total Therapy 3, $p=0,0003$)⁴⁵. Il est donc difficile de comparer nos résultats à ceux des autres études déjà publiées, et ce d'autant qu'il existe d'importantes différences en termes de thérapies et de critères d'interprétation de la TEP-FDG. Dans l'étude d'Usmani et al., la persistance de plus de 3 LF sur la TEP FDG à J7 était associée à une PFS et une survie globale inférieures. Par opposition, dans l'étude IMAJEM, le critère TEP-FDG considéré après trois cycles de RVD était la normalisation³⁵.

Dans la présente étude, nous avons émis l'hypothèse qu'une méthode semi-quantitative pourrait être plus sensible que l'analyse visuelle pour évaluer la réponse précoce à la chimiothérapie, comme cela a déjà été démontré dans le lymphome²⁴⁰⁻²⁴². En effet, la possibilité de distinguer les patients répondeurs lents des autres est primordiale car la fonte tumorale précoce est directement associée à la profondeur de la réponse²⁴³. Nous avons donc décidé de comparer les critères standardisés de DS validés dans le lymphome au SUVmax et au ΔSUVmax . Comme précédemment décrit dans l'étude sur les lymphomes B diffus à grandes cellules²⁴⁰, seuls les patients atteints de MM présentant des lésions évaluables par la TEP-FDG au bilan initial (hypermétabolisme d'intensité supérieure à celle du bruit de fond hépatique) ont été inclus dans l'analyse, considérant qu'une SUVmax trop faible était un critère d'exclusion pour le calcul du ΔSUVmax ²⁴⁴. Ce sous-groupe de patients dont la maladie montre un faible taux d'avidité pour le FDG présentent probablement une forme plus indolente de la maladie³³. Les patients présentant de nouvelles lésions après trois cycles de RVD suggérant d'emblée une progression de la maladie ont également été exclus de l'analyse du ΔSUVmax . Ainsi, au sein de la population incluse dans ce travail, une analyse semi-quantitative du ΔSUVmax s'est révélée supérieure à une analyse visuelle et à une analyse de la SUVmax intermédiaire pour

prédire la PFS. Cette forte valeur pronostique a été observée dans les deux groupes de traitement et indépendamment de la réponse biochimique évaluée selon les critères IMWG⁴. Elle a également été confirmée par l'étude du $\Delta rSUV_{max}$ normalisé permettant une réduction de la variabilité des mesures des SUVs. Bien que l'hyperplasie réactionnelle de la moelle osseuse induite par le traitement par G-CSF ou due au repeuplement de la moelle osseuse chez les patients anémiques ne soit pas rare après la chimiothérapie, le calcul du ΔSUV_{max} est resté significativement associé à la PFS lorsque la valeur maximale de SUV_{max} permettant le calcul du ΔSUV_{max} se situait sur une IMD (à la seule condition que l'IMD était également présente sur la TEP-FDG initiale).^{236,240}

Ces résultats concordent avec les résultats des études antérieures réalisées dans le lymphome. En effet, chez les patients atteints de MM FDG-avide, le calcul du ΔSUV_{max} semble représenter le processus dynamique continu de réduction de l'activité métabolique tumorale pendant le traitement avec plus de précision qu'une échelle visuelle^{31,241}. De plus, il s'est avéré que la reproductibilité entre observateurs de cette méthode était plus élevée que les critères de DS^{232,240}.

Ce travail comporte néanmoins plusieurs limites, notamment car il explore deux ensembles de paramètres, acquis à deux temps différents et qui ne reflètent donc pas forcément la même situation. Cette étude a été conçue rétrospectivement afin d'évaluer la valeur pronostique de marqueurs calculés prospectivement, qui pourraient être utiles pour guider la démarche thérapeutique par l'imagerie en association avec les facteurs de risques connus. A l'heure actuelle, les paramètres pronostiques du MM sont, comme vu précédemment, principalement identifiés au moment du diagnostic, avant le début du traitement. L'objectif de ce travail était donc d'identifier de nouveaux paramètres permettant une adaptation de la prise en charge thérapeutique en cours du traitement. Ces paramètres pronostiques acquis de manière "dynamique", tels que la réponse après induction ou des biomarqueurs d'imagerie comme le ΔSUV_{max} , pourraient en effet être utilisés à l'avenir pour modifier ou adapter le traitement en cas de réponse sous-optimale. Ce travail montre bien l'importance de la TEP-FDG dans cette évaluation dynamique de la réponse, qui pourrait, à terme, comme évoqué par l'IMWG, être complémentaire à l'évaluation de la MRD par cytométrie en flux de nouvelle génération ou séquençage de nouvelle génération.

Conclusion

Dans cette étude, chez les patients présentant un MM avide de FDG inclus dans la cohorte IMAJEM, le $\Delta\text{SUV}_{\text{max}}$ ($p < 0,001$) est apparu comme un facteur pronostique indépendant. Cette étude souligne la valeur ajoutée potentielle de l'intégration de la TEP-FDG aux facteurs pronostiques connus, tels que le R-ISS et la réponse biochimique, dans le traitement du MM. Ces résultats devront être confirmés dans d'autres cohortes de patients MM.

Quatrième Partie : Conclusions et perspectives

La médecine nucléaire est l'une des spécialités médicales les plus dynamiques. Les progrès des connaissances en biologie du cancer et l'essor des nouvelles techniques d'imagerie (nouveau système de détection, progrès en analyse d'images...) font de cette discipline un domaine en évolution constante. Ce dynamisme est un véritable atout car la médecine personnalisée n'a jamais été aussi pertinente qu'aujourd'hui. Or, l'imagerie TEP apparaît comme un outil essentiel pour l'exploration non invasive de l'hétérogénéité intratumorale et interlésionnelle par l'analyse de la distribution et de la fixation d'un traceur ou en utilisant plusieurs radiopharmaceutiques, chacun fournissant une information différente.

Au terme de ce travail, illustrant ces différentes approches, plusieurs points de conclusion et de perspectives peuvent être dégagés :

La première étude a démontré pour la première fois dans un modèle murin de MM, la très bonne sensibilité de l'immunoTEP anti-CD138 ainsi que l'amélioration de la détection par rapport à la TEP-FDG mais également les performances des AcM marqués au ^{64}Cu comparés aux AcM marqués au ^{89}Zr . Par ailleurs, ces données soulignent également l'importance de l'utilisation d'un modèle syngénique, pratique malheureusement rare dans la littérature. En effet, les radiotraceurs en développement sont souvent évalués dans le cadre de souris immunodéficientes portant des xéno greffes humaines exprimant un antigène. C'est ainsi le cas dans les études portant sur le CD38. Bien que ces dernières aient démontré que l'imagerie anti-CD38 était faisable, la pertinence de la transposition clinique reste entravée par le fait que la biodistribution et la fixation tumorale par rapport aux tissus sains n'ont pu être correctement évaluées. La distribution hépatique et l'élimination rénale du daratumumab radiomarqué semblent ainsi respectivement augmentée et diminuée chez l'homme par rapport aux données présentées chez le rongeur ^{206,207,224}. Les résultats présentés et l'expérience acquise ne pourront être que bénéfiques dans une transition vers le CD38.

De plus, ces données confirment que l'immuno-TEP est un outil prometteur pour évaluer l'occupation des récepteurs-cibles dans les tumeurs et pourrait ainsi aider à optimiser la dose d'AcM nécessaire au traitement du cancer dans le cadre d'une

thérapie ciblée ou d'une RIT. En effet, comme discuté précédemment, plusieurs études précliniques et cliniques ont rapporté l'administration probabiliste d'un excès d'AcM non marqués, tant pour confirmer la spécificité de la localisation tumorale en diminuant l'absorption tumorale, que pour, au contraire, l'augmenter en saturant les récepteurs-non cibles¹⁶⁰. Cependant, ces études n'examinent que rarement l'effet de ces excès d'AcM non marqués et n'identifient pas la dose optimale à injecter. Ces aspects apparaissent pourtant essentiels dans l'utilisation de l'immunoTEP comme compagnon de planification thérapeutique. Nous avons ainsi montré, contrairement aux travaux sur un anticorps antiCA19.9 dans un modèle de cancer pancréatique de Houghton et al²¹², l'absence de retentissement d'une pré-charge d'AcM « froids » sur des doses allant jusqu'à 100µg d'AcM froids à 4h ou 24h AI. Ces données suggèrent la faible généralisation d'un modèle à l'autre et la nécessité de ces étapes de titration. Cette approche devra être poursuivie dans l'optimisation de l'imagerie anti-CD138 et mise en place dans une éventuelle transition vers le CD38. De même, l'intérêt du développement de fragments F(ab')₂, évoqué dans le cas d'un ciblage anti-CD138, apparaît également intéressant avec le CD38. Toutefois, l'action tumoricide des anticorps anti-CD38, tels que le daratumumab, dépend de l'interaction de la région Fc de l'anticorps avec les récepteurs Fcγ exprimés sur les cellules effectrices immunitaires²⁴⁵. Les fragments F(ab')₂ anti-CD38 non radiomarqués s'intègrent ici dans le cadre d'une pré-charge, afin de diminuer la toxicité des fixations non-cibles et notamment sur les cellules NK. Ces cellules bien qu'impliquées dans les mécanismes effecteurs Fc-immunodépendants, expriment fortement le CD38 et on observe une réduction rapide de cette population dans le sang périphérique et la moelle après perfusion de daratumumab²⁴⁵.

En marge des études d'optimisation de l'immuno-TEP anti CD138, nous avons étudié le substrat microscopique de l'analyse de texture des images TEP. Nos analyses bien que préliminaires constituent un des 2 seuls travaux ayant porté sur ce sujet. Nous avons ainsi démontré que les analyses de texture des images TEP et celles d'autoradiographie étaient corrélées. Nous avons également montré la robustesse d'indices tels que ZLNU malgré les différences de résolution ou la taille des voxels. Comme discuté, dans le travail d'Orlhac et al, aucun lien n'a par contre été retrouvé entre les indices de textures et la distribution spatiale des cellules tumorales en histologie ou leur densité. Nous espérons obtenir de meilleurs résultats avec un traceur plus spécifique.

Finalement, la dernière partie de ce travail de thèse a porté sur l'étude de l'analyse semi-quantitative de la TEP-FDG afin d'améliorer les performances pronostiques de l'évaluation thérapeutique. Dans cette pathologie, l'hétérogénéité multiclonale reste l'un des principaux défis dans le développement de stratégies efficaces. Pourtant, dans cette étude menée par notre équipe, la diminution de la SUVmax entre les TEP-FDG initiale et intermédiaire, était un outil puissant pour prédire la survie à long terme chez les patients atteints de MM FDG-avide. A l'instar des travaux antérieurs sur les lymphomes ou les tumeurs solides, l'analyse de la lésion la plus fixante sur chaque examen, permet d'évaluer la portion la plus agressive de la maladie et de se libérer d'une étude de l'hétérogénéité inter-lésionnelle chez les patients avides de FDG. Ce travail constitue un des nombreux projets établis sur la base des données de l'étude multicentrique IMAJEM, financée par un programme STIC et coordonnée par le Professeur Philippe Moreau. Cette dernière a confirmé la valeur diagnostique de la TEP-FDG et sa valeur pronostique lors de l'évaluation thérapeutique³⁵. Si les résultats de ces travaux sont cohérents avec ceux publiés par d'autres équipes, l'hétérogénéité des critères d'interprétation utilisés impose une tâche de normalisation. Ainsi, dans le cadre du SIRIC ILIAD, ont été débutées des études portant sur (i) la normalisation des critères d'analyse de la TEP pour le diagnostic initial et l'évaluation thérapeutique, en collaboration avec une équipe d'experts de Bologne ; (ii) l'évaluation de l'échelle de Deauville, validée dans les lymphomes, à différents stades du traitement du MM ; (iii) l'analyse de la valeur pronostique du MTV et de l'analyse de texture sur la TEP initiale.

Bibliographie

1. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *The Lancet* 2015;385(9983):2197–2208.
2. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15(12):e538–548.
3. Ludwig H, Miguel JS, Dimopoulos MA, et al. International Myeloma Working Group recommendations for global myeloma care. *Leukemia* 2014;28(5):981–992.
4. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016;17(8):e328–346.
5. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23(12):2210–2221.
6. Caers J, Fernández de Larrea C, Leleu X, et al. The Changing Landscape of Smoldering Multiple Myeloma: A European Perspective. *Oncologist* 2016;21(3):333–342.
7. Dispenzieri A, Stewart AK, Chanan-Khan A, et al. Smoldering multiple myeloma requiring treatment: time for a new definition? *Blood* 2013;122(26):4172–4181.
8. Bustoros M, Mouhieddine TH, Detappe A, Ghobrial IM. Established and Novel Prognostic Biomarkers in Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2017;37548–560.
9. Bhutani M, Landgren O, Usmani SZ. Multiple myeloma: is it time for biomarker-driven therapy? *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2015;e493–503.
10. Landgren O, Morgan GJ. Biologic Frontiers in Multiple Myeloma: From Biomarker Identification to Clinical Practice. *Clinical Cancer Research* 2014;20(4):804–813.
11. Szudy-Szczyrek A, Szczyrek M, Soroka-Wojtaszko M, Hus M. New prognostic biomarkers in multiple myeloma. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2016;70(0):811–819.
12. Ziogas DC, Dimopoulos MA, Kastiris E. Prognostic factors for multiple myeloma in the era of novel therapies. *Expert Rev Hematol* 2018;11(11):863–879.
13. Bergsagel PL. Where we were, where we are, where we are going: progress in multiple myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2014;199–203.
14. Sanderson RD, Yang Y. Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment. *Clin Exp Metastasis* 2008;25(2):149–159.
15. Seidel C, Børset M, Hjertner O, et al. High levels of soluble syndecan-1 in myeloma-derived bone marrow: modulation of hepatocyte growth factor activity. *Blood* 2000;96(9):3139–3146.

16. Pawlyn C, Morgan GJ. Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer* 2017;17(9):543–556.
17. Shaughnessy JD, Zhan F, Burington BE, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* 2007;109(6):2276–2284.
18. Decaux O, Lodé L, Magrangeas F, et al. Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: a study of the Intergroupe Francophone du Myélome. *J Clin Oncol* 2008;26(29):4798–4805.
19. Landgren O, Rajkumar SV. New Developments in Diagnosis, Prognosis, and Assessment of Response in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research* 2016;22(22):5428–5433.
20. Walker RC, Brown TL, Jones-Jackson LB, De Blanche L, Bartel T. Imaging of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *J Nucl Med* 2012;53(7):1091–1101.
21. Zamagni E, Tacchetti P, Cavo M. Imaging in multiple myeloma: Which? When? *Blood* 2018;blood-2018-08-825356.
22. Weng W-W, Dong M-J, Zhang J, et al. A systematic review of MRI, scintigraphy, FDG-PET and PET/CT for diagnosis of multiple myeloma related bone disease--which is best? *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(22):9879–9884.
23. Moreau P, Attal M, Karlin L, et al. Prospective Evaluation of MRI and PET-CT at Diagnosis and before Maintenance Therapy in Symptomatic Patients with Multiple Myeloma Included in the IFM/DFCI 2009 Trial. *Blood* 2014;124(21):3359–3359.
24. Bannas P, Hentschel HB, Bley TA, et al. Diagnostic performance of whole-body MRI for the detection of persistent or relapsing disease in multiple myeloma after stem cell transplantation. *Eur Radiol* 2012;22(9):2007–2012.
25. Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, Lodge MA. From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET Response Criteria in Solid Tumors. *Journal of Nuclear Medicine* 2009;50(Suppl_1):122S-150S.
26. Drugs CA for, (CADTH T in H, others. Positron Emission Tomography (PET) in Oncology: A Systematic Review of Clinical Effectiveness and Indications for Use. CADTH technology overviews;1(4):.
27. Czernin J, Allen-Auerbach M, Nathanson D, Herrmann K. PET/CT in Oncology: Current Status and Perspectives. *Current Radiology Reports* 2013;1(3):177–190.
28. Baba S, Abe K, Isoda T, Maruoka Y, Sasaki M, Honda H. Impact of FDG-PET/CT in the management of lymphoma. *Annals of Nuclear Medicine* 2011;25(10):701–716.
29. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *Journal of Clinical Oncology* 2014;32(27):3059–3067.
30. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, et al. Role of Imaging in the Staging and Response Assessment of Lymphoma: Consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol* [Epub ahead of print].

31. Cavo M, Terpos E, Nanni C, et al. Role of (18)F-FDG PET/CT in the diagnosis and management of multiple myeloma and other plasma cell disorders: a consensus statement by the International Myeloma Working Group. *Lancet Oncol* 2017;18(4):e206–e217.
32. Lu Y-Y, Chen J-H, Lin W-Y, et al. FDG PET or PET/CT for detecting intramedullary and extramedullary lesions in multiple Myeloma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Nucl Med* 2012;37(9):833–837.
33. Bailly C, Leforestier R, Jamet B, et al. PET Imaging for Initial Staging and Therapy Assessment in Multiple Myeloma Patients. *Int J Mol Sci*;18(2):.
34. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat Commun*;8.
35. Moreau P, Attal M, Caillot D, et al. Prospective Evaluation of Magnetic Resonance Imaging and [(18)F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-Computed Tomography at Diagnosis and Before Maintenance Therapy in Symptomatic Patients With Multiple Myeloma Included in the IFM/DFCI 2009 Trial: Results of the IMAJEM Study. *J Clin Oncol* 2017;JCO2017722975.
36. Bartel TB, Haessler J, Brown TLY, et al. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood* 2009;114(10):2068–2076.
37. Zamagni E, Patriarca F, Nanni C, et al. Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood* 2011;118(23):5989–5995.
38. Haznedar R, Akı SZ, Akdemir OU, et al. Value of 18F-fluorodeoxyglucose uptake in positron emission tomography/computed tomography in predicting survival in multiple myeloma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38(6):1046–1053.
39. Park S, Lee SJ, Chang WJ, et al. Positive correlation between baseline PET or PET/CT findings and clinical parameters in multiple myeloma patients. *Acta Haematol* 2014;131(4):193–199.
40. Sager S, Ergül N, Ciftci H, Cetin G, Güner SI, Cermik TF. The value of FDG PET/CT in the initial staging and bone marrow involvement of patients with multiple myeloma. *Skeletal Radiol* 2011;40(7):843–847.
41. McDonald JE, Kessler MM, Gardner MW, et al. Assessment of Total Lesion Glycolysis by 18F FDG PET/CT Significantly Improves Prognostic Value of GEP and ISS in Myeloma. *Clin Cancer Res* 2017;23(8):1981–1987.
42. Carlier T, Bailly C, Leforestier R, et al. Prognostic added value of PET textural features at diagnosis in multiple myeloma. *J Nucl Med* 2017;58(supplement 1):111–111.
43. Fouquet G, Guidez S, Herbaux C, et al. Impact of initial FDG-PET/CT and serum-free light chain on transformation of conventionally defined solitary plasmacytoma to multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2014;20(12):3254–3260.
44. Zamagni E, Nanni C, Gay F, et al. 18F-FDG PET/CT focal, but not osteolytic, lesions predict the progression of smoldering myeloma to active disease. *Leukemia* 2016;30(2):417–422.

45. Usmani SZ, Mitchell A, Waheed S, et al. Prognostic implications of serial 18-fluoro-deoxyglucose emission tomography in multiple myeloma treated with total therapy 3. *Blood* 2013;121(10):1819–1823.
46. Zamagni E, Nanni C, Tacchetti P, et al. Prospective Evaluation of 18F-FDG PET/CT As Predictor of Prognosis in Newly Diagnosed Transplant Eligible Multiple Myeloma (MM) Patients: Results from the Imaging Sus-Study of the EMN02/HO95 MM Randomized Phase III Trial. *Blood* 2016;128(22):992–992.
47. Nanni C, Zamagni E, Celli M, et al. The value of 18F-FDG PET/CT after autologous stem cell transplantation (ASCT) in patients affected by multiple myeloma (MM): experience with 77 patients. *Clin Nucl Med* 2013;38(2):e74-79.
48. Derlin T, Weber C, Habermann CR, et al. 18F-FDG PET/CT for detection and localization of residual or recurrent disease in patients with multiple myeloma after stem cell transplantation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012;39(3):493–500.
49. Lapa C, Lückerrath K, Malzahn U, et al. 18 FDG-PET/CT for prognostic stratification of patients with multiple myeloma relapse after stem cell transplantation. *Oncotarget* 2014;5(17):7381–7391.
50. Jamet B, Bailly C, Carlier T, et al. Added prognostic value of FDG-PET/CT in relapsing multiple myeloma patients. *Leuk Lymphoma* 2019;60(1):222–225.
51. Boellaard R. Standards for PET image acquisition and quantitative data analysis. *J Nucl Med* 2009;50 Suppl 111S-20S.
52. Adams MC, Turkington TG, Wilson JM, Wong TZ. A Systematic Review of the Factors Affecting Accuracy of SUV Measurements. *American Journal of Roentgenology* 2010;195(2):310–320.
53. Young H, Baum R, Cremerius U, et al. Measurement of clinical and subclinical tumour response using [18F]-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: review and 1999 EORTC recommendations. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PET Study Group. *Eur J Cancer* 1999;35(13):1773–1782.
54. Erdi YE, Mawlawi O, Larson SM, et al. Segmentation of lung lesion volume by adaptive positron emission tomography image thresholding. *Cancer* 1997;80(12 Suppl):2505–2509.
55. Lowe VJ, Fletcher JW, Gobar L, et al. Prospective investigation of positron emission tomography in lung nodules. *J Clin Oncol* 1998;16(3):1075–1084.
56. Hatt M, Cheze le Rest C, Turzo A, Roux C, Visvikis D. A fuzzy locally adaptive Bayesian segmentation approach for volume determination in PET. *IEEE Trans Med Imaging* 2009;28(6):881–893.
57. Pugachev A, Ruan S, Carlin S, et al. Dependence of FDG uptake on tumor microenvironment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62(2):545–553.
58. Rasche L, Kortüm KM, Raab MS, Weinhold N. The Impact of Tumor Heterogeneity on Diagnostics and Novel Therapeutic Strategies in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci*;20(5):.
59. Bailly C, Bodet-Milin C, Bourgeois M, et al. Exploring Tumor Heterogeneity Using PET Imaging: The Big Picture. *Cancers (Basel)*;11(9):.

60. Tixier F, Le Rest CC, Hatt M, et al. Intratumor Heterogeneity Characterized by Textural Features on Baseline 18F-FDG PET Images Predicts Response to Concomitant Radiochemotherapy in Esophageal Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 2011;52(3):369–378.
61. Tan S, Kligerman S, Chen W, et al. Spatial-temporal [¹⁸F]FDG-PET features for predicting pathologic response of esophageal cancer to neoadjuvant chemoradiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013;85(5):1375–1382.
62. Hatt M, Majdoub M, Vallières M, et al. 18F-FDG PET uptake characterization through texture analysis: investigating the complementary nature of heterogeneity and functional tumor volume in a multi-cancer site patient cohort. *J Nucl Med* 2015;56(1):38–44.
63. Cheng N-M, Fang Y-HD, Lee L, et al. Zone-size nonuniformity of 18F-FDG PET regional textural features predicts survival in patients with oropharyngeal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015;42(3):419–428.
64. Oh JS, Kang BC, Roh J-L, et al. Intratumor Textural Heterogeneity on Pretreatment (18)F-FDG PET Images Predicts Response and Survival After Chemoradiotherapy for Hypopharyngeal Cancer. *Ann Surg Oncol* [Epub ahead of print].
65. Tixier F, Hatt M, Valla C, et al. Visual versus quantitative assessment of intratumor 18F-FDG PET uptake heterogeneity: prognostic value in non-small cell lung cancer. *J Nucl Med* 2014;55(8):1235–1241.
66. van Elmpt W, Zegers CM, Das M, De Ruyscher D. Imaging techniques for tumour delineation and heterogeneity quantification of lung cancer: overview of current possibilities. *Journal of thoracic disease* 2014;6(4):319.
67. Chalkidou A, O'Doherty MJ, Marsden PK. False Discovery Rates in PET and CT Studies with Texture Features: A Systematic Review. *PLoS ONE* 2015;10(5):e0124165.
68. Hatt M, Tixier F, Visvikis D, Cheze Le Rest C. Radiomics in PET/CT: More Than Meets the Eye? *J Nucl Med* 2017;58(3):365–366.
69. Hatt M, Tixier F, Pierce L, Kinahan PE, Rest CCL, Visvikis D. Characterization of PET/CT images using texture analysis: the past, the present... any future? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016;1–15.
70. Vallières M, Zwanenburg A, Badic B, Cheze Le Rest C, Visvikis D, Hatt M. Responsible Radiomics Research for Faster Clinical Translation. *J Nucl Med* 2018;59(2):189–193.
71. Rasche L, Angtuaco E, McDonald JE, et al. Low expression of hexokinase-2 is associated with false-negative FDG-positron emission tomography in multiple myeloma. *Blood* 2017;130(1):30–34.
72. Cassou-Mounat T, Balogova S, Nataf V, et al. 18F-fluorocholine versus 18F-fluorodeoxyglucose for PET/CT imaging in patients with suspected relapsing or progressive multiple myeloma: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016;43(11):1995–2004.
73. Lapa C, Knop S, Schreder M, et al. 11C-Methionine-PET in Multiple Myeloma: Correlation with Clinical Parameters and Bone Marrow Involvement. *Theranostics* 2016;6(2):254–261.

74. Okasaki M, Kubota K, Minamimoto R, et al. Comparison of (11)C-4'-thiothymidine, (11)C-methionine, and (18)F-FDG PET/CT for the detection of active lesions of multiple myeloma. *Ann Nucl Med* 2015;29(3):224–232.
75. Hovhannisyan N, Guillouet S, Fillesoye F, et al. Evaluation of the specificity of [(18)F]fludarabine PET/CT in a xenograft model of follicular lymphoma: comparison with [(18)F]FDG and impact of rituximab therapy. *EJNMMI Res* 2015;523.
76. Hovhannisyan N, Guillouet S, Fillesoye F, et al. Evaluation of the specificity of [(18)F]fludarabine PET/CT in a xenograft model of follicular lymphoma: comparison with [(18)F]FDG and impact of rituximab therapy. *EJNMMI Res* 2015;523.
77. Hovhannisyan N, Dhilly M, Guillouet S, Leporrier M, Barré L. Comparative Analysis between [(18)F]Fludarabine-PET and [(18)F]FDG-PET in a Murine Model of Inflammation. *Mol Pharm* 2016;13(6):2136–2139.
78. Hovhannisyan N, Dhilly M, Fidalgo M, et al. [18F]Fludarabine-PET in a murine model of multiple myeloma. *PLoS ONE* 2017;12(5):e0177125.
79. Sachpekidis C, Goldschmidt H, Hose D, et al. PET/CT studies of multiple myeloma using 18 F-FDG and 18 F-NaF: comparison of distribution patterns and tracers' pharmacokinetics. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014;41(7):1343–1353.
80. Sachpekidis C, Hillengass J, Goldschmidt H, et al. Treatment response evaluation with (18)F-FDG PET/CT and (18)F-NaF PET/CT in multiple myeloma patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017;44(1):50–62.
81. Lapa C, Schreder M, Schirbel A, et al. [68Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in multiple myeloma - Comparison to [18F]FDG and laboratory values. *Theranostics* 2017;7(1):205–212.
82. Bailly C, Cléry P-F, Faivre-Chauvet A, et al. Immuno-PET for Clinical Theranostic Approaches. *Int J Mol Sci*;18(1):.
83. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–674.
84. Alam IS, Arshad MA, Nguyen Q-D, Aboagye EO. Radiopharmaceuticals as probes to characterize tumour tissue. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015;42(4):537–561.
85. Mellstedt H. Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today* 2003;39 Suppl C1–16.
86. Fauvel B, Yasri A. Antibodies directed against receptor tyrosine kinases: current and future strategies to fight cancer. *MAbs* 2014;6(4):838–851.
87. Medinger M, Dreves J. Receptor tyrosine kinases and anticancer therapy. *Curr Pharm Des* 2005;11(9):1139–1149.
88. Baselga J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* 2006;312(5777):1175–1178.
89. Wright BD, Lapi SE. Designing the magic bullet? The advancement of immuno-PET into clinical use. *J Nucl Med* 2013;54(8):1171–1174.

90. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256(5517):495–497.
91. Teillaud J-L. Engineering of monoclonal antibodies and antibody-based fusion proteins: successes and challenges. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5 Suppl 1S15-27.
92. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783–792.
93. Press OW, Leonard JP, Coiffier B, Levy R, Timmerman J. Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2001;221–240.
94. Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, Koprowski H. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76(3):1438–1442.
95. Moses WW. Recent Advances and Future Advances in Time-of-Flight PET. *Nucl Instrum Methods Phys Res A* 2007;580(2):919–924.
96. Lewellen TK. Recent developments in PET detector technology. *Phys Med Biol* 2008;53(17):R287-317.
97. Boerman OC, Oyen WJG. Immuno-PET of cancer: a revival of antibody imaging. *J Nucl Med* 2011;52(8):1171–1172.
98. van Dongen GAMS, Poot AJ, Vugts DJ. PET imaging with radiolabeled antibodies and tyrosine kinase inhibitors: immuno-PET and TKI-PET. *Tumour Biol* 2012;33(3):607–615.
99. van Dongen GAMS, Visser GWM, Lub-de Hooge MN, de Vries EG, Perk LR. Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications. *Oncologist* 2007;12(12):1379–1389.
100. Kraeber-Bodere F, Bailly C, Chérel M, Chatal J-F. ImmunoPET to help stratify patients for targeted therapies and to improve drug development. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016;43(12):2166–2168.
101. Boswell CA, Brechbiel MW. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. *Nucl Med Biol* 2007;34(7):757–778.
102. Carter LM, Poty S, Sharma SK, Lewis JS. Preclinical optimization of antibody-based radiopharmaceuticals for cancer imaging and radionuclide therapy-Model, vector, and radionuclide selection. *J Labelled Comp Radiopharm* 2018;61(9):611–635.
103. Freise AC, Wu AM. In vivo imaging with antibodies and engineered fragments. *Mol Immunol* 2015;67(2 Pt A):142–152.
104. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* 2013;82:775–797.
105. Ying T, Gong R, Ju TW, Prabakaran P, Dimitrov DS. Engineered Fc based antibody domains and fragments as novel scaffolds. *Biochim Biophys Acta* 2014;1844(11):1977–1982.

106. Sandström M, Lindskog K, Velikyan I, et al. Biodistribution and Radiation Dosimetry of the Anti-HER2 Affibody Molecule ⁶⁸Ga-ABY-025 in Breast Cancer Patients. *J Nucl Med* 2016;57(6):867–871.
107. Keyaerts M, Xavier C, Heemskerk J, et al. Phase I Study of ⁶⁸Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Carcinoma. *J Nucl Med* 2016;57(1):27–33.
108. Fraker PJ, Speck JC. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. 1978. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;425(3):510–518.
109. McBride WJ, Sharkey RM, Karacay H, et al. A novel method of ¹⁸F radiolabeling for PET. *J Nucl Med* 2009;50(6):991–998.
110. Shively JE. ¹⁸F Labeling for Immuno-PET: Where Speed and Contrast Meet. *J Nucl Med* 2007;48(2):170–172.
111. Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev* 2014;43(1):260–290.
112. Brechbiel MW. Bifunctional chelates for metal nuclides. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008;52(2):166–173.
113. Abou DS, Ku T, Smith-Jones PM. In vivo biodistribution and accumulation of ⁸⁹Zr in mice. *Nucl Med Biol* 2011;38(5):675–681.
114. Zhou Y, Baidoo KE, Brechbiel MW. Mapping biological behaviors by application of longer-lived positron emitting radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65(8):1098–1111.
115. Sharkey RM, McBride WJ, Karacay H, et al. A universal pretargeting system for cancer detection and therapy using bispecific antibody. *Cancer Res* 2003;63(2):354–363.
116. Goldenberg DM, Sharkey RM, Paganelli G, Barbet J, Chatal J-F. Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy. *J Clin Oncol* 2006;24(5):823–834.
117. Bodet-Milin C, Faivre-Chauvet A, Carlier T, et al. Immuno-PET using anti-CEA bispecific antibody and ⁶⁸Ga-labeled peptide in metastatic medullary thyroid carcinoma: clinical optimization of the pretargeting parameters in a First-in Human trial. *J Nucl Med* [Epub ahead of print].
118. Boerman OC, Oyen WJG. Immuno-PET of cancer: a revival of antibody imaging. *J Nucl Med* 2011;52(8):1171–1172.
119. van Dongen GAMS, Poot AJ, Vugts DJ. PET imaging with radiolabeled antibodies and tyrosine kinase inhibitors: immuno-PET and TKI-PET. *Tumour Biol* 2012;33(3):607–615.
120. Stillebroer AB, Franssen GM, Mulders PFA, et al. ImmunoPET imaging of renal cell carcinoma with (¹²⁴I)- and (⁸⁹Zr)-labeled anti-CAIX monoclonal antibody cG250 in mice. *Cancer Biother Radiopharm* 2013;28(7):510–515.

121. Divgi CR, Pandit-Taskar N, Jungbluth AA, et al. Preoperative characterisation of clear-cell renal carcinoma using iodine-124-labelled antibody chimeric G250 (124I-cG250) and PET in patients with renal masses: a phase I trial. *Lancet Oncol* 2007;8(4):304–310.
122. Pandit-Taskar N, O'Donoghue JA, Durack JC, et al. A Phase I/II Study for Analytic Validation of ⁸⁹Zr-J591 ImmunoPET as a Molecular Imaging Agent for Metastatic Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* [Epub ahead of print].
123. Rousseau C, Ruellan AL, Bernardeau K, et al. Syndecan-1 antigen, a promising new target for triple-negative breast cancer immuno-PET and radioimmunotherapy. A preclinical study on MDA-MB-468 xenograft tumors. *EJNMMI Res* 2011;1(1):20.
124. Perk LR, Visser OJ, Stigter-van Walsum M, et al. Preparation and evaluation of (⁸⁹Zr-Zevalin for monitoring of (⁹⁰Y-Zevalin biodistribution with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33(11):1337–1345.
125. Baum RP, Prasad V, Müller D, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic ¹¹¹In- or ⁶⁸Ga-labeled affibody molecules. *J Nucl Med* 2010;51(6):892–897.
126. Dijkers EC, Oude Munnink TH, Kosterink JG, et al. Biodistribution of ⁸⁹Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2010;87(5):586–592.
127. Tamura K, Kurihara H, Yonemori K, et al. ⁶⁴Cu-DOTA-trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer. *J Nucl Med* 2013;54(11):1869–1875.
128. Bensch F, van der Veen EL, Lub-de Hooge MN, et al. ⁸⁹Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer. *Nat Med* 2018;24(12):1852–1858.
129. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 2016;387(10030):1837–1846.
130. Krishnamurthy A, Jimeno A. Atezolizumab: A novel PD-L1 inhibitor in cancer therapy with a focus in bladder and non-small cell lung cancers. *Drugs Today* 2017;53(4):217–237.
131. Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* 2002;2(9):683–693.
132. Pysz MA, Gambhir SS, Willmann JK. Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clin Radiol* 2010;65(7):500–516.
133. Kraeber-Bodéré F, Rousseau C, Bodet-Milin C, et al. Tumor immunotargeting using innovative radionuclides. *Int J Mol Sci* 2015;16(2):3932–3954.
134. Dhodapkar MV, Abe E, Theus A, et al. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood* 1998;91(8):2679–2688.
135. Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* 1989;1(1):27–35.

136. Witzig TE, Kimlinger T, Stenson M, Therneau T. Syndecan-1 expression on malignant cells from the blood and marrow of patients with plasma cell proliferative disorders and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998;31(1-2):167-175.
137. Yang Y, MacLeod V, Dai Y, et al. The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. *Blood* 2007;110(6):2041-2048.
138. Chérel M, Gouard S, Gaschet J, et al. 213Bi radioimmunotherapy with an anti-mCD138 monoclonal antibody in a murine model of multiple myeloma. *J Nucl Med* 2013;54(9):1597-1604.
139. Gouard S, Pallardy A, Gaschet J, et al. Comparative analysis of multiple myeloma treatment by CD138 antigen targeting with bismuth-213 and Melphalan chemotherapy. *Nucl Med Biol* 2014;41 Supple30-35.
140. Heffner LT, Jagannath S, Zimmerman TM, et al. BT062, an Antibody-Drug Conjugate Directed Against CD138, Given Weekly for 3 Weeks in Each 4 Week Cycle: Safety and Further Evidence of Clinical Activity. *Blood* 2012;120(21):4042-4042.
141. Kelly KR, Siegel DS, Chanan-Khan AA, et al. Indatuximab Ravtansine (BT062) in Combination with Low-Dose Dexamethasone and Lenalidomide or Pomalidomide: Clinical Activity in Patients with Relapsed / Refractory Multiple Myeloma. *Blood* 2016;128(22):4486-4486.
142. Rousseau C, Ferrer L, Supiot S, et al. Dosimetry results suggest feasibility of radioimmunotherapy using anti-CD138 (B-B4) antibody in multiple myeloma patients. *Tumour Biol* 2012;33(3):679-688.
143. Bailly C, Gouard S, Lacombe M, et al. Comparison of Immuno-PET of CD138 and PET imaging with 64 CuCl 2 and 18 F-FDG in a preclinical syngeneic model of multiple myeloma. *Oncotarget*;5(0):
144. Bailly C, Gouard S, Guérard F, et al. What is the Best Radionuclide for Immuno-PET of Multiple Myeloma? A Comparison Study Between 89Zr- and 64Cu-Labeled Anti-CD138 in a Preclinical Syngeneic Model. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20(10):2564.
145. Fichou N, Gouard S, Maurel C, et al. Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model. *Front Med (Lausanne)* 2015;276.
146. Radl J, Croese JW, Zurcher C, Van den Enden-Vieveen MH, de Leeuw AM. Animal model of human disease. Multiple myeloma. *Am J Pathol* 1988;132(3):593-597.
147. Onishi M, Kinoshita S, Morikawa Y, et al. Applications of retrovirus-mediated expression cloning. *Exp Hematol* 1996;24(2):324-329.
148. Paton-Hough J, Chantry AD, Lawson MA. A review of current murine models of multiple myeloma used to assess the efficacy of therapeutic agents on tumour growth and bone disease. *Bone* 2015;7757-68.
149. Qaim SM. Decay data and production yields of some non-standard positron emitters used in PET. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008;52(2):111-120.

150. Lopci E, Grassi I, Rubello D, et al. Prognostic Evaluation of Disease Outcome in Solid Tumors Investigated With ⁶⁴Cu-ATSM PET/CT. *Clin Nucl Med* 2016;41(2):e87-92.
151. Liu S, Li D, Park R, et al. PET imaging of colorectal and breast cancer by targeting EphB4 receptor with ⁶⁴Cu-labeled hAb47 and hAb131 antibodies. *J Nucl Med* 2013;54(7):1094–1100.
152. Dale AV, Pandya DN, Kim JY, et al. Non-cross-bridged tetraazamacrocyclic chelator for stable (⁶⁴Cu)-based radiopharmaceuticals. *ACS Med Chem Lett* 2013;4(10):927–931.
153. Roosenburg S, Laverman P, Joosten L, et al. PET and SPECT imaging of a radiolabeled minigastrin analogue conjugated with DOTA, NOTA, and NODAGA and labeled with (⁶⁴Cu), (⁶⁸Ga), and (¹¹¹In). *Mol Pharm* 2014;11(11):3930–3937.
154. Halime Z, Frindel M, Camus N, et al. New synthesis of phenyl-isothiocyanate C-functionalised cyclams. Bioconjugation and (⁶⁴Cu) phenotypic PET imaging studies of multiple myeloma with the te2a derivative. *Org Biomol Chem* 2015;13(46):11302–11314.
155. Rousseau C, Ruellan AL, Bernardeau K, et al. Syndecan-1 antigen, a promising new target for triple-negative breast cancer immuno-PET and radioimmunotherapy. A preclinical study on MDA-MB-468 xenograft tumors. *EJNMMI Res* 2011;1(1):20.
156. Taniguchi H, Toyoshima T, Fukao K, Nakauchi H. Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Nat Med* 1996;2(2):198–203.
157. Lammerts van Bueren JJ, Bleeker WK, Bøgh HO, et al. Effect of target dynamics on pharmacokinetics of a novel therapeutic antibody against the epidermal growth factor receptor: implications for the mechanisms of action. *Cancer Res* 2006;66(15):7630–7638.
158. Sachs JR, Mayawala K, Gadamsetty S, Kang SP, Alwis DP de. Optimal Dosing for Targeted Therapies in Oncology: Drug Development Cases Leading by Example. *Clin Cancer Res* 2016;22(6):1318–1324.
159. Reilly RM. Immuno-PET to Optimize the Dose of Monoclonal Antibodies for Cancer Therapy: How Much Is Enough? *J Nucl Med* 2019;60(7):899–901.
160. Reilly RM. The Radiopharmaceutical Science of Monoclonal Antibodies and Peptides for Imaging and Targeted In Situ Radiotherapy of Malignancies. In: *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia*. American Cancer Society; p1–60.
161. Waldmann TA, Strober W. Metabolism of immunoglobulins. *Prog Allergy* 1969;131–110.
162. Tabrizi M, Bornstein GG, Suria H. Biodistribution Mechanisms of Therapeutic Monoclonal Antibodies in Health and Disease. *AAPS J* 2010;12(1):33–43.
163. Vivier D, Sharma SK, Adumeau P, Rodriguez C, Fung K, Zeglis BM. The Impact of FcγRI Binding on Immuno-PET. *J Nucl Med* 2019;60(8):1174–1182.
164. Shah DK, Betts AM. Antibody biodistribution coefficients. *mAbs* 2013;5(2):297–305.
165. Keizer RJ, Huitema ADR, Schellens JHM, Beijnen JH. Clinical Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Clin Pharmacokinet* 2010;49(8):493–507.

166. Vanderkerken K, De Raeve H, Goes E, et al. Organ involvement and phenotypic adhesion profile of 5T2 and 5T33 myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse. *Br J Cancer* 1997;76(4):451–460.
167. Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63(3):136–151.
168. Heneweer C, Holland JP, Divilov V, Carlin S, Lewis JS. Magnitude of enhanced permeability and retention effect in tumors with different phenotypes: ⁸⁹Zr-albumin as a model system. *J Nucl Med* 2011;52(4):625–633.
169. Turski ML, Thiele DJ. New Roles for Copper Metabolism in Cell Proliferation, Signaling, and Disease. *J Biol Chem* 2009;284(2):717–721.
170. Margalioth EJ, Schenker JG, Chevion M. Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer* 1983;52(5):868–872.
171. Jiang L, Tu Y, Hu X, et al. Pilot Study of (⁶⁴)Cu(I) for PET Imaging of Melanoma. *Sci Rep* 2017;7(1):2574.
172. Chakravarty R, Chakraborty S, Dash A. (⁶⁴)Cu(2+) Ions as PET Probe: An Emerging Paradigm in Molecular Imaging of Cancer. *Mol Pharm* 2016;13(11):3601–3612.
173. Cai H, Wu J, Muzik O, Hsieh J-T, Lee RJ, Peng F. Reduced ⁶⁴Cu Uptake and Tumor Growth Inhibition by Knockdown of Human Copper Transporter 1 in Xenograft Mouse Model of Prostate Cancer. *J Nucl Med* 2014;55(4):622–628.
174. Vij R, Fowler KJ, Shokeen M. New Approaches to Molecular Imaging of Multiple Myeloma. *J Nucl Med* 2016;57(1):1–4.
175. Woo S-K, Lee TS, Kim KM, et al. Anesthesia condition for (¹⁸)F-FDG imaging of lung metastasis tumors using small animal PET. *Nucl Med Biol* 2008;35(1):143–150.
176. Surasi DS, Bhambhani P, Baldwin JA, Almodovar SE, O'Malley JP. ¹⁸F-FDG PET and PET/CT patient preparation: a review of the literature. *J Nucl Med Technol* 2014;42(1):5–13.
177. Klerk CPW, Overmeer RM, Niers TMH, et al. Validity of bioluminescence measurements for noninvasive in vivo imaging of tumor load in small animals. *BioTechniques* 2007;43(1 Suppl):7–13, 30.
178. Juarez JC, Betancourt O, Pirie-Shepherd SR, et al. Copper Binding by Tetrathiomolybdate Attenuates Angiogenesis and Tumor Cell Proliferation through the Inhibition of Superoxide Dismutase 1. *Clin Cancer Res* 2006;12(16):4974–4982.
179. Jørgensen JT, Persson M, Madsen J, Kjær A. High tumor uptake of (⁶⁴)Cu: implications for molecular imaging of tumor characteristics with copper-based PET tracers. *Nucl Med Biol* 2013;40(3):345–350.
180. Peng F, Lu X, Janisse J, Muzik O, Shields AF. PET of Human Prostate Cancer Xenografts in Mice with Increased Uptake of ⁶⁴CuCl₂. *J Nucl Med* 2006;47(10):1649–1652.

181. Kim KI, Jang SJ, Park JH, et al. Detection of increased ^{64}Cu uptake by human copper transporter 1 gene overexpression using PET with $^{64}\text{CuCl}_2$ in human breast cancer xenograft model. *J Nucl Med* 2014;55(10):1692–1698.
182. Chakravarty R, Chakraborty S, Vimalnath KV, et al. $^{64}\text{CuCl}_2$ produced by direct neutron activation route as a cost-effective probe for cancer imaging: the journey has begun. *RSC Adv* 2015;5(111):91723–91733.
183. Jauw YWS, Menke-van der Houven van Oordt CW, Hoekstra OS, et al. Immuno-Positron Emission Tomography with Zirconium-89-Labeled Monoclonal Antibodies in Oncology: What Can We Learn from Initial Clinical Trials? *Front Pharmacol* 2016;7:131.
184. Sharma SK. *Pet Radiopharmaceuticals for Personalized Medicine*. *Curr Drug Targets* [Epub ahead of print].
185. Follacchio GA, De Feo MS, Monteleone F, De Vincentis G, Liberatore M. Radiopharmaceuticals labelled with copper radionuclides: clinical results in human beings. *Curr Radiopharm* [Epub ahead of print].
186. Zeglis BM, Lewis JS. The Bioconjugation and Radiosynthesis of ^{89}Zr -DFO-labeled Antibodies. *J Vis Exp*; (96): [Epub ahead of print].
187. Holland JP, Divilov V, Bander NH, Smith-Jones PM, Larson SM, Lewis JS. ^{89}Zr -DFO-J591 for immunoPET of prostate-specific membrane antigen expression in vivo. *J Nucl Med* 2010;51(8):1293–1300.
188. Williams S-P. Tissue distribution studies of protein therapeutics using molecular probes: molecular imaging. *AAPS J* 2012;14(3):389–399.
189. Chen F, Goel S, Valdovinos HF, et al. In Vivo Integrity and Biological Fate of Chelator-Free Zirconium-89-Labeled Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Nano* 2015;9(8):7950–7959.
190. England CG, Ehlerding EB, Hernandez R, et al. Preclinical Pharmacokinetics and Biodistribution Studies of ^{89}Zr -Labeled Pembrolizumab. *J Nucl Med* 2017;58(1):162–168.
191. Wuthier RE. A zonal analysis of inorganic and organic constituents of the epiphysis during endochondral calcification. *Calcif Tissue Res* 1969;4(1):20–38.
192. Vivier D, Sharma SK, Zeglis BM. Understanding the In Vivo Fate of Radioimmunoconjugates for PET and SPECT. *J Labelled Comp Radiopharm* 2018;61(9):672–692.
193. Rosol TJ, Tannehill-Gregg SH, LeRoy BE, Mandl S, Contag CH. Animal Models of Bone Metastasis. *Cancer Treat Res* 2004;118:47–81.
194. Yoneda T. Arterial microvascularization and breast cancer colonization in bone. *Histol Histopathol* 1997;12(4):1145–1149.
195. Hernandez R, England CG, Yang Y, et al. ImmunoPET imaging of tissue factor expression in pancreatic cancer with ^{89}Zr -Df-ALT-836. *J Control Release* 2017;264:160–168.

196. Hernandez R, Sun H, England CG, et al. CD146-targeted immunoPET and NIRF Imaging of Hepatocellular Carcinoma with a Dual-Labeled Monoclonal Antibody. *Theranostics* 2016;6(11):1918–1933.
197. Aerts HJWL, Dubois L, Perk L, et al. Disparity between in vivo EGFR expression and 89Zr-labeled cetuximab uptake assessed with PET. *J Nucl Med* 2009;50(1):123–131.
198. Perk LR, Visser GWM, Vosjan MJWD, et al. (89)Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals (90)Y and (177)Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J Nucl Med* 2005;46(11):1898–1906.
199. Menke-van der Houven van Oordt CW, Gootjes EC, Huisman MC, et al. 89Zr-cetuximab PET imaging in patients with advanced colorectal cancer. *Oncotarget* 2015;6(30):30384–30393.
200. Jansen MH, Veldhuijzen van Zanten SEM, van Vuurden DG, et al. Molecular Drug Imaging: 89Zr-Bevacizumab PET in Children with Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *J Nucl Med* 2017;58(5):711–716.
201. Bahce I, Huisman MC, Verwer EE, et al. Pilot study of (89)Zr-bevacizumab positron emission tomography in patients with advanced non-small cell lung cancer. *EJNMMI Res* 2014;4(1):35.
202. van Loon J, Even AJG, Aerts HJWL, et al. PET imaging of zirconium-89 labelled cetuximab: A phase I trial in patients with head and neck and lung cancer. *Radiother Oncol* 2017;122(2):267–273.
203. Ulaner GA, Hyman DM, Ross DS, et al. Detection of HER2-Positive Metastases in Patients with HER2-Negative Primary Breast Cancer Using 89Zr-Trastuzumab PET/CT. *J Nucl Med* 2016;57(10):1523–1528.
204. Ulaner GA, Hyman DM, Lyashchenko SK, Lewis JS, Carrasquillo JA. 89Zr-Trastuzumab PET/CT for Detection of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastases in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Primary Breast Cancer. *Clin Nucl Med* 2017;42(12):912–917.
205. Natarajan A, Mayer AT, Reeves RE, Nagamine CM, Gambhir SS. Development of Novel ImmunoPET Tracers to Image Human PD-1 Checkpoint Expression on Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Humanized Mouse Model. *Mol Imaging Biol* 2017;19(6):903–914.
206. Ghai A, Maji D, Cho N, et al. Preclinical development of CD38-targeted [89Zr]Zr-DFO-daratumumab for imaging multiple myeloma. *J Nucl Med* [Epub ahead of print].
207. Caserta E, Chea J, Minnix M, et al. Copper-64-labeled daratumumab as a PET/CT imaging tracer for multiple myeloma. *Blood* [Epub ahead of print].
208. Heskamp S, Raavé R, Boerman O, Rijpkema M, Goncalves V, Denat F. 89Zr-Immuno-Positron Emission Tomography in Oncology: State-of-the-Art 89Zr Radiochemistry. *Bioconjug Chem* 2017;28(9):2211–2223.
209. Vugts DJ, Klaver C, Sewing C, et al. Comparison of the octadentate bifunctional chelator DFO*-pPhe-NCS and the clinically used hexadentate bifunctional chelator DFO-pPhe-NCS for 89Zr-immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017;44(2):286–295.

210. Le Bihan T, Navarro A-S, Le Bris N, et al. Synthesis of C-functionalized TE1PA and comparison with its analogues. An example of bioconjugation on 9E7.4 mAb for multiple myeloma ⁶⁴Cu-PET imaging. *Org Biomol Chem* 2018;16(23):4261–4271.
211. Navarro A-S, Le Bihan T, Le Saëc P, et al. TE1PA as Innovating Chelator for ⁶⁴Cu Immuno-TEP Imaging: A Comparative in Vivo Study with DOTA/NOTA by Conjugation on 9E7.4 mAb in a Syngeneic Multiple Myeloma Model. *Bioconj Chem* [Epub ahead of print].
212. Houghton JL, Abdel-Atti D, Scholz WW, Lewis JS. Preloading with Unlabeled CA19.9 Targeted Human Monoclonal Antibody Leads to Improved PET Imaging with ⁸⁹Zr-5B1. *Mol Pharm* 2017;14(3):908–915.
213. Witzig TE, White CA, Wiseman GA, et al. Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1999;17(12):3793–3803.
214. Schiele J, Knox SJ, Ruehl W, Goris ML. The effect of unlabelled monoclonal antibody (mAb) on the biodistribution of ¹³¹I-anti-idiotypic mAb in murine B cell lymphoma. *Radiotherapy and Oncology* 1992;24(3):169–176.
215. Muylle K, Flamen P, Vugts DJ, et al. Tumour targeting and radiation dose of radioimmunotherapy with (⁹⁰)Y-rituximab in CD20+ B-cell lymphoma as predicted by (⁸⁹)Zr-rituximab immuno-PET: impact of preloading with unlabelled rituximab. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015;42(8):1304–1314.
216. Bensch F, Lamberts LE, Smeenk MM, et al. ⁸⁹Zr-Lumretuzumab PET Imaging before and during HER3 Antibody Lumretuzumab Treatment in Patients with Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 2017;23(20):6128–6137.
217. Lockhart AC, Liu Y, Dehdashti F, et al. Phase 1 Evaluation of [⁶⁴Cu]DOTA-Patritumab to Assess Dosimetry, Apparent Receptor Occupancy, and Safety in Subjects with Advanced Solid Tumors. *Mol Imaging Biol* 2016;18(3):446–453.
218. Oordt CWM der H van, McGeoch A, Bergstrom M, et al. Immuno-PET Imaging to Assess Target Engagement: Experience from ⁸⁹Zr-Anti-HER3 mAb (GSK2849330) in Patients with Solid Tumors. *J Nucl Med* 2019;60(7):902–909.
219. Jagannath S, Heffner LT, Ailawadhi S, et al. Indatuximab Ravtansine (BT062) Monotherapy in Patients With Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2019;19(6):372–380.
220. Mateos M-V, Dimopoulos MA, Cavo M, et al. Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med* 2018;378(6):518–528.
221. Moreau P, Attal M, Hulin C, et al. Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019;394(10192):29–38.
222. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2016;375(14):1319–1331.
223. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2016;375(8):754–766.

224. Ulaner G, Sobol N, O'Donoghue J, et al. Preclinical development and First-in-human imaging of ⁸⁹Zr-Daratumumab for CD38 targeted imaging of myeloma. *J Nucl Med* 2019;60(supplement 1):203–203.
225. Cook GJR, Siddique M, Taylor BP, Yip C, Chicklore S, Goh V. Radiomics in PET: principles and applications. *Clin Transl Imaging* 2014;2(3):269–276.
226. Lee JW, Lee SM. Radiomics in Oncological PET/CT: Clinical Applications. *Nucl Med Mol Imaging* 2018;52(3):170–189.
227. Orhac F, Thézé B, Soussan M, Boisgard R, Buvat I. Multiscale Texture Analysis: From 18F-FDG PET Images to Histologic Images. *J Nucl Med* 2016;57(11):1823–1828.
228. Carlier T, Gouard S, Bailly C, et al. Are macroscopic PET textural features representative of microscopic heterogeneity? A preliminary simple and direct comparison between PET and digital autoradiography. *J Nucl Med* 2016;57(supplement 2):1407–1407.
229. Bailly C, Bodet-Milin C, Couespel S, et al. Revisiting the Robustness of PET-Based Textural Features in the Context of Multi-Centric Trials. *PLoS ONE* 2016;11(7):e0159984.
230. Carlier T, Bailly C. State-Of-The-Art and Recent Advances in Quantification for Therapeutic Follow-Up in Oncology Using PET. *Front Med (Lausanne)* 2015;218.
231. Gillies RJ, Kinahan PE, Hricak H. Radiomics: Images Are More than Pictures, They Are Data. *Radiology* 2016;278(2):563–577.
232. Lin C, Itti E, Haioun C, et al. Early 18F-FDG PET for Prediction of Prognosis in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma: SUV-Based Assessment Versus Visual Analysis. *J Nucl Med* 2007;48(10):1626–1632.
233. Nanni C, Cottreau AS, Lopci E, et al. Report of the 6th International Workshop on PET in lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2017;58(10):2298–2303.
234. Bailly C, Carlier T, Jamet B, et al. Interim PET Analysis in First-Line Therapy of Multiple Myeloma: Prognostic Value of Δ SUVmax in the FDG-Avid Patients of the IMAJEM Study. *Clin Cancer Res* 2018;24(21):5219–5224.
235. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *New England Journal of Medicine* 2017;376(14):1311–1320.
236. Itti E, Lin C, Dupuis J, et al. Prognostic value of interim 18F-FDG PET in patients with diffuse large B-Cell lymphoma: SUV-based assessment at 4 cycles of chemotherapy. *J Nucl Med* 2009;50(4):527–533.
237. Meignan M, Gallamini A, Meignan M, Gallamini A, Haioun C. Report on the First International Workshop on Interim-PET-Scan in Lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2009;50(8):1257–1260.
238. Fahey FH, Kinahan PE, Doot RK, Kocak M, Thurston H, Poussaint TY. Variability in PET quantitation within a multicenter consortium. *Med Phys* 2010;37(7):3660–3666.

239. Annunziata S, Cuccaro A, Calcagni ML, Hohaus S, Giordano A, Rufini V. Interim FDG-PET/CT in Hodgkin lymphoma: the prognostic role of the ratio between target lesion and liver SUVmax (rPET). *Ann Nucl Med* 2016;30(8):588–592.
240. Itti E, Meignan M, Berriolo-Riedinger A, et al. An international confirmatory study of the prognostic value of early PET/CT in diffuse large B-cell lymphoma: comparison between Deauville criteria and Δ SUVmax. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013;40(9):1312–1320.
241. Meignan M, Gallamini A, Itti E, Barrington S, Haioun C, Polliack A. Report on the Third International Workshop on Interim Positron Emission Tomography in Lymphoma held in Menton, France, 26–27 September 2011 and Menton 2011 consensus. *Leukemia & Lymphoma* 2012;1–6.
242. Barrington SF, Kluge R. FDG PET for therapy monitoring in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017;44(Suppl 1):97–110.
243. Dytfeld D, Griffith KA, Friedman J, et al. Superior overall survival of patients with myeloma achieving very good partial response or better to initial treatment with bortezomib, pegylated liposomal doxorubicin, and dexamethasone, predicted after two cycles by a free light chain- and M-protein-based model: extended follow-up of a phase II trial. *Leuk Lymphoma* 2011;52(7):1271–1280.
244. Casasnovas R-O, Meignan M, Berriolo-Riedinger A, et al. SUVmax reduction improves early prognosis value of interim positron emission tomography scans in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2011;118(1):37–43.
245. van de Donk NWCJ, Usmani SZ. CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Front Immunol*;9.

Annexes



Review

PET Imaging for Initial Staging and Therapy Assessment in Multiple Myeloma Patients

Clément Bailly ^{1,2}, Rodolphe Leforestier ², Bastien Jamet ², Thomas Carlier ^{1,2}, Mickael Bourgeois ^{1,2}, François Guérard ¹, Cyrille Touzeau ², Philippe Moreau ², Michel Chérel ^{1,3}, Françoise Kraeber-Bodéré ^{1,2,3} and Caroline Bodet-Milin ^{1,2,*}

¹ Nantes-Angers Cancer Research Center (CRCNA), University of Nantes, Inserm UMR 1232, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes, France; clement.bailly@chu-nantes.fr (C.B.); thomas.carlier@chu-nantes.fr (T.C.); mickael.bourgeois@nantes.inserm.fr (M.B.); francois.guerard@univ-nantes.fr (F.G.); michel.cherel@univ-nantes.fr (M.C.); francoise.bodere@chu-nantes.fr (F.K.-B.)

² Department of Nuclear Medicine, CHU de Nantes, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France; rodolpheleforestier@hotmail.fr (R.L.); bastien.jamet@chu-nantes.fr (B.J.); cyrille.touzeau@chu-nantes.fr (C.T.); philippe.moreau@chu-nantes.fr (P.M.)

³ Department of Nuclear Medicine, ICO-René Gauducheau, Boulevard Jacques Monod, 44805 Saint-Herblain, France

* Correspondence: caroline.milin@chu-nantes.fr; Tel.: +33-240-084-136; Fax: +33-240-084-218

Academic Editor: William Chi-shing Cho

Received: 27 January 2017; Accepted: 15 February 2017; Published: 18 February 2017

Abstract: Multiple myeloma (MM) is a hematological neoplasm characterized by the clonal proliferation of malignant plasma cells in the bone marrow. MM results in diffuse or focal bone infiltration and extramedullary lesions. Over the past two decades, advances have been made with regard to the diagnosis, staging, treatment, and imaging of MM. Computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) are currently recommended as the most effective imaging modalities at diagnostic. Yet, recent data from the literature suggest that positron emission tomography combined with computed tomography (PET/CT) using ¹⁸F-deoxyglucose (FDG) is a promising technique for initial staging and therapeutic monitoring in this pathology. This paper reviews the recent advances as well as the potential place of a more specific radiopharmaceutical in MM.

Keywords: multiple myeloma; solitary plasmacytoma; PET/CT; therapeutic evaluation

1. Introduction

Multiple myeloma (MM) is a malignancy characterized by the clonal proliferation of plasma cells. It is marked by heterogeneous phenotypic, genetic and clinical presentation and it is almost always preceded by monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) [1]. Smoldering multiple myeloma (SMM) represents a mid-clinical stage between MGUS and MM. This latter constitutes a heterogeneous entity including patients displaying a very slow progression towards an identified MM within several years and patients progressing rapidly towards symptomatic myeloma (high-risk SMM).

The definition of symptomatic MM, a clinical staging requiring treatment, was traditionally based on the presence of organ damage related to plasma cell growth as defined by CRAB criteria (hypercalcemia, renal insufficiency, anemia and the presence of bone lesions). This definition was revised in 2014 by the International Myeloma Working Group (IMWG), integrating new prognostic biomarkers, with the aim of not delaying the initiation of treatment of high-risk SMM-classified patients and to avoid the establishment of harmful bone lesions or renal impairment [2]. New biomarkers have therefore been defined as associated with an 80% probability of progression towards positive MM

CRAB criteria within two years, making it possible to identify patients requiring therapy: clonal bone marrow plasma cell percentage $\geq 60\%$, involved/uninvolved serum free light chain ratio ≥ 100 , and more than 1 focal bone lesion (FL) (≥ 5 mm in size) on magnetic resonance imaging (MRI) studies.

Given that the presence of even an asymptomatic bone disease must be considered as a treatment criterion, imaging plays a significant role in the management of MM [2]. Although a standard skeletal survey was traditionally considered as the reference technique, studies carried out over the last 10 years have established the superior performances of low-dose whole-body computed tomography (CT-WB) and MRI. Positron emission tomography (PET) using ^{18}F -deoxyglucose (FDG-PET), a marker of glucose metabolism, produces performances similar to that of morphological imaging techniques in bone lesions' detection. MRI detects bone abnormalities in more than 90% of patients presenting with symptomatic MM and appears as the best procedure for evaluating painful lesions and detecting medullary compression [3]. On the other hand, in the therapeutic follow-up, the MRI performances are less satisfactory due to a high frequency of false-positive images, while FDG-PET appears to be more effective [2,3]. In addition, MRI is recommended in SMM patients: patients presenting more than 1 non-equivocal FL (diameter >5 mm) must be considered as suffering from symptomatic MM and requiring treatment [2,3]. In patients presenting equivocal anomalies in MRI, staging can be completed by a CT-WB or a FDG-PET to confirm asymptomatic bone impairment [2].

By detecting tumor cells or a tumor environment with high glucose consumption, FDG-PET provides additional information to that provided by MRI or CT [2]. In criteria revised in 2014, the detection of one or more osteolytic lesions in FDG-PET defines MM bone disease recognized by the CRAB criteria. FDG-PET can also be proposed to patients with SMM if MRI is inaccessible or non-conclusive [2]. In addition, FDG-PET allows for the detection of extra-medullary disease (EMD) and provides prognostic information for symptomatic MM at baseline and therapeutic follow-up [4–7]. FDG-PET is of equal interest for patients with solitary plasmacytoma (SP) to detect EMD [8,9] and has a prognostic value in patients with SMM [10,11].

Other radiopharmaceuticals targeting alternative MM biomarkers have also shown promising results, such as radio-labeled choline, ^{68}Ga -Pentixafor targeting C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4), and immuno-PET using radiolabeled monoclonal antibodies (mAbs) as a companion of antibody-based therapies [12–16].

2. FDG-PET for Bone Disease Detection

Despite some variations from one study to another, FDG-PET permits a whole-body investigation with an overall sensitivity of 90% and specificity of 75% for the detection of myeloma lesions [5–7]. It has the ability to show diffuse involvement, FLs, or mixed bone diseases with variable glucose uptake, resulting in heterogeneous maximum standardized uptake values (SUVmax). PET-FDG enables the detection of EMD, which occurs in less than 10% of patients at diagnosis. FDG-PET is also useful for evaluating patients with non- or slightly secreting forms of myeloma, which cannot be evaluated by biological methods.

FDG-PET sensitivity is better than a whole-body skeletal survey, showing additional lesions in half of the studied patients yet with reported false negative scans for small size lesions of the skull [17]. The French IMaGerie JEune Myélome (IMAJEM) study has compared FDG-PET and MRI performed at baseline in patients with symptomatic MM, showing comparable results with both techniques, detecting abnormalities in more than 90% of the patients [18]. FDG-PET also allows for the detection of additional medullary lesions or EMD in regions unexplored by MRI. In patients with SP, FDG-PET detects additional lesions with a greater sensitivity and specificity than MRI [8]. In addition, it has been demonstrated that the presence of at least two hypermetabolic lesions predict a rapid progression towards MM [9].

3. Prognostic Value of FDG-PET in Baseline Evaluation of Symptomatic MM and SMM

The prognostic value of FDG-PET and MRI were firstly compared in a large prospective series of 239 patients who underwent homogeneous first line treatment in a double autograft program [19]. In multivariate analysis, the only diagnostic imaging modality significantly associated with an unfavorable prognostic value, both for overall survival (OS) and event-free survival (EFS), was FDG-PET when the number of FLs was greater than three at diagnosis. The number of FLs on the baseline MRI (7 and more) affected EFS, but not OS.

The prognostic value of the number of FLs on FDG-PET at baseline was then confirmed in a large series of 192 patients with MM treated with thalidomide-dexamethasone induction therapy and double autologous stem cell transplantation (ASCT) [20]. In this study, at least 3 FLs (44% of cases), a SUVmax >4.2 (46% of cases) and the presence of EMD (6%) negatively affected four-year progression-free survival (PFS). The SUVmax >4.2 and the presence of EMD were also associated with shorter OS.

The prognostic value of FDG-PET at diagnosis has also been studied in a smaller series of 61 patients including MM (55 patients) or SP (6 patients) [21]. A correlation has been found between the most intense EMD FDG-uptake and both osteo-medullary fixation ($p = 0.027$) and the International Staging System (ISS) score ($p = 0.048$). The bone marrow SUVmax was correlated with the ISS score ($p = 0.013$). The 44 patients with positive FDG-PET had a shorter five-year survival (61%) than the 11 patients with negative FDG-PET patients, all of whom were alive after five years ($p = 0.01$). In multivariate analysis, only the EMD with the highest SUVmax had a prognostic value on OS ($p = 0.03$).

Another study comparing FDG-PET and MRI in a small series of 33 patients with MM at diagnosis concluded that FDG-PET had a prognostic value above MRI [22]. The univariate and multivariate analyses showed that FLs and diffuse bone marrow impairments on FDG-PET affected patients' PFS ($p < 0.001$), whereas OS was only affected by FLs ($p = 0.001$). The MRI data were not predictive in multivariate analysis.

Several studies also evaluated the prognostic value of baseline volume-based FDG-PET parameters. These metrics such as metabolic tumor volume (MTV) and total lesion glycolysis (TLG) appear as promising tools by quantifying functional disease burden in MM [23,24]. In a recent study performed with 192 MM patients, baseline TLG higher than 620g and MTV higher than 210 cm³ were associated with poor PFS and OS after adjusting for baseline myeloma variables. Combined with the 70-gene expression profiling (GEP70) risk score, TLG higher than 205 g identified a high-risk subgroup, and divided ISS stage II patients into two subgroups with similar outcomes to ISS stage I and ISS stage III. However, because of heterogeneous data, further prospective clinical studies are mandatory to confirm the validity of these results.

In SMM, FDG-PET also showed a prognostic value. In a series of 122 patients with SMM, Siontis et al. [10] demonstrated that the probability of progression within two years of patients with positive FDG-PET (hyper fixation with or without lytic lesion described on CT) was 75% vs. 30% in patients with negative FDG-PET, without therapy (median progression: 21 months vs. 60 months; $p < 0.001$). Among patients with positive FDG-PET, the probability of progression was 87% at two years when high uptake foci were accompanied by osteolytic lesion ($n = 16$) vs. 61% in the cases without CT lesion ($n = 9$). In a prospective study of 120 patients, Zamagni et al. [11] demonstrated a rate of progression towards MM at two years for patients with positive FDG-PET (FLs without osteolytic involvement in relation to CT) of 58% vs. 33% for patients with negative FDG-PET.

4. Therapy Assessment in Symptomatic MM

Obtaining complete metabolic remission (CMR) on FDG-PET exam in an intermediate evaluation before or after ASCT is associated with better survival rates. Bartel et al. [19] showed that the normalization of FDG fixation in FLs after initial chemotherapy courses and prior to ASCT was associated with improved EFS and OS. Confronted with genetic profiles, pre-ASCT CMR bestowed better OS in low risk patients and better EFS in high-risk patients. In 2013, the same team reported the prognostic value of early FDG-PET performed on day 7 of induction therapy, in a series of 302 patients

treated according to the same intensive protocol, 277 of whom also had gene expression profiling [25]. The multivariate analysis concluded that more than 3 FLs on FDG-PET on day 7 was associated with lower PFS and OS even in the subgroup of high-risk patients according to genetic profiles. This underlies the value of FDG-PET as a future tool for early corrective therapeutic measures.

In the Italian series of 192 patients, the persistence of a SUVmax >4.2 after induction therapy was associated with a reduced PFS [20]. Three months after ASCT, CMR was obtained in 65% of the patients, with better four-year PFS and OS than those of FDG-PET positive patients. Interestingly, 23% of the patients obtaining complete remission according to conventional criteria were considered as FDG-PET positive. Multivariate analysis showed that post-ASCT FDG-PET status was an independent prognostic factor of PFS. The same team confirmed these findings in 2015, in a series of 282 patients with symptomatic MM undergoing first-line treatment between 2002 and 2012 [26]. Median follow-up was 67 months. After treatment, CMR was obtained in 70% of patients, whereas conventionally defined complete response was observed in 53% of cases. FDG-PET negativization favorably affected PFS and OS. In 12% of patients experiencing relapse, skeletal progression was only detected by systematic FDG-PET during follow-up. Multivariate analysis showed that a SUVmax >4.2 on metabolic imaging after first-line treatment was an independent predictive factor of progression.

The interest of post-ASCT FDG-PET has also been reported in a prospective series of 77 patients evaluated by FDG-PET three months after transplant and every 6–12 months during follow-up [27]. The patients were classified into group 1 (relapse) and group 2 (no relapse). In group 1, the time to relapse was longer when FDG-PET was negative (27.6 months) than when it was positive (18 months) ($p = 0.05$) with a SUVmax inversely correlated with the time to relapse ($p < 0.01$) in PET positive patients. In group 2, 27 patients had a negative FDG-PET and 13 positive but with SUVmax remaining stable in the follow-up.

Finally, the French IMAJEM [18] study confirmed the superiority of FDG-PET as opposed to MRI in the therapeutic evaluation of patients with MM in front-line therapy. This work prospectively compared the value of MRI and FDG-PET realized at diagnosis, after three cycles of induction chemotherapy and before maintenance therapy, in a series of 134 patients treated in the Intergroupe Francophone du Myelome/Dana-Farber Cancer Institute (IFM/DFCI) 2009 clinical trial. FDG-PET normalization after three cycles of induction chemotherapy was associated with a better PFS ($p = 0.04$), as opposed to MRI. Pre-maintenance therapy FDG-PET normalization was equally correlated with improved PFS ($p < 0.001$) and OS ($p = 0.01$), unlike MRI.

Similarly to the evaluation of lymphomas [28], concerted efforts have been made to standardize response assessment for FDG-PET imaging in MM. As described in this review, different groups have reported promising and concordant results. Yet the lack of standard interpretation criteria makes it difficult to draw general guidelines. Several studies mainly relied on semi-quantitative analysis such as SUVmax, while others based their image interpretation on a visual assessment or on both methods. In this context, new interpretation criteria (Italian Myeloma criteria for PETUse; IMPeTUs) were drafted by a group of Italian nuclear medicine experts as a framework that may be useful for harmonizing clinical trials results [29]. Moreover, considering the additive value of imaging-based assessment of minimal residual disease (MRD), the IMWG has recently defined new response categories of MRD negativity [30]. These combine the absence of clonal plasma cells detectable by flow-cytometry or molecular techniques, negative FDG-PET imaging, and a normal heavy/light chain ratio, and probably better represents complete response, to available levels of detection, of malignant cells from all compartments. Further prospective studies are warranted to confirm the validity of these parameters.

5. FDG-PET to Detect Relapse

The interest of FDG-PET has also been evaluated in patients with MM suspected of relapse after ASCT [31]. It has been shown in a small series of 37 patients that the absence of FDG avid foci was a prognostic factor associated with better time to relapse and OS ($p < 0.01$). The presence of more than 10 FLs was correlated with lower time to relapse ($p < 0.01$) and OS ($p < 0.05$). The intensity of FDG

uptake and the presence of EMD were also correlated with a shorter time to relapse ($p = 0.037$ and $p = 0.049$, respectively). Moreover, the FDG-PET findings led to a change in patients' management in 30% of cases.

6. PET Using Other Radiopharmaceuticals

Certain studies have emphasized the diagnostic interest of new radiotracers in MM. In a pilot study, Cassou-Mounat et al. [13] compared ^{18}F -fluorocholine (FCH), a metabolite incorporated into various phospholipids essential in the formation of cell membranes, and FDG for the detection of MM lesions in 21 patients at time of disease relapse or progression. In the 15 patients with countable bone foci, the on-site reader detected 72 FDG foci vs. 127 FCH foci (+76%), and the masked reader 69 FDG foci vs. 121 FCH foci (+75%), both differences being significant. These data suggested that PET performed for suspected relapsing or progressive MM would reveal more lesions when using FCH rather than FDG. Similarly, Lapa et al. [14] prospectively compared the myeloma lesions' detection sensitivity of FDG and ^{11}C -methionine (MET), an amino acid required for protein synthesis, in 43 MM patients for staging or re-staging. MET-PET detected FL in 39 patients (detection rate: 90.7%), whereas 10 patients were missed on FDG-PET (detection rate: 76.7%, $p < 0.05$). MET depicted more FLs in 28 patients ($p < 0.001$). Both FDG and MET uptake correlated significantly with biopsy-proven bone marrow involvement ($p < 0.001$), with MET demonstrating a stronger correlation (SUVmean, $r = 0.9$ vs. $r = 0.6$; SUVmax, $r = 0.88$ vs. $r = 0.58$). Abnormal β -2-microglobulin and free light chain levels correlated with the presence of focal intramedullary lesions detected in MET- or FDG-PET (MET, $p = 0.006$ and $p = 0.01$, respectively; FDG, $p = 0.02$ and $p = 0.01$).

On the other hand, despite a potential theoretical value, discouraging results have been observed regarding the performance of ^{18}F -NaF in the assessment of MM. This radiotracer reflects bone remodeling and appears as an interesting imaging method for malignant bone diseases. Yet, as reported in both diagnostic and treatment evaluation [32,33], ^{18}F -NaF does not seem to add significant information to FDG-PET in MM patients.

Theranostic radiopharmaceuticals could also be of interest in MM. CXCR4 is often expressed in high concentration by the monoclonal plasma cells, and a recent study performed in 14 relapsing MM suggested potential of ^{68}Ga -Pentixafor, a specific ligand showing a high affinity for CXCR4, offering an excellent contrast in CXCR4-positive patients [16]. CXCR4 can also be targeted by the β -particle-emitters ^{177}Lu - or ^{90}Y -pentixather for therapeutic purposes, ^{68}Ga -Pentixafor allowing for a selection of patients to these therapies in a theranostic approach [34]. Radiolabeled mAbs with radionuclides such as ^{64}Cu or ^{89}Zr are also considered to select patients before antibody-based therapies [35], and preclinical studies reported feasibility of immuno-PET with ^{64}Cu in MM mice models [36].

7. Conclusions

FDG-PET constitutes a high performance imaging in symptomatic MM patients to detect medullary and extra-medullary disease at baseline, to assess therapy with prognostic value and to detect relapse after treatment. Yet, FDG-PET interpretation criteria and methods should be standardized for extensive use in clinical practice for symptomatic MM patient management [29]. In SMM, FDG-PET allows for the detection of patients with a high risk of progression towards MM. Pilot studies also reported the interest of innovative radiopharmaceuticals targeting other biomarkers in MM, with potential interest in theranostic approaches.

Acknowledgments: This work has been supported in part by grants from the French National Agency for Research, called "Investissements d'Avenir" IRON Labex no. ANR-11-LABX-0018-01.

Author Contributions: All authors have directly participated in the review process or in the writing of this paper, and have read and approved the final version submitted.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Röllig, C.; Knop, S.; Bornhäuser, M. Multiple myeloma. *Lancet* **2015**, *385*, 2197–2208. [[CrossRef](#)]
- Rajkumar, S.V.; Dimopoulos, M.A.; Palumbo, A.; Blade, J.; Merlini, G.; Mateos, M.-V.; Kumar, S.; Hillengass, J.; Kastritis, E.; Richardson, P.; et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, e538–e548. [[CrossRef](#)]
- Dimopoulos, M.A.; Hillengass, J.; Usmani, S.; Zamagni, E.; Lentzsch, S.; Davies, F.E.; Raje, N.; Sezer, O.; Zweegman, S.; Shah, J.; et al. Role of magnetic resonance imaging in the management of patients with multiple myeloma: A consensus statement. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 657–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dimopoulos, M.; Kyle, R.; Fermand, J.-P.; Rajkumar, S.V.; San Miguel, J.; Chanan-Khan, A.; Ludwig, H.; Joshua, D.; Mehta, J.; Gertz, M.; et al. International Myeloma Workshop Consensus Panel 3 Consensus recommendations for standard investigative workup: Report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood* **2011**, *117*, 4701–4705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Weng, W.-W.; Dong, M.-J.; Zhang, J.; Yang, J.; Xu, Q.; Zhu, Y.-J.; Liu, N.-H. A systematic review of MRI, scintigraphy, FDG-PET and PET/CT for diagnosis of multiple myeloma related bone disease—Which is best? *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 9879–9884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lu, Y.-Y.; Chen, J.-H.; Lin, W.-Y.; Liang, J.-A.; Wang, H.-Y.; Tsai, S.-C.; Kao, C.-H. FDG PET or PET/CT for detecting intramedullary and extramedullary lesions in multiple Myeloma: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Nucl. Med.* **2012**, *37*, 833–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Walker, R.C.; Brown, T.L.; Jones-Jackson, L.B.; de Blanche, L.; Bartel, T. Imaging of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53*, 1091–1101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Salaun, P.-Y.; Gastinne, T.; Frampas, E.; Bodet-Milin, C.; Moreau, P.; Bodéré-Kraeber, F. FDG-positron-emission tomography for staging and therapeutic assessment in patients with plasmacytoma. *Haematologica* **2008**, *93*, 1269–1271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fouquet, G.; Guidez, S.; Herbaux, C.; van de Wyngaert, Z.; Bonnet, S.; Beauvais, D.; Demarquette, H.; Adib, S.; Hivert, B.; Wemeau, M.; et al. Impact of initial FDG-PET/CT and serum-free light chain on transformation of conventionally defined solitary plasmacytoma to multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 3254–3260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Siontis, B.; Kumar, S.; Dispenzieri, A.; Drake, M.T.; Lacy, M.Q.; Buadi, F.; Dingli, D.; Kapoor, P.; Gonsalves, W.; Gertz, M.A.; et al. Positron emission tomography-computed tomography in the diagnostic evaluation of smoldering multiple myeloma: Identification of patients needing therapy. *Blood Cancer J.* **2015**, *5*, e364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zamagni, E.; Nanni, C.; Gay, F.; Pezzi, A.; Patriarca, F.; Bellè, M.; Rambaldi, I.; Tacchetti, P.; Hillengass, J.; Gamberi, B.; et al. ¹⁸F-FDG PET/CT focal, but not osteolytic, lesions predict the progression of smoldering myeloma to active disease. *Leukemia* **2016**, *30*, 417–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nanni, C.; Zamagni, E.; Cavo, M.; Rubello, D.; Tacchetti, P.; Pettinato, C.; Farsad, M.; Castellucci, P.; Ambrosini, V.; Montini, G.C.; et al. ¹¹C-choline vs. ¹⁸F-FDG PET/CT in assessing bone involvement in patients with multiple myeloma. *World J. Surg. Oncol.* **2007**, *5*, 68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cassou-Mounat, T.; Balogova, S.; Nataf, V.; Calzada, M.; Huchet, V.; Kerrou, K.; Devaux, J.-Y.; Mohty, M.; Talbot, J.-N.; Garderet, L. ¹⁸F-fluorocholine versus ¹⁸F-fluorodeoxyglucose for PET/CT imaging in patients with suspected relapsing or progressive multiple myeloma: A pilot study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43*, 1995–2004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lapa, C.; Knop, S.; Schreder, M.; Rudelius, M.; Knott, M.; Jörg, G.; Samnick, S.; Herrmann, K.; Buck, A.K.; Einsele, H.; et al. ¹¹C-Methionine-PET in Multiple Myeloma: Correlation with Clinical Parameters and Bone Marrow Involvement. *Theranostics* **2016**, *6*, 254–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Okasaki, M.; Kubota, K.; Minamimoto, R.; Miyata, Y.; Morooka, M.; Ito, K.; Ishiwata, K.; Toyohara, J.; Inoue, T.; Hirai, R.; et al. Comparison of ¹¹C-4'-thiothymidine, ¹¹C-methionine, and ¹⁸F-FDG PET/CT for the detection of active lesions of multiple myeloma. *Ann. Nucl. Med.* **2015**, *29*, 224–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wester, H.J.; Keller, U.; Schottelius, M.; Beer, A.; Philipp-Abbrederis, K.; Hoffmann, F.; Šimeček, J.; Gerngross, C.; Lassmann, M.; Herrmann, K.; et al. Disclosing the CXCR4 expression in lymphoproliferative diseases by targeted molecular imaging. *Theranostics* **2015**, *5*, 618–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Zamagni, E.; Nanni, C.; Patriarca, F.; Englaro, E.; Castellucci, P.; Geatti, O.; Tosi, P.; Tacchetti, P.; Cangini, D.; Perrone, G.; et al. A prospective comparison of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography, magnetic resonance imaging and whole-body planar radiographs in the assessment of bone disease in newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica* **2007**, *92*, 50–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Moreau, P.; Attal, M.; Karlin, L.; Garderet, L.; Facon, T.; Benboubker, L.; Macro, M.; Caillot, D.; Escoffre-Barbe, M.; Stoppa, A.-M.; et al. Prospective Evaluation of MRI and PET-CT at Diagnosis and before Maintenance Therapy in Symptomatic Patients with Multiple Myeloma Included in the IFM/DFCI 2009 Trial. *Blood* **2014**, *124*, 3359.
19. Bartel, T.B.; Haessler, J.; Brown, T.L.Y.; Shaughnessy, J.D.; van Rhee, F.; Anaissie, E.; Alpe, T.; Angtuaco, E.; Walker, R.; Epstein, J.; et al. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood* **2009**, *114*, 2068–2076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Zamagni, E.; Patriarca, F.; Nanni, C.; Zannetti, B.; Englaro, E.; Pezzi, A.; Tacchetti, P.; Buttignol, S.; Perrone, G.; Brioli, A.; et al. Prognostic relevance of ¹⁸F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood* **2011**, *118*, 5989–5995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Haznedar, R.; Aki, S.Z.; Akdemir, O.U.; Ozkurt, Z.N.; Celeni, O.; Yağcı, M.; Sucak, G.T.; Unlü, M. Value of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose uptake in positron emission tomography/computed tomography in predicting survival in multiple myeloma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38*, 1046–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Fonti, R.; Pace, L.; Cerchione, C.; Catalano, L.; Salvatore, B.; de Luca, S.; Pane, F.; Salvatore, M.; del Vecchio, S. ¹⁸F-FDG PET/CT, ^{99m}Tc-MIBI, and MRI in the prediction of outcome of patients with multiple myeloma: A comparative study. *Clin. Nucl. Med.* **2015**, *40*, 303–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Fonti, R.; Larobina, M.; del Vecchio, S.; de Luca, S.; Fabbri, R.; Catalano, L.; Pane, F.; Salvatore, M.; Pace, L. Metabolic tumor volume assessed by ¹⁸F-FDG PET/CT for the prediction of outcome in patients with multiple myeloma. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53*, 1829–1835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. McDonald, J.E.; Kessler, M.M.; Gardner, M.W.; Buros, A.F.; Ntambi, J.A.; Waheed, S.; van Rhee, F.; Zangari, M.; Heuck, C.; Petty, N.; et al. Assessment of Total Lesion Glycolysis by ¹⁸F FDG PET/CT Significantly Improves Prognostic Value of GEP and ISS in Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Usmani, S.Z.; Mitchell, A.; Waheed, S.; Crowley, J.; Hoering, A.; Petty, N.; Brown, T.; Bartel, T.; Anaissie, E.; van Rhee, F.; et al. Prognostic implications of serial 18-fluoro-deoxyglucose emission tomography in multiple myeloma treated with total therapy 3. *Blood* **2013**, *121*, 1819–1823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zamagni, E.; Nanni, C.; Mancuso, K.; Tacchetti, P.; Pezzi, A.; Pantani, L.; Zannetti, B.; Rambaldi, I.; Brioli, A.; Rocchi, S.; et al. PET/CT Improves the Definition of Complete Response and Allows to Detect Otherwise Unidentifiable Skeletal Progression in Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 4384–4390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Nanni, C.; Zamagni, E.; Celli, M.; Caroli, P.; Ambrosini, V.; Tacchetti, P.; Brioli, A.; Zannetti, B.; Pezzi, A.; Pantani, L.; et al. The value of ¹⁸F-FDG PET/CT after autologous stem cell transplantation (ASCT) in patients affected by multiple myeloma (MM): Experience with 77 patients. *Clin. Nucl. Med.* **2013**, *38*, e74–e79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Cheson, B.D.; Fisher, R.I.; Barrington, S.F.; Cavalli, F.; Schwartz, L.H.; Zucca, E.; Lister, T.A. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 3059–3067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Nanni, C.; Zamagni, E.; Versari, A.; Chauvie, S.; Bianchi, A.; Rensi, M.; Bellè, M.; Rambaldi, I.; Gallamini, A.; Patriarca, F.; et al. Image interpretation criteria for FDG PET/CT in multiple myeloma: A new proposal from an Italian expert panel. IMPeTUs (Italian Myeloma criteria for PET Use). *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43*, 414–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kumar, S.; Paiva, B.; Anderson, K.C.; Durie, B.; Landgren, O.; Moreau, P.; Munshi, N.; Lonial, S.; Bladé, J.; Mateos, M.-V.; et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, e328–e346. [[CrossRef](#)]
31. Lapa, C.; Lücknerath, K.; Malzahn, U.; Samnick, S.; Einsele, H.; Buck, A.K.; Herrmann, K.; Knop, S. ¹⁸FDG-PET/CT for prognostic stratification of patients with multiple myeloma relapse after stem cell transplantation. *Oncotarget* **2014**, *5*, 7381–7391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Sachpekidis, C.; Goldschmidt, H.; Hose, D.; Pan, L.; Cheng, C.; Kopka, K.; Haberkorn, U.; Dimitrakopoulou-Strauss, A. PET/CT studies of multiple myeloma using ^{18}F -FDG and ^{18}F -NaF: Comparison of distribution patterns and tracers' pharmacokinetics. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *41*, 1343–1353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sachpekidis, C.; Hillengass, J.; Goldschmidt, H.; Wagner, B.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Dimitrakopoulou-Strauss, A. Treatment response evaluation with ^{18}F -FDG PET/CT and ^{18}F -NaF PET/CT in multiple myeloma patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, *44*, 50–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Herrmann, K.; Schottelius, M.; Lapa, C.; Osl, T.; Poschenrieder, A.; Hänscheid, H.; Lückerrath, K.; Schreder, M.; Bluemel, C.; Knott, M.; et al. First-in-Human Experience of CXCR4-Directed Endoradiotherapy with ^{177}Lu - and ^{90}Y -Labeled Pentixather in Advanced-Stage Multiple Myeloma with Extensive Intra- and Extramedullary Disease. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 248–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kraeber-Bodere, F.; Bailly, C.; Chérel, M.; Chatal, J.-F. ImmunoPET to help stratify patients for targeted therapies and to improve drug development. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43*, 2166–2168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Halime, Z.; Frindel, M.; Camus, N.; Orain, P.-Y.; Lacombe, M.; Chérel, M.; Gestin, J.-F.; Faivre-Chauvet, A.; Tripier, R. New synthesis of phenyl-isothiocyanate C-functionalised cyclams. Bioconjugation and ^{64}Cu phenotypic PET imaging studies of multiple myeloma with the te2a derivative. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 11302–11314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Review

Immuno-PET for Clinical Theranostic Approaches

Clément Bailly ^{1,2}, Pierre-François Cléry ², Alain Faivre-Chauvet ^{1,2}, Mickael Bourgeois ^{1,2}, François Guérard ¹, Ferid Haddad ³, Jacques Barbet ³, Michel Chérel ^{1,4}, Françoise Kraeber-Bodéré ^{1,2,4}, Thomas Carlier ^{1,2} and Caroline Bodet-Milin ^{1,2,*}

- ¹ Nantes-Angers Cancer Research Center (CRCNA), University of Nantes, Inserm UMR 892, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes, France; clement.bailly@chu-nantes.fr (C.B.); alain.faivre-chauvet@univ-nantes.fr (A.F.-C.); mickael.bourgeois@nantes.inserm.fr (M.B.); francois.guerard@univ-nantes.fr (F.G.); michel.cherel@univ-nantes.fr (M.C.); francoise.bodere@chu-nantes.fr (F.K.-B.); thomas.carlier@chu-nantes.fr (T.C.)
 - ² Department of Nuclear Medicine, CHU de Nantes, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France; pf7.clery@gmail.com
 - ³ Groupement d'Intérêt Public Arronax, 1, rue Aronnax, CS 10112, 44817 Saint-Herblain, France; ferid.haddad@univ-nantes.fr (F.H.); jacques.barbet@univ-nantes.fr (J.B.)
 - ⁴ Department of Nuclear Medicine, Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO)-René Gauducheau, Boulevard Jacques Monod, 44805 Saint-Herblain, France
- * Correspondence: caroline.milin@chu-nantes.fr; Tel.: +33-240-084-136; Fax: +33-240-084-218

Academic Editor: Vera Sau-Fong Chan

Received: 3 November 2016; Accepted: 23 December 2016; Published: 28 December 2016

Abstract: Recent advances in molecular characterization of tumors have allowed identification of new molecular targets on tumor cells or biomarkers. In medical practice, the identification of these biomarkers slowly but surely becomes a prerequisite before any treatment decision, leading to the concept of personalized medicine. Immuno-positron emission tomography (PET) fits perfectly with this approach. Indeed, monoclonal antibodies (mAbs) labelled with radionuclides represent promising probes for theranostic approaches, offering a non-invasive solution to assess *in vivo* target expression and distribution. Immuno-PET can potentially provide useful information for patient risk stratification, diagnosis, selection of targeted therapies, evaluation of response to therapy, prediction of adverse effects or for titrating doses for radioimmunotherapy. This paper reviews some aspects and recent developments in labelling methods, biological targets, and clinical data of some novel PET radiopharmaceuticals.

Keywords: immuno-PET; molecular imaging; antibody

1. Introduction

Recent decades have seen the discovery of oncogenesis and tumor suppressor genes, which along with the progressive deciphering of cellular signal transduction pathways, defined the biological hallmarks of cancer [1,2]. This initiated a new era of cancer therapy by developing the use of targeted molecular therapies in complement to cytotoxic drugs and nonspecific chemotherapy. The two main types of these treatments are monoclonal antibodies (mAbs) [3,4] and tyrosine kinase inhibitors (TKIs) [5,6]. They are designed to interfere specifically with single or multiple key molecular pathways involved in tumorigenesis, fulfilling Ehrlich's vision of a "magic bullet", capable of selectively destroying disseminated tumor cells while sparing normal tissues [7].

A key discovery for the production of mAbs was the hybridoma technology, by Köhler and Milstein [8], which allowed unlimited generation of stable mAbs with predetermined specificity. Yet, during their early use, the immunogenicity of these murine mAbs constituted the main obstacle to their therapeutic success. This led to the development of a second-generation of chimeric and

humanized mAbs [9]. The first highly specific mAbs targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) or CD20 opened the door to novel therapeutic strategies and represented an impressive step forward. The clinical efficacy of the anti-HER2 trastuzumab in patients with breast cancer and the anti-CD20 rituximab in B non-Hodgkin lymphoma (NHL) demonstrated for the first time that mAbs can be commercialized as powerful therapeutic agents in the fight against cancer [10,11]. Clinical success with rituximab and trastuzumab energized the research of new target membrane proteins in lymphomas and solid tumors. In the meantime, in the 1980s, a few mAbs were labelled for scintigraphic imaging of tumors [12]. It was a promising challenge but the expected success was limited by a poor imaging resolution despite a rather good specificity of the mAbs. Yet, thanks to the development of more sensitive detectors and specific software, along with significant technical advances in the production of positron-emitting radionuclides and their related labelling methods, a broad range of new tracers for the realization of specific imaging [13–16] were developed in the last decade. In medical practice, the identification of biomarkers will slowly but surely become a prerequisite before any treatment decision, leading to the concept of personalized medicine. Immuno-positron emission tomography (PET), combining the high sensitivity and resolution of a PET camera with the specificity of a mAb, perfectly fits with this approach. Indeed, mAbs labelled with radionuclides represent promising probes for theranostic approaches, offering a non-invasive solution to assess in vivo target expression and distribution and to obtain reliable diagnostic, prognostic and therapeutic information [17]. This overview of targets' distribution could thus be incorporated into individual treatment strategies before the introduction of potentially expensive or toxic therapies [18]. Moreover, one could imagine a role of immuno-PET to facilitate the development of new drugs by pharmaceutical companies. Radio-labelling potential candidates during early development phases could constitute an effective and rapid solution to monitor their pharmacokinetics and distribution. Once labelled with β^- or α^- emitters, radiolabelled mAbs targeting relevant molecular markers expressed by different solid tumors or hemopathies can be used for radioimmunotherapy (RIT). This short review provides an overview of the main issues, current use and promising results of immuno-PET in line with the development of personalized medicine.

2. Radionuclides

Since the 1990s, mAbs have been labelled with γ -emitting radionuclides, such as ^{99m}Tc or ^{111}In , and imaged with planar or Single Photon Emission Computerized Tomography (SPECT) cameras. Although informative, these imaging modalities suffered from limited sensitivity and low-spatial resolution, and did not provide reliable quantitative measurements. In this context, due to high sensitivity, improved spatial resolution and signal-to-noise ratios, coupled with the capability to perform accurate quantification, PET has rapidly emerged as a very powerful method for mAbs imaging [19].

Combining mAbs and positron-emitters requires an appropriate match between the biologic half-life of the protein and the physical half-life of the radionuclide to achieve optimal tumor-to-background activity ratios [20,21]. Indeed, intact antibodies have a long residence time (several days) due to slow blood clearance resulting in optimal image contrast and tumor-to-background activity ratios only at prolonged time points after injection. Thus, the use of short half-life ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ min) or ^{68}Ga ($t_{1/2} = 68$ min) is limited to small size molecules such as peptides or small molecular weight proteins such as mAbs fragments that distribute rapidly in the body. On the other side, ^{89}Zr ($t_{1/2} = 78.4$ h) and ^{124}I ($t_{1/2} = 100$ h) are more suitable for large molecule labelling, such as intact mAbs. ^{64}Cu with an intermediate half-life of 12.7 h can be used for labelling a large number of molecules with different sizes. Radionuclides with a long half-life also offer logistic advantages with respect to radiolabelling and transportation outside the production site but also potential disadvantages with respect to the radiation burden to the patient, especially when coupled to intact mAbs with long biologic half-lives. Finally, within the scope of a theranostic approach, both the

imaging and the therapeutic products can be labelled using the same chemical elements with pairs of β^+ / β^- -emitting radionuclides ($^{124}\text{I}/^{131}\text{I}$, $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$, $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$, $^{44}\text{Sc}/^{47}\text{Sc}$).

Several additional considerations must also be taken into account in selecting the appropriate radionuclides [21]. Positron energy range may affect resolution as the positron may travel a significant distance before annihilation: high-energy positron will result in an intrinsic resolution loss. In addition to half-life, existence of concomitant γ emissions will have major effects on the radiation dose to the patient. Finally, other factors to consider include cost and accessibility.

Imaging with intact mAbs typically requires a minimum delay of more than 1 day post-injection before high-contrast images can be obtained and this has spurred the development of imaging agents based on smaller antibody fragments that retain immune-recognition capabilities. These engineered constructs include F(ab')₂ and Fab fragments, diabodies, minibodies, cysdiabodies or affibodies. They offer rapid clearance from systemic circulation, better extravasation and tumor penetration than intact mAbs allowing for imaging on the same day after administration. Immunoconjugates based on these fragments have for the moment demonstrated encouraging significant preclinical [22–24] and clinical results [25,26].

3. Labelling Techniques

Radionuclides can either be directly conjugated to a mAb or attached indirectly through a linker, depending on their intrinsic properties. The most commonly used PET imaging radionuclides for immuno-PET belong to two classes: radiohalogens and radiometals.

Radiohalogens—of which the main representative is ^{124}I —are usually directly conjugated to the biological vector. The iodination procedure by direct electrophilic substitution on a tyrosine residue is the simplest method for protein labelling [27]. This technique is commonly used and provides satisfactory results with non-internalizing antibodies or peptides. Unfortunately, when internalization occurs, intracellular catabolism of the antibody and dehalogenation result in the clearance of radioiodine from the target tissue, leading to signal loss and unspecific accumulation such as thyroid for iodine. A number of research groups have developed prosthetic or pendant groups to solve this problem [28–30], but they are still at the level of preclinical proofs of concepts. Concerning ^{18}F , although its ease of production in large quantities, its half-life and the low energy of the emitted positron make it an ideal versatile radionuclide for PET imaging, preparing ^{18}F -conjugates require time-consuming and challenging radiosynthesis. In the last decade, despite the fact that direct labelling remains a special challenge, tremendous progress has been made regarding the ^{18}F -labelling of biomolecules, and several strategies have been introduced beyond the use of prosthetic groups [31,32]. Moreover, the combination of antibody fragments and ^{18}F is particularly attractive as the physical half-life of ^{18}F will be well matched to the biologic half-life of the small fragments.

Alternatively, radiometals, such as ^{68}Ga , ^{64}Cu or ^{89}Zr necessitate the use of bifunctional chelating agents such as DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid). The antibody of interest is first conjugated to the chelating agent through covalent attachment. The chelating agent-modified antibody can then provide sequestration of the radionuclide to yield a stable complex. However, the metallic radionuclides are diverse in terms of their coordination chemistries, and thus, various kinds of chelating agents are required to label with many radionuclides [33,34].

One of the main factors to be considered for the selection of a suitable chelating agent for a specific radionuclide is stability. Another additional critical property to consider is the fate of the radionuclide in case of dissociation, or after antibody catabolism. Ideally, intact conjugates would accumulate and be retained selectively at the tumor site while free or chelated radionuclides would be rapidly excreted via the urinary tract without intracellular retention in the non-target tissues. Yet, this is not the case, and unwanted retention of metallic radionuclides is the rule. For example, a lot of recent preclinical studies reported the use of ^{89}Zr and its most commonly used chelator, desferrioxamine (DFO) [35]. Yet, significant bone uptake has been reported in preclinical studies even with purified ^{89}Zr -DFO-mAb conjugates [36]. This uptake is explained by the release of free ^{89}Zr cations within the body that

mineralize into the skeleton. This uptake of free ^{89}Zr could be of particular concern in the clinic, and has led several groups to investigate the possibility of developing better chelators for ^{89}Zr . Similarly, transmetallation or transchelation phenomena can occur *in vivo* when the radiopharmaceutical is in competition with metal complexing proteins, such as transferrin or ceruloplasmin leading to unwanted liver and kidney uptakes. This potential drawback has been described in a recent review by Zhou [37] with regard to biological behaviors and distributions of radionuclide-labeled mAbs. To limit these phenomena, as dissociation of the radionuclide is directly associated to this loss in image quality, continued research of better chelation agents has been done in order to improve both selectivity and stability. Chelating agents with very high affinities for metals and kinetics stabilities need to be developed [34].

An alternative approach to provide better tumor-to-background ratios and contrast, is pre-targeted imaging [38–40]. In this approach, unlabelled antibodies are used, capable of both binding antigens and radiolabelled small molecular weight ligands. After administration, binding, and clearance of the antibody, the radioactive ligand is injected in a second step to bind to the pre-localized antibody. A variety of pre-targeting techniques have been proposed with good results both for imaging and therapy in preclinical and clinical models.

Very recently, the use of click chemistry has also emerged as a new specialized conjugation method for preparing imaging probes [41,42]. Due to their rapid and highly selective nature, bioorthogonal chemistry reactions represented by the strain-promoted alkyne-azide cycloaddition and inverse electron demand Diels-Alder cycloaddition, are attracting a significant amount of interest in the radiopharmaceutical community [43,44]. Click chemistry has the potential to circumvent many of the limitations of its predecessors and has shown significant promise in a few pioneering preclinical studies.

4. Applications

Each patient is unique. The move toward personalized medicine aims to provide the right therapeutic strategy to the right patient at the right dose, at the right time. As previously described, immuno-PET perfectly fits in this concept. Radio-immunoconjugates (RIC) have become prominent in recent developments in oncology because of improvements in mAb technology, and access to novel radionuclides has also improved; together these have increased the clinical attention to immuno-PET in the last 5 years (Figure 1).

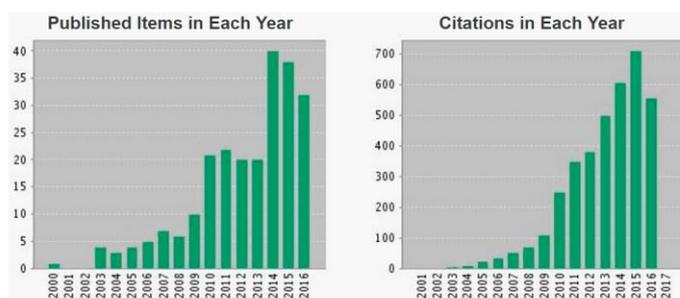


Figure 1. Topic of research on Webofknowledge.com: “immuno-positron emission tomography (PET)”. This report reflects citations to source items indexed within Web of Science Core Collection.

mAbs labelled with positron-emitters could indeed have several *in vivo* uses. They could of course help in molecular diagnosis or be correlated to the prognosis of patients. They could also be considered as companions in theranostic approaches, to non-invasively assess *in vivo* tumor antigen expression and accessibility, in the context of targeted mAb therapies or RIT. This role in patient selection appears essential and is considered as one the main advantages of immuno-PET, target

expression usually being a prerequisite for response. Moreover, if target accessibility is low, therapeutic agents cannot reach the tumor and be effective, even if immunohistochemical expression of receptors on the tumor cells has been assessed. For RIT, immuno-PET could probably help optimizing injected doses too.

The first clinical proof that immuno-PET represents a powerful tool for molecular diagnosis has probably been reported by Divgi et al. [45] in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), with the chimeric antibody cG250 (girentuximab). This mAb reacting against carbonic anhydrase IX (CAIX), a cell-surface antigen over-expressed in the vast majority of ccRCC, was ^{124}I -labelled and used in 26 pre-surgical patients with renal masses. In this study, the sensitivity and specificity for ccRCC were respectively 94% and 100%, with a negative predictive value of 90% and a positive predictive value of 100% [45]. These excellent preliminary results have been confirmed in a phase III study (REDECT), demonstrating that PET imaging using ^{124}I -labelled girentuximab could accurately and noninvasively assess the presence or absence of ccRCC while avoiding the inherent risks of biopsy [46]. Another study reported a potential interest of CAIX immuno-PET imaging as this protein is also upregulated in many other tumor types and generally correlated with hypoxia. The capability of ^{89}Zr -labelled girentuximab to visualize tumor hypoxia was thus assessed, in a preclinical model of human head and neck xenograft tumor. This study reported a significant, positive correlation between ^{89}Zr -labelled girentuximab accumulation and CAIX expression on a microscopic level [47]. Even though further clinical studies are warranted, these results suggest an additional potential role for this radioimmunconjugate in defining CAIX-positive hypoxic areas potentially requiring intensified therapy.

Interesting results in diagnostic and prognostic imaging were also obtained with prostate cancer. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) is a well-characterized imaging biomarker of prostate cancer directly related to androgen independence, metastasis and progression. One of the first anti-PSMA radioimmunoconjugates is the ^{111}In -labelled capromab pendetide (ProstaScint), a mouse monoclonal antibody conjugate that is useful for SPECT imaging [48]. New high affinity antibodies of PSMA for PET imaging have also been developed, such as J415, J533, and J591. The latter is the most extensively studied [49,50], with satisfactory results in accurately targeting bone and soft tissue metastatic prostate cancer sites. A phase I imaging trial with ^{89}Zr -labelled J591 in 10 patients with metastatic prostate cancer also demonstrated the ability of this construct to identify metastases, including lesions that were not detected on conventional imaging [51]. Moreover, a recent prospective study in patients awaiting prostatectomy found that a ^{89}Zr -labelled conjugate of the J591 antibody was able to identify tumors with a Gleason score of seven or greater [52]. Yet, major disadvantages have been described with these radiolabelled monoclonal antibodies such as the long time from injection for optimal imaging, with several days often required due to poor tumor penetration. To address that issue, multiple small-molecule ligands targeting PSMA have also been explored such as aptamers and PSMA inhibitors of low molecular weight [50].

The pre-targeting anti-carcinoembryonic antigen (CEA) system using TF2, a humanized trivalent bispecific antibody (BsMab) and IMP288, a radiolabelled hapten have been adapted for immuno-PET in different solid tumor models, using short half-life emitters such as ^{18}F or ^{68}Ga . In a first human optimization trial testing the feasibility of this system in relapsing medullary thyroid cancer, our team demonstrated that a high-contrast tumor uptake can be obtained using pre-targeted immuno-PET (Figure 2) [40]. Promising results were also obtained in CEA-positive breast cancer patients and another study (ClinicalTrials.gov NCT02587247) is ongoing to evaluate the potential of anti-CEA immuno-PET in colorectal carcinoma.

In the context of personalized medicine, selecting patients before targeted therapy to predict response also appears as an application to consider. Excellent results were obtained with anti-HER2 imaging in breast cancer, and will be further discussed below. Similarly, ^{89}Zr -labelled bevacizumab was assessed in seven patients with non-small cell lung cancer and followed by induction therapy combining carboplatin, paclitaxel and bevacizumab. A positive trend without significant correlation was found for tumor uptake and progression-free survival and overall survival after treatment [53].

Similar encouraging results were observed in patients with advanced colorectal cancer who received ^{89}Zr -labelled cetuximab followed by treatment with cetuximab [54]. Yet, no association was observed between tumor accumulation and clinical benefit in other clinical applications such as ^{89}Zr -labelled bevacizumab followed by everolimus therapy in patients with neuroendocrine tumors [55] and in patients with recurrent high-grade glioma treated with fresolimumab using ^{89}Zr -labelled fresolimumab imaging [56]. Based on these preliminary clinical results, despite some discrepancies and studies with a relatively small numbers of patients, it appears that immuno-PET has a real potential for predicting response to targeted therapy assuming that the radioimmunoconjugate's biodistribution is representative of the therapeutic mAbs' biodistribution. The validation of this approach to guide therapeutic strategies requires larger prospective studies demonstrating that stopping or continuing therapy based on imaging results is favorable to patient outcomes compared with standard practice. Moreover, for therapeutic evaluation, if the imaging radiolabelled mAb is the same as the one used for therapy, more investigations will be perhaps needed to determine whether the potential absence of tumor uptake reflects a reduction in target overexpression as a consequence of targeted therapy or impaired targeting explained by partial saturation with unlabelled mAbs [57]. Similarly, optimal dosage of radiolabelled-mAbs might be different in naïve patients than in those undergoing treatment with unlabelled-mAbs [58]. Further randomized multicentric clinical studies are still warranted before immuno-PET could be fully considered as a companion diagnostic test.

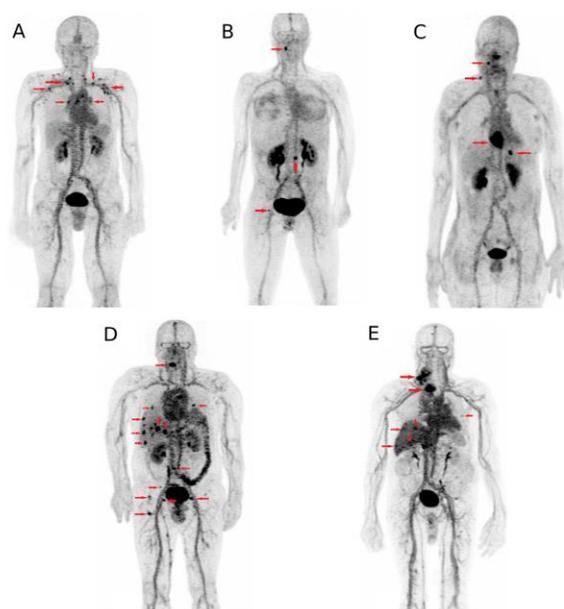


Figure 2. Immuno-PET maximum-intensity-projection images recorded in five patients (one patient of each cohort, A to E) included in the optimization part of the first-in-human immuno-PET trial using anti-carcinoembryonic antigen CEA bispecific antibody and ^{68}Ga -labelled peptide in metastatic medullary thyroid carcinoma. Arrows showed foci considered as pathologic by immuno-PET. (This research was originally published in *JNM. Immuno-PET using anti-CEA bispecific antibody and ^{68}Ga -labelled peptide in metastatic medullary thyroid carcinoma: clinical optimization of the pre-targeting parameters in a First-in Human trial.* Bodet-Milin et al. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 1505–1511. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc., Reston, VA, USA).

One of the most widely used mAbs in clinical practice is trastuzumab, which targets HER2. HER2 plays an important role in breast cancer pathogenesis. Anti-Her2 therapeutic agents are only effective in patients who have HER2-positive breast cancer. In clinical practice, HER2 expression is assessed by immunohistochemistry and technical difficulties can arise when lesions are not accessible to biopsy. Moreover, HER2 status of metastatic lesions can differ from the primary site and discrepancies can appear across lesions within the same patient during the course of the disease. Several reports suggested the negative prognostic impact of these changes in histopathological biomarker profiles between primary and recurrent tumors in breast cancer [59–61]. For these reasons, evaluating HER2 status of recurrent breast cancer before therapeutic decisions of targeted therapies seems an essential prerequisite. An anti-HER2 immuno-PET would allow measurement of receptor expression of whole tumors and their metastases, avoiding sampling errors and thus misinterpretation due to intratumoral and interlesional heterogeneity, without the need for repeated invasive biopsies. Several studies reported that immuno-PET with ^{68}Ga , ^{64}Cu or ^{89}Zr could allow non-invasive assessment of lesions that are likely to respond to therapy [62–65]. In the ZEPHIR study, pre-treatment PET using ^{89}Zr -labelled trastuzumab was explored in HER2-positive metastatic breast cancer patients scheduled for treatment with trastuzumab emtansine (T-DM1) [66]. PET using [^{18}F]-fluoro deoxy glucose (FDG-PET) was performed at baseline and before the second cycle of T-DM1. Immuno-PET with anti-HER2 was negative in 29% of the studied population. Positive predictive value and negative predictive value were respectively of 72% and of 88% for immuno-PET and of 96% and of 83% for FDG-PET. Predictive values of 100% were obtained by combining immune-PET and FDG-PET, and patients with a time-to-treatment failure of 2.8 months from those with a time-to-treatment failure of 15 months were discriminated. This innovative work and results support the benefit of combining imaging methods to assess target expression with evaluation of drug impact on the target. To our knowledge, this is the first time such a combined approach has been undertaken and it clearly demonstrates its accuracy in predicting whether adequate tumor targeting is followed by sufficient efficacy and cytotoxicity.

The programmed cell death protein 1 (PD1)/programmed death-ligand 1 (PD-L1) axis is an important immune checkpoint for T cell activation. PD-L1 overexpression is associated with a poorer prognosis in a variety of cancers, especially in breast, gastric, renal cell, ovarian, non-small lung, hematologic cancers and melanoma [67–73]. Patients with PD-L1 overexpression typically have a stronger response to anti-PD-L1 therapy, such that determining PD-L1 expression allows identifying patients who will respond to anti-PD-L1 therapy. Additionally, monitoring changes in PD-L1 expression could provide information considering treatment efficacy or potential toxicity. The PD-L1 expression is usually evaluated using immunohistochemistry (IHC) on archive tissue samples, and does not consider that PD-L1 expression may undergo changes due to alterations in tumor microenvironment or previous treatment. Some preclinical studies showed the potential interest of noninvasive SPECT or PET imaging of tumor PD-L1 expression using radiolabelled anti-PD-L1 antibodies [74–76]; yet, to our knowledge and according to Clinicaltrials.gov, only one clinical study is under recruitment. The latter aims to evaluate the potential interest of an anti-PDL1 antibody called MPDL3280A labelled with ^{89}Zr for non-invasive imaging and quantification of PD-L1 distribution in patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer, bladder cancer or triple-negative breast cancer.

Immuno-PET could provide information about tumor targeting, pharmacokinetics and accumulation in critical normal organs for RIT planning. By translating tumor-to-background ratios into potential absorbed radiation doses, this approach allows for improved optimal dosing. Impact of preloading with unlabelled antibody could also be assessed [77,78]. Rizvi et al. [79] conducted a prospective clinical study to evaluate the biodistribution and radiation dosimetry of ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]) using ^{89}Zr -ibritumomab tiuxetan. Patients with relapsed B-cell NHL underwent PET scans after injection of ^{89}Zr -ibritumomab tiuxetan and again 2 weeks later after coinjection of ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan. Biodistribution of ^{89}Zr -ibritumomab tiuxetan was not influenced by simultaneous treatment with ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan. High correlation was observed between

predicted pre-therapy and absorbed therapy organ doses as based on ^{89}Zr -ibritumomab tiuxetan images. These results are similar to previous data presented by Perk et al. [80], and confirm the potential value of pre-therapy ^{89}Zr -immuno-PET to enable individualized treatment by optimizing RIT dose schedules for patients.

5. Conclusions

Today, the field of PET molecular imaging is rapidly progressing toward clinical use, providing repeatable non-invasive whole-body biomarkers mapping. Furthermore, immuno-PET represents a promising tool for personalized medicine in the context of multimodality treatment strategies. Consistent preclinical and clinical studies have been performed showing the safety, the improved image quality, as well as the potential for proper estimation of the antigenic expression level of immuno-PET. Moreover, it is attractive for studying the in vivo behavior of antibody-based therapies and for better understanding their therapy efficacy.

Acknowledgments: This work has been supported in part by grants from the French National Agency for Research, called “Investissements d’Avenir” IRON (Innovative Radiopharmaceuticals in Oncology and Neurology) Labex n° ANR-11-LABX-0018-01 and ArronaxPlus Equipex n° ANR-11-EQPX-0004. We thank David Goldenberg, Garden State Cancer Center, Center for Molecular Medicine and Immunology and Immunomedics, Morris Plains, NJ, USA, Robert Sharkey, Garden State Cancer Center, Center for Molecular Medicine and Immunology, Morris Plains, NJ, USA, and William Wegener, Immunomedics, Morris Plains, NJ, USA, for their collaboration over many years in the field of immunotargeting.

Author Contributions: All authors have directly participated in the review process or in the writing of this paper, and have read and approved the final version submitted.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Alam, I.S.; Arshad, M.A.; Nguyen, Q.-D.; Aboagye, E.O. Radiopharmaceuticals as probes to characterize tumour tissue. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *42*, 537–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mellstedt, H. Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today* **2003**, *39*, 1–16. [[PubMed](#)]
- Fauvel, B.; Yasri, A. Antibodies directed against receptor tyrosine kinases: Current and future strategies to fight cancer. *MAbs* **2014**, *6*, 838–851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Medinger, M.; Dreves, J. Receptor tyrosine kinases and anticancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 1139–1149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Baselga, J. Targeting tyrosine kinases in cancer: The second wave. *Science* **2006**, *312*, 1175–1178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wright, B.D.; Lapi, S.E. Designing the magic bullet? The advancement of immuno-PET into clinical use. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 1171–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Köhler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Teillaud, J.-L. Engineering of monoclonal antibodies and antibody-based fusion proteins: Successes and challenges. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2005**, *5*, S15–S27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Slamon, D.J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 783–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Press, O.W.; Leonard, J.P.; Coiffier, B.; Levy, R.; Timmerman, J. Immunotherapy of Non-Hodgkin’s lymphomas. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2001**, *2001*, 221–240. [[CrossRef](#)]
- Herlyn, M.; Stepelwski, Z.; Herlyn, D.; Koprowski, H. Colorectal carcinoma-specific antigen: Detection by means of monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 1438–1442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Moses, W.W. Recent advances and future advances in time-of-flight PET. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **2007**, *580*, 919–924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Lewellen, T.K. Recent developments in PET detector technology. *Phys. Med. Biol.* **2008**, *53*, R287–R317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Boerman, O.C.; Oyen, W.J.G. Immuno-PET of cancer: A revival of antibody imaging. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 1171–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Van Dongen, G.A.M.S.; Poot, A.J.; Vugts, D.J. PET imaging with radiolabeled antibodies and tyrosine kinase inhibitors: Immuno-PET and TKI-PET. *Tumor Biol.* **2012**, *33*, 607–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Van Dongen, G.A.M.S.; Visser, G.W.M.; Lub-de Hooge, M.N.; de Vries, E.G.; Perk, L.R. Immuno-PET: A navigator in monoclonal antibody development and applications. *Oncologist* **2007**, *12*, 1379–1389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kraeber-Bodere, F.; Bailly, C.; Chérel, M.; Chatal, J.-F. ImmunoPET to help stratify patients for targeted therapies and to improve drug development. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43*, 2166–2168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Rahmim, A.; Zaidi, H. PET versus SPECT: Strengths, limitations and challenges. *Nucl. Med. Commun.* **2008**, *29*, 193–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kraeber-Bodéré, F.; Rousseau, C.; Bodet-Milin, C.; Mathieu, C.; Guérard, F.; Frampas, E.; Carlier, T.; Chouin, N.; Haddad, F.; Chatal, J.-F.; et al. Tumor immunotargeting using innovative radionuclides. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 3932–3954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Boswell, C.A.; Brechbiel, M.W. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: An inside-out view. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34*, 757–778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Freise, A.C.; Wu, A.M. In vivo imaging with antibodies and engineered fragments. *Mol. Immunol.* **2015**, *67*, 142–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Muyldermans, S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 775–797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ying, T.; Gong, R.; Ju, T.W.; Prabakaran, P.; Dimitrov, D.S. Engineered Fc based antibody domains and fragments as novel scaffolds. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1844*, 1977–1982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sandström, M.; Lindskog, K.; Velikyan, I.; Wennborg, A.; Feldwisch, J.; Sandberg, D.; Tolmachev, V.; Orlova, A.; Sörensen, J.; Carlsson, J.; et al. Biodistribution and radiation dosimetry of the anti-HER2 antibody molecule ⁶⁸Ga-ABY-025 in breast cancer patients. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 867–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Keyaerts, M.; Xavier, C.; Heemskerck, J.; Devoogdt, N.; Everaert, H.; Ackaert, C.; Vanhoeij, M.; Duhoux, F.P.; Gevaert, T.; Simon, P.; et al. Phase I study of ⁶⁸Ga-HER2-nanobody for PET/CT assessment of HER2 expression in breast carcinoma. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 27–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Fraker, P.J.; Speck, J.C. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. 1978. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *425*, 510–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wilbur, D.S.; Chyan, M.-K.; Hamlin, D.K.; Perry, M.A. Preparation and in vivo evaluation of radioiodinated *closo*-decaborate(2–) derivatives to identify structural components that provide low retention in tissues. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37*, 167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Tolmachev, V.; Orlova, A.; Lundqvist, H. Approaches to improve cellular retention of radiohalogen labels delivered by internalising tumour-targeting proteins and peptides. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2447–2460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kim, E.J.; Kim, B.S.; Choi, D.B.; Chi, S.-G.; Choi, T.H. Enhanced tumor retention of radioiodinated anti-epidermal growth factor receptor antibody using novel bifunctional iodination linker for radioimmunotherapy. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 3159–3168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. McBride, W.J.; Sharkey, R.M.; Karacay, H.; D'Souza, C.A.; Rossi, E.A.; Laverman, P.; Chang, C.-H.; Boerman, O.C.; Goldenberg, D.M. A novel method of ¹⁸F radiolabeling for PET. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 991–998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Shively, J.E. ¹⁸F Labeling for immuno-PET: Where speed and contrast meet. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 170–172. [[PubMed](#)]
33. Price, E.W.; Orvig, C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 260–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Brechbiel, M.W. Bifunctional chelates for metal nuclides. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *52*, 166–173. [[PubMed](#)]

35. Vugts, D.J.; van Dongen, G.A.M.S. ^{89}Zr -labeled compounds for PET imaging guided personalized therapy. *Drug Discov. Today Technol.* **2011**, *8*, e53–e61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Abou, D.S.; Ku, T.; Smith-Jones, P.M. In vivo biodistribution and accumulation of ^{89}Zr in mice. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38*, 675–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Zhou, Y.; Baidoo, K.E.; Brechbiel, M.W. Mapping biological behaviors by application of longer-lived positron emitting radionuclides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1098–1111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Sharkey, R.M.; McBride, W.J.; Karacay, H.; Chang, K.; Griffiths, G.L.; Hansen, H.J.; Goldenberg, D.M. A universal pretargeting system for cancer detection and therapy using bispecific antibody. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 354–363. [[PubMed](#)]
39. Goldenberg, D.M.; Sharkey, R.M.; Paganelli, G.; Barbet, J.; Chatal, J.-F. Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 823–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Bodet-Milin, C.; Faivre-Chauvet, A.; Carlier, T.; Rauscher, A.; Bourgeois, M.; Cerato, E.; Rohmer, V.; Couturier, O.; Drui, D.; Goldenberg, D.M.; et al. Immuno-PET using anti-CEA bispecific antibody and ^{68}Ga -labeled peptide in metastatic medullary thyroid carcinoma: Clinical optimization of the pretargeting parameters in a First-in Human trial. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 1505–1511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Lim, R.K.V.; Lin, Q. Bioorthogonal chemistry: Recent progress and future directions. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1589–1600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Knight, J.C.; Cornelissen, B. Bioorthogonal chemistry: Implications for pretargeted nuclear (PET/SPECT) imaging and therapy. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *4*, 96–113. [[PubMed](#)]
43. Zeglis, B.M.; Mohindra, P.; Weissmann, G.I.; Divilov, V.; Hilderbrand, S.A.; Weissleder, R.; Lewis, J.S. Modular strategy for the construction of radiometalated antibodies for positron emission tomography based on inverse electron demand Diels-Alder click chemistry. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 2048–2059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zeng, D.; Zeglis, B.M.; Lewis, J.S.; Anderson, C.J. The growing impact of bioorthogonal click chemistry on the development of radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 829–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Divgi, C.R.; Pandit-Taskar, N.; Jungbluth, A.A.; Reuter, V.E.; Gönen, M.; Ruan, S.; Pierre, C.; Nagel, A.; Pryma, D.A.; Humm, J.; et al. Preoperative characterisation of clear-cell renal carcinoma using iodine-124-labelled antibody chimeric G250 (^{124}I -cG250) and PET in patients with renal masses: A phase I trial. *Lancet Oncol.* **2007**, *8*, 304–310. [[CrossRef](#)]
46. Divgi, C.R.; Uzzo, R.G.; Gatsonis, C.; Bartz, R.; Treutner, S.; Yu, J.Q.; Chen, D.; Carrasquillo, J.A.; Larson, S.; Bevan, P.; et al. Positron emission tomography/computed tomography identification of clear cell renal cell carcinoma: Results from the REDECT trial. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 187–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Hoeben, B.A.W.; Kaanders, J.H.A.M.; Franssen, G.M.; Troost, E.G.C.; Rijken, P.F.J.W.; Oosterwijk, E.; van Dongen, G.A.M.S.; Oyen, W.J.G.; Boerman, O.C.; Bussink, J. PET of hypoxia with ^{89}Zr -labeled cG250-F(ab')₂ in head and neck tumors. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 1076–1083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Elgamal, A.A.; Troychak, M.J.; Murphy, G.P. ProstaScint scan may enhance identification of prostate cancer recurrences after prostatectomy, radiation, or hormone therapy: Analysis of 136 scans of 100 patients. *Prostate* **1998**, *37*, 261–269. [[CrossRef](#)]
49. Mease, R.C.; Foss, C.A.; Pomper, M.G. PET imaging in prostate cancer: Focus on prostate-specific membrane antigen. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 951–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kiess, A.P.; Banerjee, S.R.; Mease, R.C.; Rowe, S.P.; Rao, A.; Foss, C.A.; Chen, Y.; Yang, X.; Cho, S.Y.; Nimmagadda, S.; et al. Prostate-specific membrane antigen as a target for cancer imaging and therapy. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *59*, 241–268. [[PubMed](#)]
51. Pandit-Taskar, N.; O'Donoghue, J.A.; Beylgeril, V.; Lyashchenko, S.; Ruan, S.; Solomon, S.B.; Durack, J.C.; Carrasquillo, J.A.; Lefkowitz, R.A.; Gonen, M.; et al. ^{89}Zr -huJ591 immuno-PET imaging in patients with advanced metastatic prostate cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *41*, 2093–2105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Osborne, J.R.; Green, D.A.; Spratt, D.E.; Lyashchenko, S.; Fareedy, S.B.; Robinson, B.D.; Beattie, B.J.; Jain, M.; Lewis, J.S.; Christos, P.; et al. A prospective pilot study of ^{89}Zr -J591/prostate specific membrane antigen positron emission tomography in men with localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *J. Urol.* **2014**, *191*, 1439–1445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bahce, I.; Huisman, M.C.; Verwer, E.E.; Ooijevaar, R.; Boutkourt, F.; Vugts, D.J.; van Dongen, G.A.; Boellaard, R.; Smit, E.F. Pilot study of ^{89}Zr -bevacizumab positron emission tomography in patients with advanced non-small cell lung cancer. *EJNMMI Res.* **2014**, *4*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Menke-van der Houven van Oordt, C.W.; Gootjes, E.C.; Huisman, M.C.; Vugts, D.J.; Roth, C.; Luik, A.M.; Mulder, E.R.; Schuit, R.C.; Boellaard, R.; Hoekstra, O.S.; et al. ^{89}Zr -cetuximab PET imaging in patients with advanced colorectal cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 30384–30393. [[PubMed](#)]
55. van Asselt, S.J.; Oosting, S.F.; Brouwers, A.H.; Bongaerts, A.H.H.; de Jong, J.R.; Lub-de Hooge, M.N.; Oude Munnink, T.H.; Fiebrich, H.-B.; Sluiter, W.J.; Links, T.P.; et al. Everolimus reduces ^{89}Zr -bevacizumab tumor uptake in patients with neuroendocrine tumors. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55*, 1087–1092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Den Hollander, M.W.; Bensch, F.; Glaudemans, A.W.J.M.; Oude Munnink, T.H.; Enting, R.H.; den Dunnen, W.F.A.; Heesters, M.A.A.M.; Kruyt, F.A.E.; Lub-de Hooge, M.N.; Cees de Groot, J.; et al. TGF- β antibody uptake in recurrent high-grade glioma imaged with ^{89}Zr -fresolimumab PET. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56*, 1310–1314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Mortimer, J.E.; Bading, J.R.; Colcher, D.M.; Conti, P.S.; Frankel, P.H.; Carroll, M.I.; Tong, S.; Poku, E.; Miles, J.K.; Shively, J.E.; et al. Functional imaging of human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer using ^{64}Cu -DOTA-trastuzumab PET. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55*, 23–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Dijkers, E.C.; Oude Munnink, T.H.; Kosterink, J.G.; Brouwers, A.H.; Jager, P.L.; de Jong, J.R.; van Dongen, G.A.; Schröder, C.P.; Lub-de Hooge, M.N.; de Vries, E.G. Biodistribution of ^{89}Zr -trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *87*, 586–592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Dieci, M.V.; Barbieri, E.; Piacentini, F.; Ficarra, G.; Bettelli, S.; Dominici, M.; Conte, P.F.; Guarneri, V. Discordance in receptor status between primary and recurrent breast cancer has a prognostic impact: A single-institution analysis. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, 101–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Liedtke, C.; Broglio, K.; Moulder, S.; Hsu, L.; Kau, S.-W.; Symmans, W.F.; Albarracín, C.; Meric-Bernstam, F.; Woodward, W.; Theriault, R.L.; et al. Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer. *Ann. Oncol.* **2009**, *20*, 1953–1958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Yang, Y.-F.; Liao, Y.-Y.; Yang, M.; Peng, N.-F.; Xie, S.-R.; Xie, Y.-F. Discordances in ER, PR and HER2 receptors between primary and recurrent/metastatic lesions and their impact on survival in breast cancer patients. *Med. Oncol.* **2014**, *31*, 214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Dijkers, E.C.F.; Kosterink, J.G.W.; Rademaker, A.P.; Perk, L.R.; van Dongen, G.A.M.S.; Bart, J.; de Jong, J.R.; de Vries, E.G.E.; Lub-de Hooge, M.N. Development and characterization of clinical-grade ^{89}Zr -trastuzumab for HER2/neu immunoPET imaging. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 974–981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Baum, R.P.; Prasad, V.; Müller, D.; Schuchardt, C.; Orlova, A.; Wennborg, A.; Tolmachev, V.; Feldwisch, J. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic ^{111}In - or ^{68}Ga -labeled affibody molecules. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 892–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Tamura, K.; Kurihara, H.; Yonemori, K.; Tsuda, H.; Suzuki, J.; Kono, Y.; Honda, N.; Kodaira, M.; Yamamoto, H.; Yunokawa, M.; et al. ^{64}Cu -DOTA-trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 1869–1875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Jauw, Y.W.S.; Menke-van der Houven van Oordt, C.W.; Hoekstra, O.S.; Hendrikse, N.H.; Vugts, D.J.; Zijlstra, J.M.; Huisman, M.C.; van Dongen, G.A.M.S. Immuno-positron emission tomography with zirconium-89-labeled monoclonal antibodies in oncology: What can we learn from initial clinical trials? *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Gebhart, G.; Lamberts, L.E.; Wimana, Z.; Garcia, C.; Emonts, P.; Ameye, L.; Stroobants, S.; Huizing, M.; Aftimos, P.; Tol, J.; et al. Molecular imaging as a tool to investigate heterogeneity of advanced HER2-positive breast cancer and to predict patient outcome under trastuzumab emtansine (T-DM1): The ZEPHIR trial. *Ann. Oncol.* **2016**, *27*, 619–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Ghebeh, H.; Mohammed, S.; Al-Omair, A.; Qattan, A.; Lehe, C.; Al-Qudaihi, G.; Elkum, N.; Alshabanah, M.; Bin Amer, S.; Tulbah, A.; et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: Correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia* **2006**, *8*, 190–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Wu, C.; Zhu, Y.; Jiang, J.; Zhao, J.; Zhang, X.-G.; Xu, N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem.* **2006**, *108*, 19–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

69. Thompson, R.H.; Kuntz, S.M.; Leibovich, B.C.; Dong, H.; Lohse, C.M.; Webster, W.S.; Sengupta, S.; Frank, I.; Parker, A.S.; Zincke, H.; et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3381–3385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Hamanishi, J.; Mandai, M.; Abiko, K.; Matsumura, N.; Baba, T.; Yoshioka, Y.; Kosaka, K.; Konishi, I. The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors. *Clin. Immunol.* **2011**, *141*, 338–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Mu, C.-Y.; Huang, J.-A.; Chen, Y.; Chen, C.; Zhang, X.-G. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med. Oncol.* **2011**, *28*, 682–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Taube, J.M.; Anders, R.A.; Young, G.D.; Xu, H.; Sharma, R.; McMiller, T.L.; Chen, S.; Klein, A.P.; Pardoll, D.M.; Topalian, S.L.; et al. Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 127ra37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Liu, J.; Hamrouni, A.; Wolowiec, D.; Coiteux, V.; Kuliczowski, K.; Hetuin, D.; Saudemont, A.; Quesnel, B. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* **2007**, *110*, 296–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Heskamp, S.; Hobo, W.; Molkenboer-Kuening, J.D.M.; Olive, D.; Oyen, W.J.G.; Dolstra, H.; Boerman, O.C. Noninvasive imaging of tumor PD-L1 expression using radiolabeled anti-PD-L1 antibodies. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2928–2936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Natarajan, A.; Mayer, A.T.; Xu, L.; Reeves, R.E.; Gano, J.; Gambhir, S.S. Novel radiotracer for immuno-PET imaging of PD-1 checkpoint expression on tumor infiltrating lymphocytes. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2062–2069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Josefsson, A.; Nedrow, J.R.; Park, S.; Banerjee, S.R.; Rittenbach, A.; Jammes, F.; Tsui, B.; Sgouros, G. Imaging, biodistribution, and dosimetry of radionuclide-labeled PD-L1 antibody in an immunocompetent mouse model of breast cancer. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 472–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Schoffelen, R.; Woliner-van der Weg, W.; Visser, E.P.; Goldenberg, D.M.; Sharkey, R.M.; McBride, W.J.; Chang, C.-H.; Rossi, E.A.; van der Graaf, W.T.A.; Oyen, W.J.G.; et al. Predictive patient-specific dosimetry and individualized dosing of pretargeted radioimmunotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *41*, 1593–1602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Bodet-Milin, C.; Ferrer, L.; Rauscher, A.; Masson, D.; Rbah-Vidal, L.; Faivre-Chauvet, A.; Cerato, E.; Rousseau, C.; Hureauux, J.; Couturier, O.; et al. Pharmacokinetics and dosimetry studies for optimization of pretargeted radioimmunotherapy in CEA-expressing advanced lung cancer patients. *Front. Med.* **2015**, *2*, 84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Rizvi, S.N.F.; Visser, O.J.; Vosjan, M.J.W.D.; van Lingen, A.; Hoekstra, O.S.; Zijlstra, J.M.; Huijgens, P.C.; van Dongen, G.A.M.S.; Lubberink, M. Biodistribution, radiation dosimetry and scouting of ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan therapy in patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma using ^{89}Zr -ibritumomab tiuxetan and PET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*, 512–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Perk, L.R.; Visser, O.J.; Stigter-van Walsum, M.; Vosjan, M.J.W.D.; Visser, G.W.M.; Zijlstra, J.M.; Huijgens, P.C.; van Dongen, G.A.M.S. Preparation and evaluation of ^{89}Zr -Zevalin for monitoring of ^{90}Y -Zevalin biodistribution with positron emission tomography. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006**, *33*, 1337–1345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Comparison of Immuno-PET of CD138 and PET imaging with $^{64}\text{CuCl}_2$ and ^{18}F -FDG in a preclinical syngeneic model of multiple myeloma

Clément Bailly^{1,2,*}, Sébastien Gouard^{2,*}, Marie Lacombe^{1,3}, Patricia Remaud-Le Saëc², Benjamin Chalopin², Mickaël Bourgeois^{1,2,4}, Nicolas Chouin^{2,5}, Raphaël Tripier⁶, Zakaria Halime⁶, Ferid Haddad⁴, Alain Faivre-Chauvet^{1,2}, Françoise Kraeber-Bodéré^{1,2,3}, Michel Chérel^{2,3,4,*} and Caroline Bodet-Milin^{1,2,*}

¹Nuclear Medicine Department, University Hospital, Nantes, France

²Nantes-Angers Cancer Research Center CRCINA, University of Nantes, INSERM UMR1232, CNRS-ERL6001, Nantes, France

³Nuclear Medicine Department, ICO-René Gauducheau Cancer Center, Saint-Herblain, France

⁴Groupement d'Intérêt Public ARRONAX, Saint-Herblain, France

⁵AMaROC, Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation de Nantes-Atlantique, Nantes, France

⁶CNRS-UMR6521, University of Bretagne Occidentale, Brest, France

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Michel Chérel, email: Michel.Cherel@univ-nantes.fr

Keywords: multiple myeloma; immuno-PET; copper-64; murine CD138; syngeneic model

Received: May 07, 2017

Accepted: November 10, 2017

Published: January 03, 2018

Copyright: Bailly et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Purpose: Although recent data from the literature suggest that PET imaging with [18]-Fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) is a promising technique in multiple myeloma (MM), the development of other radiopharmaceuticals seems relevant. CD138 is currently used as a standard marker in many laboratories for the identification and purification of myeloma cells, and could be used in phenotype tumor imaging. In this study, we evaluated a ^{64}Cu -labeled anti-CD138 murine antibody (^{64}Cu -TE2A-9E7.4) and a metabolic tracer ($^{64}\text{CuCl}_2$) for PET imaging in a MM syngeneic mouse model.

Experimental Design and Results: ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 antibody and $^{64}\text{CuCl}_2$ were evaluated via PET imaging and biodistribution studies in C57BL / KaLwRij mice bearing either 5T33-MM subcutaneous tumors or bone lesions. These results were compared to ^{18}F -FDG-PET imaging. Autoradiography and histology of representative tumors were secondly conducted. In biodistribution and PET studies, ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 displayed good tumor uptake of subcutaneous and intra-medullary lesions, greater than that demonstrated with ^{18}F -FDG-PET. In control experiments, only low-level, non-specific uptake of ^{64}Cu -labeled isotype IgG was observed in tumors. Similarly, low activity concentrations of $^{64}\text{CuCl}_2$ were accumulated in MM lesions. Histopathologic analysis of the immuno-PET-positive lesions revealed the presence of plasma cell infiltrates within the bone marrow.

Conclusions: ^{64}Cu -labeled anti-CD138 antibody can detect subcutaneous MM tumors and bone marrow lesions with high sensitivity, outperforming ^{18}F -FDG-PET and $^{64}\text{CuCl}_2$ in this preclinical model. These data support ^{64}Cu -anti-CD138 antibody as a specific and promising new imaging radiopharmaceutical agent in MM.

INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a hematological neoplasm characterized by the clonal proliferation of malignant plasma cells in the bone marrow [1]. It is a rare disease that accounts for approximately 15% of hematological malignancies and results in a diffuse infiltration of the bone marrow, focal bone lesions and extra-medullary lesions. Over the past two decades, advances have been made with regard to the diagnosis, staging, treatment and imaging of MM [1, 2]. Magnetic resonance imaging (MRI) is currently recommended as the most effective imaging for MM at diagnosis [2]. Positron emission tomography (PET) combined with computed tomography using [18F] Fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG) is still being evaluated for initial staging and therapeutic monitoring in this pathology and its place needs to be validated [3, 4]. However, ¹⁸F-FDG being a non-tumor-specific metabolic tracer, development of phenotype tumor PET imaging is an attractive novel option to improve tumor characterization by targeting biomarkers expressed by neoplasm's cells [5]. The combination of PET with monoclonal antibodies (mAbs), combining the high sensitivity and resolution of a PET camera with the specificity of a mAb allows the production of a specific imaging, called immuno-PET [6]. In MM, among the targeted antigens, CD138 or syndecan-1 is a cell surface proteoglycan that plays an important role in regulating cell signaling [7]. It is expressed by viable MM cells in the bone marrow and peripheral blood as well as differentiated plasma cells [8] and is currently used as a standard marker in many laboratories for the identification and purification of myeloma cells. CD138 PET imaging may thus specifically image MM lesions. Moreover, Phase I-II studies have been initiated with an antiCD138mAb [9, 10] and stronger response might be obtained by conjugating antiCD138mAb with radioisotopes, as previously demonstrated with radiolabeled antiCD20mAb in lymphoma [11]. Besides, based on the evidence that the human copper transporter 1 (CTR1) is overexpressed in neoplastic tissues, ⁶⁴CuCl₂ has been reported as a promising PET probe for imaging a variety of cancers such as prostate cancer and melanoma [12–14].

Here, we report preclinical PET imaging of CD138 in a subcutaneous and bone marrow disseminated mouse model of orthotopic syngeneic MM (C57BL / KaLwRij and 5T33 cells) using Copper-64 labeled mCD138-specific 9E7.4 antibody (⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4) compared to ¹⁸F-FDG-PET, bioluminescence imaging and ⁶⁴CuCl₂ imaging both as a control of potential copper release by the chelator agent and as a molecular imaging probe.

RESULTS

Ex vivo biodistribution experiments

Ex vivo biodistribution results are presented in Figure 1. On the study conducted 24h after administration of

⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 (Figure 1A and 1B) in a subcutaneous model of MM, the highest accumulation was observed in tumors compared to all other samples collected ($12.82 \pm 6.09\%$ injected dose per gram [%ID/g] at 24h post injection (PI)) with high tumor-to-blood ratios (4.08 ± 1.9 at 24 h PI). ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 displayed rapid blood clearance as determined by the radioactivity remaining in the blood at 24 h PI ($3.47 \pm 1.28\%$ ID/g). The radioimmunoconjugate also showed low muscle uptake of $0.49 \pm 0.03\%$ ID/g at 24 h PI. Relative high uptakes of ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 was found in several normal organs such as liver ($9.04 \pm 0.36\%$ ID/g at 24 h PI) and spleen ($6.46 \pm 2.99\%$ ID/g at 24 h PI). All other organs displayed activity concentrations of 5%ID/g or less at 24 h PI. As a control of specificity of the ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4, biodistribution experiments at 24 h PI of ⁶⁴Cu-TE2A-IgG2ak Isotope was performed (Figure 1C and 1D). It showed persistent high activity in the blood ($9.26 \pm 0.75\%$ ID/g at 24 h PI) and relative high uptakes in several normal organs including tumors ($6.53 \pm 1.14\%$ ID/g at 24 h PI) resulting in very poor tumor-to-blood ratios (0.71 ± 0.15 at 24 h PI).

Biodistribution of ⁶⁴CuCl₂ was determined at 2h and 24h after injection (Figure 1E and 1F). ⁶⁴CuCl₂ displayed rapid yet modest accumulation in the tumors ($7.47 \pm 2.52\%$ ID/g at 2 h PI) which slightly decreased over time ($2.87 \pm 0.32\%$ ID/g at 24 h PI). ⁶⁴CuCl₂ showed significant blood clearance from 2 h PI ($3.9 \pm 0.28\%$ ID/g) to 24h PI ($1.43 \pm 0.29\%$ ID/g), resulting in stable tumor-to-blood ratios (1.88 ± 0.59 at 2 h PI and 2.05 ± 0.34 at 24h PI). Relative high uptakes of ⁶⁴CuCl₂ was observed in non-target organs such as liver, kidney, lung, gut and stomach. Except for the liver ($19.45 \pm 2.47\%$ ID/g at 2 h PI; $13.48 \pm 1.13\%$ ID/g at 24 h PI) and kidney ($24.40 \pm 2.12\%$ ID/g at 2h PI; $9.73 \pm 0.76\%$ ID/g at 24h PI), these high uptakes clearly decreased at 24 h PI.

PET imaging of subcutaneous tumor

PET imaging experiments (Figure 2) confirmed biodistribution observations and helped to visualize *in vivo* distributions of ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4 and ⁶⁴CuCl₂ over time. Data plotted in Figure 2E were consistent with the biodistribution data (Figure 1). For ⁶⁴Cu-TE2A-9E7.4, PET images illustrated the progressive selective targeting of SC tumors (and lymph node for Mouse 2), which increased from 2 h PI to 24 h PI while a concomitant decrease in blood and bone (predominant on the last lumbar vertebrae, the sacroiliac, coxo-femoral joints and knees) activity was observed (Figures 2A and 2B). Intense liver uptake and moderate to intense digestive uptake were also visible at 2 h PI, which decreased at 24 h PI.

On PET images obtained after ⁶⁴CuCl₂ injection, SC tumors were clearly visible at both times yet with modest accumulation (Figures 2C and 2D). Moreover radioactivity and contrast decreased between 2 h and 24 h PI. High liver, kidney and intestines uptakes were observed at all the time points.

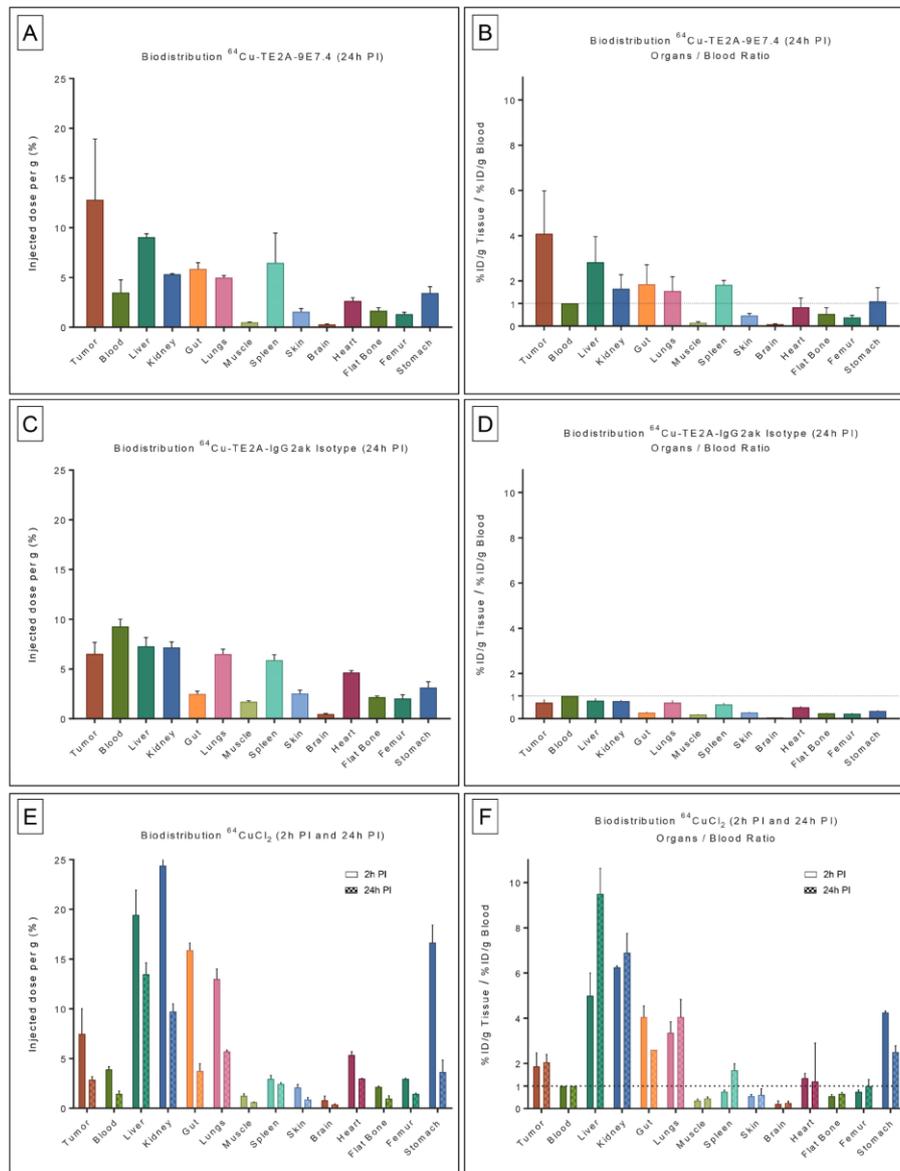


Figure 1: Biodistribution results and organ-to-blood ratios of $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$, $^{64}\text{Cu-TE2A-IgG2a}$ k Isotype and $^{64}\text{CuCl}_2$ in tumor-bearing mice. *Ex vivo* biodistribution results (A) and organ-to-blood ratios (B) of $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ at 24 h post-injection (PI), in the subcutaneous tumor model ($n = 3$). *Ex vivo* biodistribution results (C) and organ-to-blood ratios (D) of $^{64}\text{Cu-TE2A-IgG2a}$ k Isotype at 24 h PI ($n = 3$). *Ex vivo* biodistribution results (E) and organ-to-blood ratios (F) of $^{64}\text{CuCl}_2$ at 2 h and 24 h PI ($n = 3$ for each group). Values are expressed in percentage of the injected radioactive dose per gram of tissue (%ID/g) and presented as mean \pm SD.

Comparison between quantification analysis of PET images obtained after 24 h PI of $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ and $^{64}\text{CuCl}_2$ showed net higher uptake in tumors for the first probe (9.5 ± 4.5 vs 2.32 ± 0.45 respectively for $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ and $^{64}\text{CuCl}_2$ at 24 h PI; $p = 0.0286$; non-parametric test) (Figure 2E).

Digital autoradiography

Digital autoradiography acquisitions were performed on SC tumors of Mice 1 and 7, respectively imaged with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ and $^{64}\text{CuCl}_2$ (Figure 3). Firstly, tumor section obtained with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ revealed a high heterogeneity in the distribution of the vector. Secondly, measurement of counts/mm² found a significant difference (583.3 ± 54.3 vs 3277 ± 316.6 respectively for $^{64}\text{CuCl}_2$ and $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$; $p = 0.0008$; non-parametric test) between $^{64}\text{CuCl}_2$ and $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ signals reflecting the observed excellent uptake.

PET imaging of disseminated disease

To establish a model of disseminated disease, mice were injected intravenously and the distribution was serially assessed using bioluminescence. Mice injected IV developed lesions in the skull, spine, sacrum and members (Supplementary Table 1).

The conventional $^{18}\text{F-FDG}$ -PET images were performed 1h PI and showed typical $^{18}\text{F-FDG}$ distribution in brain, heart, muscles and intestines (Figure 4B). Except for skull lesions, the uptake correlated with the bioluminescence images for all lesions yet with limited uptake in the tumors (Figure 4, Figure 5 and Supplementary Table 1).

PET imaging with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ was performed 2h and 24h PI. Besides the physiological uptakes also observed in the SC model, bone and lymph node metastases were easily distinguished with excellent tumor-to-background ratios. Supplementary Table 1 shows the

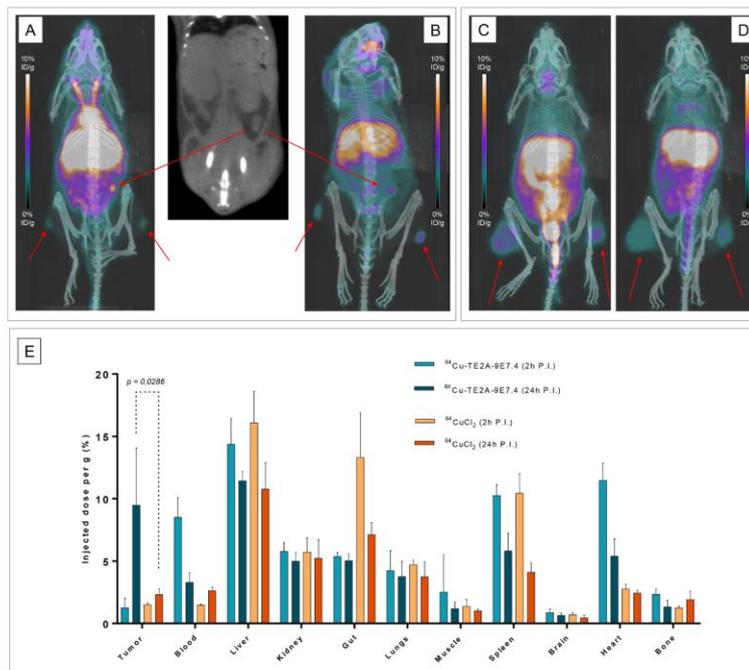


Figure 2: PET imaging and quantification with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ and $^{64}\text{CuCl}_2$ in tumor-bearing mice. Maximum intensity projections of PET and CT imaging at 2 h post-injection (PI) (A) and at 24 h PI (B) of Mouse 2 showing uptakes in both subcutaneous tumors and of an iliac lymph node (Tumors are indicated by arrows). Maximum intensity projections of PET and CT imaging with $^{64}\text{CuCl}_2$ at 2 h PI (C) and at 24 h PI (D) of Mouse 8 showing uptakes in both subcutaneous tumors. PET quantification of tumors and majors organs at 2 h and 24 h PI (E) of $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ and $^{64}\text{CuCl}_2$ ($n = 3$ for each group). Values are expressed in percentage of the injected radioactive dose per gram of tissue (%ID/g) and presented as mean \pm SD. Comparison between quantification analysis of PET images obtained after 24 h PI of $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ and $^{64}\text{CuCl}_2$ showed net higher uptake in tumors for the first probe (9.5 ± 4.5 vs 2.32 ± 0.45 respectively for $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ and $^{64}\text{CuCl}_2$ at 24 h PI; $p = 0.0286$; non-parametric test).

lesion territories for each imaging method. Imaging with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ was able to detect all the lesions and lymph nodes observed with bioluminescence imaging except for the skull lesions of Mice 13, 14 and 15 and was also able to detect skull infringement of the Mouse 16 (Figure 4), undistinguishable on $^{18}\text{F-FDG-PET}$ images. Higher contrast was observed at 24h PI compared to the images realized at 2 h PI.

PET imaging with $^{64}\text{CuCl}_2$ was performed 2h and 24h PI. Similarly to PET imaging in the SC tumor-bearing mice, high liver and kidney uptakes were also observed at all time points. For Mouse 18, skull infiltration was clearly visible at 2 h and 24 h PI yet with lesser contrast than on $^{18}\text{F-FDG-PET}$ images (Figure 6). Besides, no tumor was individualized in Mouse 19 (Figure 7).

Histology

The SC 5T33-Luc(+) tumors of Mice 1 and 7 and both femurs of Mouse 13 were collected for morphological

analysis. Analysis of SC tumors showed numerous large and atypical plasma cells. Figure 5 presented the morphological analysis of the femurs of Mouse 13. A rich normal bone marrow was observed in the femur considered as negative on the PET images with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$. The femur considered as positive on PET images with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ showed a substantially normal bone marrow surrounded by two cellular infiltrates with morphologies and characteristics similar to SC tumor's analysis.

DISCUSSION

Benefiting of major technological advances, molecular characterization of tumors has helped highlight biomarkers, useful in identifying cancer cells and understanding the variability of response to therapeutic agents. These biomarkers can also be used as targets and have thus enabled the development of more specific targeted therapies [15]. In medical practice,

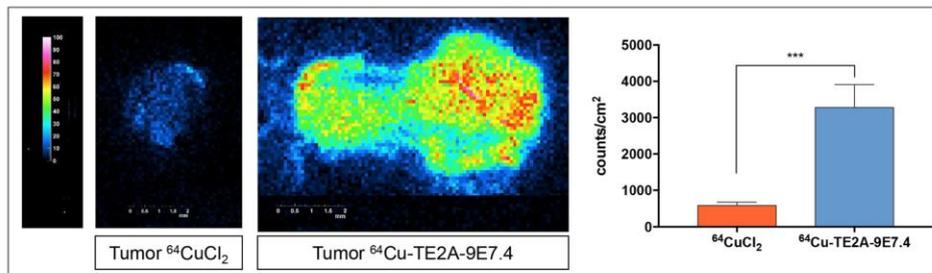


Figure 3: Digital autoradiography acquisitions performed on subcutaneous tumors of Mice 1 and 7, respectively imaged with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ and $^{64}\text{CuCl}_2$. Measurement of counts/mm² found a significant difference (non-parametric test) between $^{64}\text{CuCl}_2$ and $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ signals.

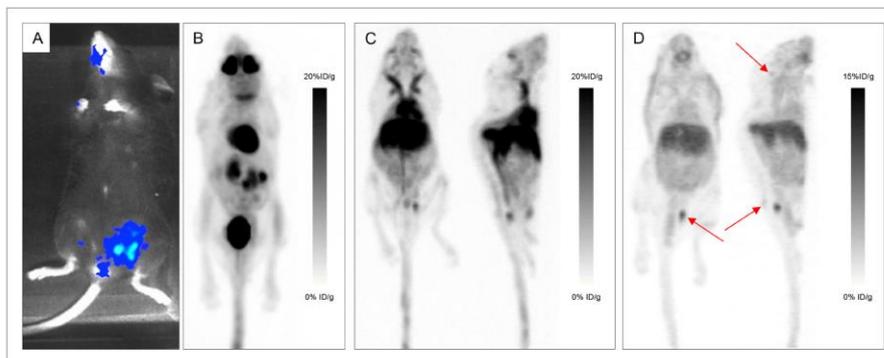


Figure 4: Various explorations conducted in Mouse 14. Bioluminescence imaging (A), maximum intensity projections of $^{18}\text{F-FDG-PET}$ and CT imaging (B), maximum intensity projections of PET and CT imaging with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ at 2h post-injection (PI) (C) and 24 h PI (D) showing uptakes in the skull, sacrum and left iliac wing (Tumors are indicated by arrows).

the identification of these biomarkers slowly but surely becomes a prerequisite before any treatment decision, leading to the concept of personalized medicine. Immuno-PET perfectly fits with this approach. Indeed, mAbs labeled with radionuclides represent promising probes for theranostic approaches, offering a non-invasive solution to assess *in vivo* target expression and distribution and to obtain reliable diagnostic, prognostic and therapeutic information [6]. MM appears to be a good candidate for this type of imaging. Although recent data from the literature suggest that ^{18}F -FDG-PET is a promising technique for the assessment of MM with a strong

prognostic value at diagnosis, developing a more specific radiopharmaceutical for this pathology seems relevant [16]. Besides, based on the evidence that copper is known to be critical for cell proliferation, angiogenesis, and tumor growth [17], and that increased copper ions were detected in cancer tissues [18], $^{64}\text{CuCl}_2$ has been reported as a promising PET probe for imaging a variety of cancers [12–14, 19–22]. Interestingly, MM might again be a good candidate as a copper-chelator, ATN-224, was shown to induce programmed cell death in multiple myeloma cells emphasizing the essential role of the Copper ion in this pathology [23]. Our study demonstrates for the first time

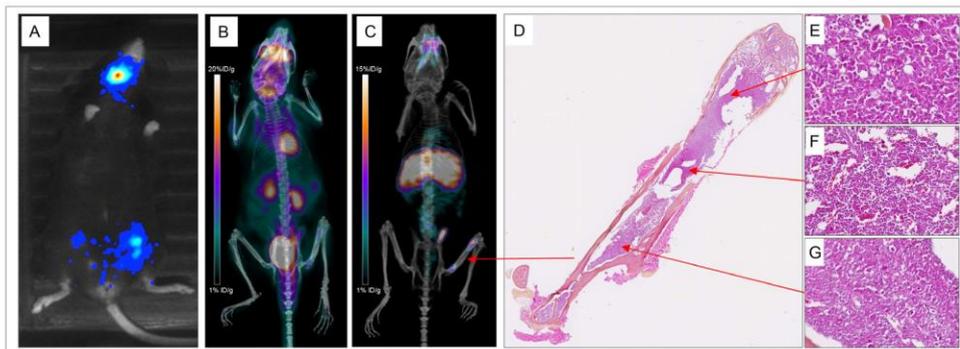


Figure 5: Various explorations conducted in Mouse 13. Bioluminescence imaging (A), maximum intensity projections of ^{18}F -FDG-PET and CT (B), maximum intensity projections of PET and CT imaging with ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 at 24 h post-injection (C) and histological analysis of the left femur stained with hematoxylin-Phoxine-Safran (D) showing a substantially normal bone marrow (F) surrounded by two plasma cell infiltrates (E and G).

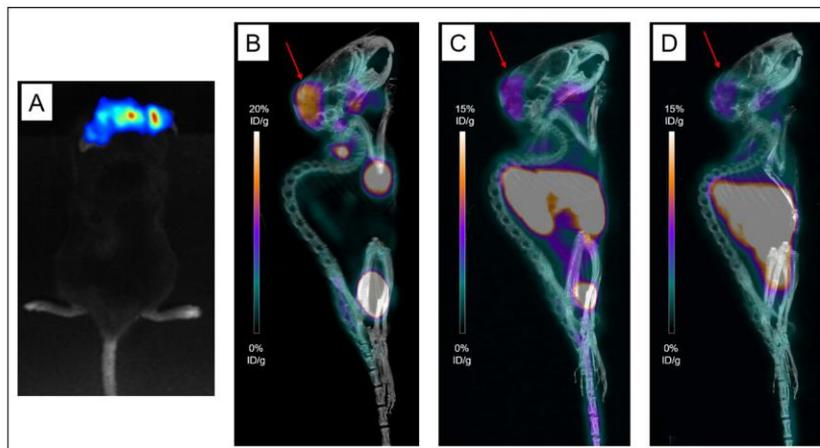


Figure 6: Various explorations conducted in Mouse 18. Bioluminescence imaging (A), maximum intensity projections of ^{18}F -FDG-PET and CT imaging (B), maximum intensity projections of PET and CT imaging with $^{64}\text{CuCl}_2$ at 2h post-injection (PI) (C) and 24 h PI (D) showing uptakes in the skull (Tumors are indicated by arrows).

the efficiency of anti-CD138 immuno-PET and $^{64}\text{CuCl}_2$ to detect MM lesions in a preclinical model.

The present work demonstrated the high targeted-tumor uptake of $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ in MM tumor-bearing mice. Based on our experience with the B-B4 mAb [24, 25], our group had developed this rat anti-mouse syndecan mAb (9E7.4, IgG2a κ isotype) that specifically recognizes the extracellular domain of mouse syndecan-1 [26]. This study showed that $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ binds effectively to CD138 tumors and allows MM imaging in a syngeneic mouse model with high contrast. Moreover, specificity of the observed *in vivo* tumor uptake was validated by the $^{64}\text{Cu-TE2A-IgG2ak}$ Isotype control antibody biodistributions. With this latter, relative low tumor uptake, poor tumor-to-blood ratio and uniform distribution were observed likely due to the non-specific enhanced permeability and retention effect (EPR) [27, 28]. The biodistribution data with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$, in general, agreed well with the small animal PET quantification results and showed, as it is typical for radioimmunoconjugates, that the optimal time point for high-contrast imaging of tumors with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ appears better at 24 h than 2 h PI. This corresponded to the time necessary for the distribution of the antibody to the targeted tissues and clearance of non-targeted tissues allowing for a satisfactory contrast. At 24 h PI, relative high uptakes of $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ was still found in several normal organs such as liver, spleen, kidneys and the digestive tract. These could be attributed (i) to hepatobiliary clearance of the radiotracer and its associated immune-complexes, (ii) the endogenous expression of CD138 by the microvilli of the basal membranes of hepatocytes and/or (iii) potential *in vivo* trans-chelation of ^{64}Cu from TE2A by hepatic enzymes even if TE2A has previously demonstrated high *in vivo* kinetic stability as a chelator for $^{64}\text{Cu}^{2+}$ ion. This liver uptake could greatly hamper the interpretation of PET images with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ yet hepatic involvement is rare in multiple myeloma.

In spite of this background distribution, $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ achieved higher resolutions' contrasts than $^{18}\text{F-FDG-PET}$. Indeed, despite precautions taken in terms of anesthesia and warming to reduce cellular metabolism [29], $^{18}\text{F-FDG-PET}$ showed significantly more non-specific bindings and persistence of a high background noise explained by residual metabolic radioactivity. This good performance is particularly emphasized by the results of the disseminated model. Indeed, in the literature, the widespread use of subcutaneous xenograft models usually allows for easy assessment of tumor burden. An important drawback to the use of syngeneic and orthotopic tumor model would be the signal observed from organs of clearance such as the liver and kidneys that may conceal disseminated tumors. Moreover, the use of a syngeneic model provides access to the true distribution of the vector, whether it is linked to the epitopic mapping on the whole animal or to the fixation due to the Fc fragment. Yet, in the present work, as shown in Figure 5, $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ images showed excellent tumor contrast for disseminated lesions' detection. These data support $^{64}\text{Cu-anti-CD138}$ antibody as a promising imaging tool. As previously stated, CD138 is expressed at high levels in MM tumors and is a key regulator in the disease [7]. High levels of CD138 in patient serum are associated with poor prognosis in MM disease progression [30]. In the past several years, our group has proven anti-CD138 radioimmunotherapy (RIT) and α RIT to be effective in an immuno-competent preclinical MM model [24, 31]. Moreover, Phase I-II studies have been initiated with an antiCD138 mAb [9, 10]. Thus, a specific radiotracer targeting CD138 may have advantages for visualizing and monitoring the disease or as a companion diagnostic imaging tool available for selecting patients and predicting or monitoring response to CD138-targeted therapies.

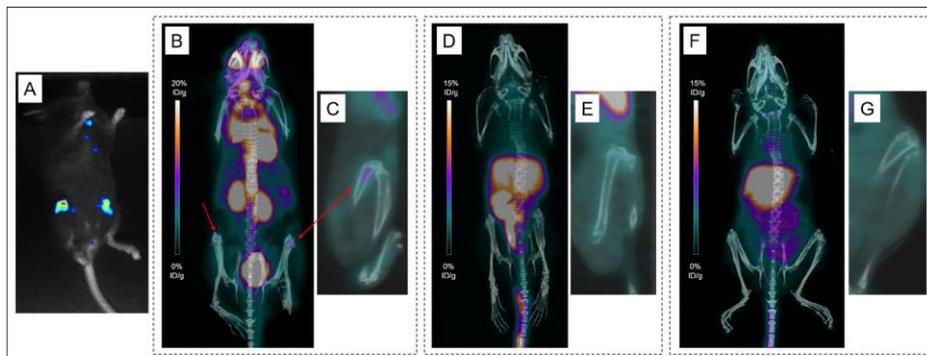


Figure 7: Various explorations conducted in Mouse 19. Bioluminescence imaging (A) and maximum intensity projections of $^{18}\text{F-FDG-PET}$ and CT imaging (B), showing uptakes in both femurs (Tumors are indicated by arrows). No significant uptake seen on maximum intensity projections of PET and CT imaging with $^{64}\text{CuCl}_2$ at 2 h post-injection (PI) (D) and 24 h PI (F). Representative sagittal images of the left femur on PET imaging (C, E, G).

In our work, ^{64}Cu was chosen among the positron-emitting radioelements compatible with the biodistribution of a complete mAb. On the one hand, for its intrinsic resolution, better than Iodine-124, and on the other hand, with regard to biological behaviors and distributions of free dissociated radionuclides. Indeed, even if Zirconium-89 is a good candidate for labeled antibodies [32], uncomplexed Zirconium-89 localizes in the bone and could potentially represent a problem in the case of MM phenotypic imaging [33]. Moreover, several previous studies that have examined the use of antibodies coupled to ^{64}Cu for PET with success [13, 19, 34]. Nevertheless, the main difficulty of this radionuclide is the need for stable chelation for binding the radioisotope to the carrier biomolecule [20, 35]. Biological media are in fact rich in metal cations, chelating proteins and reducing enzymes, competing with the chelator and causing dissociation of the complex copper-chelator. Furthermore, the relatively high tumor uptake of ^{64}Cu in different types of human tumor tissue implies that use of unstable ^{64}Cu -labeled PET tracers may result in non-specific tumor uptake [20]. Thus, in a recent study, Roosenburg et al have shown that depending on the type of chelator used for coupling the antibody with ^{64}Cu , biodistribution profiles were not the same [34]. Strong absorption by the liver and other organs such as the intestines were reported because of the low *in vivo* stability of the various chelators. In our study, a DOTA derivative, TE2A was used as a chelating agent [36]. Its macrocyclic structure seems more suitable to the *in vivo* stabilization of copper. In this study, $^{64}\text{CuCl}_2$ imaging was thus initially performed as a control of this potential copper release by the chelating agent.

Moreover, it has been recently demonstrated that ^{64}Cu in its ionic form can directly be used as a probe for PET imaging of various types of cancers [13]. This study is the first report, to our knowledge, which explores the potential of $^{64}\text{CuCl}_2$ for imaging in MM. The results of the biodistribution and PET quantification studies revealed significant uptake of $^{64}\text{CuCl}_2$ in MM tumors. $^{64}\text{CuCl}_2$ displayed rapid accumulation in the SC MM tumors which slightly decreased over time. $^{64}\text{CuCl}_2$ has previously been reported to accumulate in various mouse models of cancers such as melanoma, colorectal cancer, prostate cancer, with heterogeneous uptake values or kinetics [12–14, 19–22]. Tumor uptake of $^{64}\text{CuCl}_2$ is indeed expected to be variable based on the profile of various copper transporters, chaperons, and copper binding molecules and not simply depending on the expression level of hCtr1, supported by the findings from other investigators [14, 20]. With an uptake of $7.47 \pm 2.52\%$ ID/g at 2h PI, the performance of $^{64}\text{CuCl}_2$ in our study looks similar to experiments in the mouse melanoma xenografts reported previously [12, 37]. Relative high uptake of $^{64}\text{CuCl}_2$ was also observed in non-target organs such as liver, kidney, lung, gut and stomach. These results are in agreement with precedent findings of the literature [13]. Nevertheless, the

performance of $^{64}\text{CuCl}_2$ in the disseminated model finally showed its greatest limitation as it might not be suitable for detection of disseminated metastases. Indeed, even though most tissues (such as bones and brain) showed relatively low uptake of $^{64}\text{CuCl}_2$, tumor-to-blood ratios and thus contrast remained poor with lower performances than ^{18}F -FDG-PET. Thereby, albeit exploring copper metabolism as an imaging biomarker in MM seemed attractive, $^{64}\text{CuCl}_2$ can't directly be used as an effective probe for non-invasive visualization of tumors. All the opposite of ^{64}Cu -TE2A-9E7.4. To further investigate the uptake of $^{64}\text{CuCl}_2$ and compare it to ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 more completely, additional autoradiography studies were conducted in SC tumors. The digital autoradiography date showed a higher and significant accumulation with ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 than with $^{64}\text{CuCl}_2$, confirming the specificity of this radioimmunoconjugate and its high uptake *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and cultures

The 5T33 murine MM cell line was kindly provided by Dr. Harvey Turner (Nuclear Medicine Service, Fremantle Hospital, Western Australia) with the permission of Dr. Jiri Radl (TNO Institute, Leiden, Netherlands) [38]. Cells were transfected with luciferase cDNA as previously described [25]. 5T33-Luc(+) were cultured in RPMI1640 medium (Gibco, Saint Aubin, France) containing 2 mM L-glutamine and 10% heat-inactivated fetal calf serum (PAA Laboratories / GE Healthcare Europe GmbH) at 37°C, 5% CO_2 , 95% humidity.

9E7.4 antibody

The 9E7.4 mAb was produced by immunization of a rat with a 40-amino-acid peptide (GeneCust, Luxembourg) derived from the murine CD138 protein (aa 90–130) (GenBank: CAA80254.1). Its characterization was ensured within the team as previously described [26]. The isotype of this antibody is IgG2a, κ , and its binding specificity was around 1×10^{-10} M.

Rat IgG2ak isotype control

The Rat IgG2ak antibody (R&D Systems; ref 54447) was chosen as an isotype control. This latter is suitable for use as a negative control to assess non-specific binding of Rat IgG2ak antibodies to mouse cells.

Animal model: subcutaneous tumor model and IV disseminated tumor model

Female C57BL/KalwRij mice were purchased from Envigo and housed under conventional conditions at the Experimental Therapeutic Unit animal facility

(SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes, license number: B-44-278). Experiments were approved by the local veterinary committee (reference 00143.01) and carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Mice were 17 weeks old at the time of experiments.

Twelve mice were grafted subcutaneously (SC) with 2.10^6 5T33-Luc(+) cells suspended in 100 μ L of PBS 20 days before the first PET images on both legs. Tumors were grown to a size of 0.3-0.8 cm in diameter.

MM has a high likelihood of disseminating to the bones. For the experimental disseminated model, 1.10^6 5T33-Luc(+) cells were suspended in 100 μ L of PBS and injected via tail vein into 8 mice, 34 days before the first PET images. Mice were monitored for bone marrow lesions by bioluminescence imaging over 33 days.

Bioluminescence imaging

Mice were serially imaged using bioluminescence imaging as previously described [24] to identify, to locate and to follow tumor progression.

The mice were anesthetized with intraperitoneal injection of 100 μ L/10g of an anesthetic solution (consisting of 1 mL ketamine at 100 mg/mL (Panpharma); 0.5 mL xylazine at 20 mg/mL (Bayer); and 8.5 mL PBS). Mice were injected intraperitoneally with 100 μ L luciferin (Interchim, 12 mg/mL) 5 min before being imaged. Mice were imaged in ventral and dorsal positions using a Photon IMAGER™ (Biospace Lab, Paris, France) for 30 seconds. The images were analyzed using the M3Vision™ software (Biospace Lab, Paris, France).

Labeling and controls with copper-64 (^{64}Cu)

For *in vivo* experiments, three tracers with ^{64}Cu were used: ^{64}Cu -TE2A-9E7.4, ^{64}Cu -TE2A-IgG2a k Isotype and $^{64}\text{CuCl}_2$. Copper-64 ($t_{1/2} = 12.7$ h, β^+ : 17.8%, $E_{\beta^+ \text{ max}} = 656$ keV, β^- : 38.4%, $E_{\beta^- \text{ max}} = 573$ keV) was obtained from the ARRONAX cyclotron (GIP ARRONAX, Saint-Herblain, France) using the reaction ^{64}Ni (p,n) ^{64}Cu and was delivered as $^{64}\text{CuCl}_2$ in HCl 0.1N.

To radiolabel the 9E7.4 and the IgG2a k Isotype mAbs, the antibodies were previously modified using a copper chelating agent called TE2A-benzyl isothiocyanate according to the method previously described [36]. Briefly, mAbs were incubated in a solution of 0.1M of EDTA for 2 hours in order to chelate contaminant metals. EDTA was then removed and mAbs were concentrated at 4 mg/mL in carbonate buffer (0.3 M, pH 8.6) using a disposable Amicon Ultra-4 centrifugal unit (Millipore). For conjugation, the chelating agent TE2A-benzyl isothiocyanate was dissolved at 12 mg/mL and added to the mAbs at a ratio of 20 moles of TE2A to 1 mole of antibody. After an incubation overnight, the excess of

TE2A was removed by a PD-10 disposable gel filtration column (GE Healthcare Life Science) eluted with 0.3 M ammonium acetate (pH 7) fractions of 500 μ L. For radiolabeling, mAbs in 0.3 M ammonium acetate (pH 7) were incubated with a solution of 244 μ L of $^{64}\text{CuCl}_2$ (408 MBq, dissolved in HCl 0.1N) and 60 μ L of 2.5 M ammonium acetate buffer (pH 7.0) for 20 minutes at 40°C. Then 10 μ L of EDTA (pH 7; 10 mM) were added and a further incubation for 5 minutes at 40°C was performed. Radiochemical purity was determined by thin layer chromatography ITLC-SG, using a citrate buffer (pH 4.5; 0.1 M) and was 83%. The immuno-conjugate labeled with ^{64}Cu was thus secondly purified by size exclusion chromatography using a PD-10 column (Sephadex G25, GE Healthcare). The radiochemical purity was finally assessed by ITLC-SG at 100%. At the end of the radiolabeling, the specific activity for ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 was 187 MBq/mg and the specific activity for ^{64}Cu -TE2A-IgG2a k Isotype was 338.7 MBq/mg.

The immunoreactivity of ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 was determined using magnetic beads (Pierce, Thermo Scientific) labeled with a 40 amino acids peptide recognized by the 9E7.4 antibody according to the supplier's protocol. One picomole of ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 was incubated 1 hour at room temperature with 20 μ L of coated magnetic beads (10 mg/mL). Using a magnetic rack, supernatants containing non-reactive antibodies and magnetic beads were collected separately. The radioactivity in each fraction was measured in a gamma counter as previously described by Halime et al [36]. The radiolabeling yield and specific activity post-purification of the bioconjugate were $95 \pm 2.8\%$ and 188 ± 27 MBq mg^{-1} respectively and its immunoreactivity was $81 \pm 7\%$.

PET imaging

For the SC model, 3 mice were imaged with ^{18}F -FDG-PET and ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 (Mice 1 to 3), 3 with ^{18}F -FDG-PET and ^{64}Cu -TE2A-IgG2a k Isotype (Mice 4 to 6) and 6 with ^{18}F -FDG-PET and $^{64}\text{CuCl}_2$ (Mice 7 to 12).

For the disseminated model, 5 mice were imaged with ^{18}F -FDG-PET and ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 (Mice 13 to 17) and 3 mice with ^{18}F -FDG-PET and $^{64}\text{CuCl}_2$ (Mice 18 to 20).

For ^{18}F -FDG-PET imaging, mice were fasted overnight (6h to 12h) with free access to water. Mice were warmed for at least one hour, anesthetized with inhaled isoflurane 5%, and intravenously injected with 10 MBq of ^{18}F -FDG in a volume of 100 μ L through the lateral tail vein. Mice were maintained under anesthesia for a 1h uptake period and then scanned (350–650 keV energy window, 20 min listmode acquisition, 3D rebinning followed by OSEM-MAP reconstruction) on a multi-modality preclinical imaging system (Inveon™, Siemens Healthcare). CT acquisitions (80 kV, 0.5 mA) were also

performed immediately before the PET imaging. The reconstructed PET images were analyzed using Inveon Research Workplace (Siemens Healthcare). Manually drawn 3-dimensional volumes-of-interest (VOIs) were used to determine tissue uptake values on decay-corrected whole-body coronal images. By assuming a tissue density of 1 g/mL, the VOIs were converted to percentage of the injected radioactive dose per gram of tissue (% ID/g).

For ^{64}Cu PET studies, similar procedures were followed 24h post- ^{18}F -FDG-PET imaging, except that no fasting was performed and imaging occurred at 2h and 24 h PI. Each mouse was intravenously injected with 10 MBq of radiotracer (^{64}Cu -TE2A-9E7.4 or ^{64}Cu -TE2A-IgG2a k Isotype or $^{64}\text{CuCl}_2$) in a volume of 100 μL via the lateral tail vein. According to the ^{64}Cu decay, the specific activity at the injection time was between 140 MBq/mg and 170 MBq/mg for ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 and between 320 MBq/mg and 335 MBq/mg for ^{64}Cu -TE2A-IgG2a k Isotype.

Biodistribution study

Tracer biodistribution studies were carried out in all the SC-tumor-bearing mice after PET imaging ($n = 3$ for each group): at 24 h PI for ^{64}Cu -TE2A-9E7.4, at 24 h PI for ^{64}Cu -TE2A-IgG2a k Isotype and at 2 h and 24 h PI for $^{64}\text{CuCl}_2$. Tumor, blood, and other selected tissues (liver, kidney, gut, lungs, muscle, spleen, skin, brain, heart, flat bone, femur, and stomach) were dissected, weighed and counted on a calibrated and normalized gamma-counter. For each organ, the percentage of injected dose per gram (% ID / g) was calculated. The organ to blood ratios were also compared.

Histology and digital autoradiography of tumors

SC tumors of Mice 1 and 7 were removed, fast-frozen in cold 2-methylbutane solution, embedded in optimal-cutting temperature compound, and cut into 10 μm sections using a cryomicrotome (CM3050 Leica Biosystems®). Sections were mounted on Superfrost™ slides and digital autoradiography images were obtained on a Beaver® imager (Ai4R, Nantes, France). Image analysis was performed on the dedicated software Beamage® (Ai4R, Nantes, France). Adjacent 10 μm slices were stained with hematoxylin-Phoxine-Safran and scanned using a slide-scanner Nanozoomer (Hamamatsu®).

Both femurs of Mouse 13 were collected, formalin-fixed and decalcified for 48 h (Decalc, Histolab). After paraffin-embedding, femurs were cut into 10 μm sections using a RM2255 microtome. Tissue sections were mounted on Superfrost™ slides. Slices were stained with Hematoxylin-Phoxine-Safran by Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) and scanned using a slide scanner, Nanozoomer Hamamatsu®.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 7.00. Differences in uptake were tested for significance using the non-parametric Mann-Whitney test for two groups. Assessment of sensitivity and accuracy for ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 and ^{18}F -FDG-PET in the disseminated disease model was done using bioluminescence and CT from the PET protocol as a reference. A p value below 0.05 was considered significant.

CONCLUSIONS

The anti-CD138 antibody 9E7.4 conjugate to TE2A, radiolabeled with ^{64}Cu , showed specific binding to CD138 *in vivo*. Immuno-PET data demonstrated that this radioimmunoconjugate can be used for noninvasive imaging of CD138 expression in MM and has high tumor-to-background tissue contrast, superior to ^{18}F -FDG-PET. On the opposite, the potential of $^{64}\text{CuCl}_2$ as a radiotracer for PET imaging of MM remains uncertain. These data support ^{64}Cu -anti-CD138 antibody as a promising imaging tool for selecting patients before antibody-based therapy and RIT in particular. Future optimization studies will include testing CD38 which is expressed at lower levels in the liver than CD138, as a new target. Smaller vectors such as F(ab')₂ fragments could also offer faster biodistribution and present less catabolism by the liver.

Author contributions

Fourteen authors significantly contributed to this multi-institutional study or to the development of this manuscript: Study design: Clément Bailly, Sébastien Gouard, Michel Chérel, Françoise Kraeber-Bodéré, Caroline Bodet-Milin. Antibody production, Labeling and controls: Sébastien Gouard, Patricia Remaud-Le Saëc, Mickaël Bourgeois, Raphael Tripier, Zakaria Halime, Ferid Haddad, Alain Faivre-Chauvet. Animal model conception: Clément Bailly, Sébastien Gouard, Marie Lacombe. Acquisition of data: Clément Bailly, Sébastien Gouard, Marie Lacombe, Nicolas Chouin, Caroline Bodet-Milin. Analysis and interpretation of PET data: Clément Bailly, Sébastien Gouard, Marie Lacombe, Michel Chérel, Benjamin Chalopin, Caroline Bodet-Milin, Françoise Kraeber-Bodéré. Drafting of the manuscript: Clément Bailly, Sébastien Gouard, Marie Lacombe. Critical revision: Michel Chérel, Caroline Bodet-Milin, Françoise Kraeber-Bodéré.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Catherine Maurel, the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) and specifically Myriam Robard and Stephanie Blandin for their help.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflicts of interest.

FUNDING

This work has been supported in part by grants from the French National Agency for Research, called “Investissements d’Avenir” IRON Labex n° ANR-11-LABX-0018-01, IGO Labex n° ANR-11-LABX-0016-01), DHU Oncogreff and ArronaxPlus Equipex n° ANR-11-EQPX-0004.

REFERENCES

1. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *The Lancet*. 2015; 385:2197–208. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60493-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60493-1).
2. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass J, Kastritis E, Richardson P, Landgren O, Paiva B, Dispenzieri A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014; 15:e538–548. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5).
3. Terpos E, Dimopoulos MA, Mouloupoulos LA. The Role of Imaging in the Treatment of Patients With Multiple Myeloma in 2016. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016; 35:e407–417. https://doi.org/10.14694/EDBK_159074.
4. Bailly C, Leforestier R, Jamet B, Carlier T, Bourgeois M, Guérard F, Touzeau C, Moreau P, Chérel M, Kraeber-Bodéré F, Bodet-Milin C. PET Imaging for Initial Staging and Therapy Assessment in Multiple Myeloma Patients. *Int J Mol Sci*. 2017; 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18020445>.
5. Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:683–93. <https://doi.org/10.1038/nrc882>.
6. Kraeber-Bodéré F, Rousseau C, Bodet-Milin C, Mathieu C, Guérard F, Frampas E, Carlier T, Chouin N, Haddad F, Chatal JF, Faivre-Chauvet A, Chérel M, Barbet J. Tumor immunotargeting using innovative radionuclides. *Int J Mol Sci*. 2015; 16:3932–54. <https://doi.org/10.3390/ijms16023932>.
7. Sanderson RD, Yang Y. Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment. *Clin Exp Metastasis*. 2008; 25:149–59. <https://doi.org/10.1007/s10585-007-9125-3>.
8. Witzig TE, Kimlinger T, Stenson M, Therneau T. Syndecan-1 expression on malignant cells from the blood and marrow of patients with plasma cell proliferative disorders and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1998; 31:167–75. <https://doi.org/10.3109/10428199809057596>.
9. Heffner LT, Jagannath S, Zimmerman TM, Lee KP, Rosenblatt J, Lonial S, Lutz RJ, Czeloth N, Osterroth F, Rühle M, Beelitz MA, Wartenberg-Demand A, Haeder T, et al. BT062, an Antibody-Drug Conjugate Directed Against CD138, Given Weekly for 3 Weeks in Each 4 Week Cycle: Safety and Further Evidence of Clinical Activity. *Blood*. 2012; 120:4042–4042.
10. Kelly KR, Chanan-Khan A, Somlo G, Heffner LT, Siegel DS, Zimmerman TM, Jagannath S, Munshi NC, Lonial S, Roy V, Rühle M, Chavan S, Patel P, et al. Indatuximab Ravtansine (BT062) In Combination With Lenalidomide and Low-Dose Dexamethasone In Patients With Relapsed and/Or Refractory Multiple Myeloma: Clinical Activity In Len/Dex-Refractory Patients. *Blood*. 2013; 122:758–758.
11. Rizzieri D. Zevalin® (ibritumomab tiuxetan): After more than a decade of treatment experience, what have we learned? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016; 105:5–17. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.07.008>.
12. Jiang L, Tu Y, Hu X, Bao A, Chen H, Ma X, Doyle T, Shi H, Cheng Z. Pilot Study of (64)Cu(I) for PET Imaging of Melanoma. *Sci Rep*. 2017; 7:2574. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02691-3>.
13. Chakravarty R, Chakraborty S, Dash A. (64)Cu(2+) Ions as PET Probe: An Emerging Paradigm in Molecular Imaging of Cancer. *Mol Pharm*. 2016; 13:3601–12. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00582>.
14. Cai H, Wu J, Muzik O, Hsieh JT, Lee RJ, Peng F. Reduced 64Cu Uptake and Tumor Growth Inhibition by Knockdown of Human Copper Transporter 1 in Xenograft Mouse Model of Prostate Cancer. *J Nucl Med*. 2014; 55:622–8. <https://doi.org/10.2967/jnumed.113.126979>.
15. Pysz MA, Gambhir SS, Willmann JK. Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clin Radiol*. 2010; 65:500–16. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2010.03.011>.
16. Vij R, Fowler KJ, Shokeen M. New Approaches to Molecular Imaging of Multiple Myeloma. *J Nucl Med*. 2016; 57:1–4. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.163808>.
17. Turski ML, Thiele DJ. New Roles for Copper Metabolism in Cell Proliferation, Signaling, and Disease. *J Biol Chem*. 2009; 284:717–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800055200>.
18. Margalioth EJ, Schenker JG, Chevion M. Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer*. 1983; 52:868–72.
19. Lopci E, Grassi I, Rubello D, Colletti PM, Cambioli S, Gamboni A, Salvi F, Cicoria G, Lodi F, Dazzi C, Mattioli S, Fanti S. Prognostic Evaluation of Disease Outcome in Solid Tumors Investigated With 64Cu-ATSM PET/CT. *Clin Nucl Med*. 2016; 41:e87–92. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000001017>.
20. Jørgensen JT, Persson M, Madsen J, Kjær A. High tumor uptake of (64)Cu: implications for molecular imaging of tumor characteristics with copper-based PET tracers. *Nucl Med Biol*. 2013; 40:345–50. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2013.01.002>.

21. Peng F, Lu X, Janisse J, Muzik O, Shields AF. PET of Human Prostate Cancer Xenografts in Mice with Increased Uptake of $^{64}\text{CuCl}_2$. *J Nucl Med.* 2006; 47:1649–52.
22. Kim KI, Jang SJ, Park JH, Lee YJ, Lee TS, Woo KS, Park H, Choe JG, An GI, Kang JH. Detection of Increased ^{64}Cu Uptake by Human Copper Transporter 1 Gene Overexpression Using PET with $^{64}\text{CuCl}_2$ in Human Breast Cancer Xenograft Model. *J Nucl Med.* 2014; 55:1692–8. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.141127>.
23. Juarez JC, Betancourt O, Pirie-Shepherd SR, Guan X, Price ML, Shaw DE, Mazar AP, Doñate F. Copper Binding by Tetrathiomolybdate Attenuates Angiogenesis and Tumor Cell Proliferation through the Inhibition of Superoxide Dismutase 1. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4974–82. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0171>.
24. Chérel M, Gouard S, Gaschet J, Saï-Maurel C, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Bourgeois M, Gestin JF, Bodéré FK, Barbet J, Moreau P, Davodeau F. ^{213}Bi radioimmunotherapy with an anti-mCD138 monoclonal antibody in a murine model of multiple myeloma. *J Nucl Med.* 2013; 54:1597–604. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.111997>.
25. Gouard S, Pallardy A, Gaschet J, Faivre-Chauvet A, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Maurel C, Matous E, Kraeber-Bodéré F, Davodeau F, Chérel M. Comparative analysis of multiple myeloma treatment by CD138 antigen targeting with bismuth-213 and Melphalan chemotherapy. *Nucl Med Biol.* 2014; 41:e30–35. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.02.008>.
26. Fichou N, Gouard S, Maurel C, Barbet J, Ferrer L, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Faivre-Chauvet A, Bigot-Corbel E, Davodeau F, Gaschet J, Chérel M. Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model. *Front Med (Lausanne).* 2015; 2:76. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00076>.
27. Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63:136–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009>.
28. Heneweer C, Holland JP, Divilov V, Carlin S, Lewis JS. Magnitude of enhanced permeability and retention effect in tumors with different phenotypes: ^{89}Zr -albumin as a model system. *J Nucl Med.* 2011; 52:625–33. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.083998>.
29. Woo SK, Lee TS, Kim KM, Kim JY, Jung JH, Kang JH, Cheon GJ, Choi CW, Lim SM. Anesthesia condition for ^{18}F -FDG imaging of lung metastasis tumors using small animal PET. *Nucl Med Biol.* 2008; 35:143–50. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.10.003>.
30. Seidel C, Børset M, Hjertner O, Cao D, Abildgaard N, Hjorth-Hansen H, Sanderson RD, Waage A, Sundan A. High levels of soluble syndecan-1 in myeloma-derived bone marrow: modulation of hepatocyte growth factor activity. *Blood.* 2000; 96:3139–46.
31. Rousseau C, Ferrer L, Supiot S, Bardies M, Davodeau F, Faivre-Chauvet A, Baumgartner P, Wijdenes J, Lacombe M, Barbet J, Guillaume T, Moreau P, Harousseau JL, et al. Dosimetry results suggest feasibility of radioimmunotherapy using anti-CD138 (B-B4) antibody in multiple myeloma patients. *Tumour Biol.* 2012; 33:679–88. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0362-y>.
32. Jauw YW, Menke-van der Houven van Oordt CW, Hoekstra OS, Hendrikse NH, Vugts DJ, Zijlstra JM, Huisman MC, van Dongen GA. Immuno-Positron Emission Tomography with Zirconium-89-Labeled Monoclonal Antibodies in Oncology: What Can We Learn from Initial Clinical Trials? *Front Pharmacol.* 2016; 7:131. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00131>.
33. Abou DS, Ku T, Smith-Jones PM. *In vivo* biodistribution and accumulation of ^{89}Zr in mice. *Nucl Med Biol.* 2011; 38:675–81. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2010.12.011>.
34. Roosenburg S, Laverman P, Joosten L, Cooper MS, Kolenc-Peitel PK, Foster JM, Hudson C, Leyton J, Burnet J, Oyen WJ, Blower PJ, Mather SJ, Boerman OC, et al. PET and SPECT imaging of a radiolabeled minigastrin analogue conjugated with DOTA, NOTA, and NODAGA and labeled with ^{64}Cu , ^{68}Ga , and ^{111}In . *Mol Pharm.* 2014; 11:3930–7. <https://doi.org/10.1021/mp500283k>.
35. Dale AV, Pandya DN, Kim JY, Lee H, Ha YS, Bhatt N, Kim J, Seo JJ, Lee W, Kim SH, Yoon YR, An GI, Yoo J. Non-cross-bridged tetraazamacrocyclic chelator for stable ^{64}Cu -based radiopharmaceuticals. *ACS Med Chem Lett.* 2013; 4:927–31. <https://doi.org/10.1021/ml400142s>.
36. Halime Z, Frindel M, Camus N, Orain PY, Lacombe M, Chérel M, Gestin JF, Faivre-Chauvet A, Tripier R. New synthesis of phenyl-isothiocyanate C-functionalised cyclams. Bioconjugation and ^{64}Cu phenotypic PET imaging studies of multiple myeloma with the te2a derivative. *Org Biomol Chem.* 2015; 13:11302–14. <https://doi.org/10.1039/c5ob01618e>.
37. Chakravarty R, Chakraborty S, Vimalnath KV, Shetty P, Sarma HD, Hassan PA, Dash A. $^{64}\text{CuCl}_2$ produced by direct neutron activation route as a cost-effective probe for cancer imaging: the journey has begun. *RSC Adv.* 2015; 5:91723–33. <https://doi.org/10.1039/C5RA17266G>.
38. Radl J, Croese JW, Zurcher C, Van den Enden-Vieven MH, de Leeuw AM. Animal model of human disease. Multiple myeloma. *Am J Pathol.* 1988; 132:593–7.



Article

What is the Best Radionuclide for Immuno-PET of Multiple Myeloma? A Comparison Study Between ^{89}Zr - and ^{64}Cu -Labeled Anti-CD138 in a Preclinical Syngeneic Model

Clément Bailly ^{1,2,†}, Sébastien Gouard ^{1,†}, François Guérard ¹, Benjamin Chalopin ¹, Thomas Carlier ^{1,2}, Alain Faivre-Chauvet ^{1,2}, Patricia Remaud-Le Saëc ¹, Mickaël Bourgeois ^{1,2,3}, Nicolas Chouin ^{1,4}, Latifa Rbah-Vidal ¹, Raphaël Tripier ⁵, Ferid Haddad ³, Françoise Kraeber-Bodéré ^{1,2,6}, Caroline Bodet-Milin ^{1,2} and Michel Chérel ^{1,3,6,*}

¹ CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, 44093 Nantes, France;

clement.bailly@chu-nantes.fr (C.B.); sebastien.gouard@univ-nantes.fr (S.G.);

francois.guerard@univ-nantes.fr (F.G.); benjamin.chalopin@yahoo.fr (B.C.);

thomas.carlier@chu-nantes.fr (T.C.); alain.faivre-chauvet@univ-nantes.fr (A.F.-C.);

patricia.lesaec@univ-nantes.fr (P.R.-L.S.); mickael.bourgeois@nantes.inserm.fr (M.B.);

nicolas.chouin@oniris-nantes.fr (N.C.); latifa.rbah-vidal@univ-nantes.fr (L.R.-V.);

francoise.bodere@chu-nantes.fr (F.K.-B.); caroline.milin@chu-nantes.fr (C.B.-M.)

² Nuclear Medicine Department, University Hospital, 44093 Nantes, France

³ Groupement d'Intérêt Public Arronax, 44800 Saint-Herblain, France; ferid.haddad@univ-nantes.fr

⁴ Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'alimentation de Nantes-Atlantique, 44300 Nantes, France

⁵ CNRS-UMR6521, University of Bretagne Occidentale, 29238 Brest, France; raphael.tripier@univ-brest.fr

⁶ Nuclear Medicine Department, ICO-René Gauducheau Cancer Center, 44800 Saint-Herblain, France

* Correspondence: michel.cherel@univ-nantes.fr; Tel.: +33-228-080-245; Fax: +33-228-020-204

† These authors contributed equally to this work.

Received: 17 April 2019; Accepted: 22 May 2019; Published: 24 May 2019



Abstract: Although positron emission tomography (PET) imaging with 18-Fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) is a promising technique in multiple myeloma (MM), the development of other radiopharmaceuticals seems relevant. CD138 is currently used as a standard marker for the identification of myeloma cells and could be used in phenotype tumor imaging. In this study, we used an anti-CD138 murine antibody (9E7.4) radiolabeled with copper-64 (^{64}Cu) or zirconium-89 (^{89}Zr) and compared them in a syngeneic mouse model to select the optimal tracers for MM PET imaging. Then, 9E7.4 was conjugated to TE2A-benzyl isothiocyanate (TE2A) and desferrioxamine (DFO) chelators for ^{64}Cu and ^{89}Zr labeling, respectively. ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 and ^{89}Zr -DFO-9E7.4 antibodies were evaluated by PET imaging and biodistribution studies in C57BL/KaLwRij mice bearing either 5T33-MM subcutaneous tumors or bone lesions and were compared to ^{18}F -FDG-PET imaging. In biodistribution and PET studies, ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 and ^{89}Zr -DFO-9E7.4 displayed comparable good tumor uptake of subcutaneous tumors. On the bone lesions, PET imaging with ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 and ^{89}Zr -DFO-9E7.4 showed higher uptake than with ^{18}F -FDG-PET. Comparison of both 9E7.4 conjugates revealed higher nonspecific bone uptakes of ^{89}Zr -DFO-9E7.4 than ^{64}Cu -TE2A-9E7.4. Because of free ^{89}Zr 's tropism for bone when using ^{89}Zr -anti-CD138, ^{64}Cu -anti-CD138 antibody had the most optimal tumor-to-nontarget tissue ratios for translation into humans as a specific new imaging radiopharmaceutical agent in MM.

Keywords: multiple myeloma; immuno-PET; copper-64; zirconium-89; murine CD138

1. Introduction

Over the last 30 years, major advances have been made with regard to the management of multiple myeloma (MM) [1,2]. These improvements have occurred along with our evolving understanding of this malignancy [3]. Multi-clonal heterogeneity of MM still remains one of the main challenges in developing effective therapeutic strategies [4]. Immunologic approaches represent an attractive solution to address this issue for treatment [5], however also for imaging [6] in the context of theranostic approaches. Indeed, the combination of positron emission tomography (PET) with monoclonal antibodies (mAbs) enables the realisation of a specific imaging called immuno-PET [7]. Among the interesting targets, CD138 or syndecan-1 is a cell surface proteoglycan that plays a critical role in the interaction between MM cells and their microenvironment [8,9]. This antigen is currently used as a standard marker for the identification and purification of MM cells in daily practice. Anti-CD138 immuno-PET thus has the potential to improve MM imaging, especially regarding lesions with low metabolic activity [10,11]. Moreover, it could also be considered as a companion agent for currently developed therapies targeting CD138 [12,13]. In the past several years, our group has also proven that radioimmunotherapy (RIT) combining anti-CD138 mAb and alpha-emitters radionuclides is effective in an immuno-competent preclinical MM model and is feasible in humans [14,15].

For immuno-PET, the choice of the radionuclides remains a fundamental question [7]. Combining appropriate half-lives for mAbs biodistribution and favorable emission properties for imaging, Copper-64 (^{64}Cu) and Zirconium-89 (^{89}Zr) have monopolized much of the researchers' attention during the last decade with an advantage for the second one in terms of number of studies [16,17]. However, reported release of ^{89}Zr from the imaging probe may represent a drawback for bone lesions imaging [18] and therefore for MM assessment. In this work, we report the preclinical evaluation of a novel PET imaging agent based on the ^{89}Zr -labeled anti-mouse syndecan-1 mAb (9E7.4, IgG2a κ isotype) [19] in a subcutaneous model and a bone marrow disseminated MM model using desferrioxamine B (DFO) as chelator. This is compared to ^{18}F -FDG-PET and bioluminescence imaging as gold standards and to ^{89}Zr -oxalate imaging as a control of potential ^{89}Zr release by the chelator agent. Furthermore, given our previous experience using ^{64}Cu [11] and to establish the optimal radiolabeled 9E7.4 mAb for immuno-PET, biodistribution and PET imaging in vivo of ^{89}Zr - and ^{64}Cu -mAb conjugates have been compared with emphasis on bone uptake.

2. Results

To evaluate and select the optimal radiolabeled 9E7.4 mAb for immuno-PET of MM lesions in bones, we have generated two radio-immunoconjugates PET tracers (^{89}Zr -DFO-9E7.4 and ^{64}Cu -TE2A-9E7.4). Biodistribution and imaging studies were performed. This report focuses on PET imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 and follows a recent published work on ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 [11]. However, comparison between both in a disseminated model is presented.

2.1. Ex Vivo Biodistribution Experiments

Ex vivo biodistribution at 24 h and 72 h post-injection (PI) results are presented in Figure 1 and Table 1. On the study conducted 24 h after administration of ^{89}Zr -DFO-9E7.4 (Figure 1A,B) in a subcutaneous model of MM, the tracer displayed correct accumulation in the tumors which decreased at 72 h PI. ^{89}Zr -DFO-9E7.4 showed significant blood clearance from 24 h PI to 72 h PI, resulting in increased tumor-to-blood ratios. The radio-immunoconjugate also showed relative high uptakes of ^{89}Zr -DFO-9E7.4 in several normal organs such as liver, spleen and guts. Low muscle uptake was found at both 24 h and 72 h PI. All other organs displayed activity concentrations of 5 %ID/g or less at 24 h with decreasing activity at 72 h PI. Only flat bones and femurs showed increasing activity between 24 h and 72 h PI. As a control of potential ^{89}Zr release, biodistribution experiments at 24 h PI of ^{89}Zr -oxalate were performed (Figure 1C,D). These showed high activity in the bones and relative high uptakes in several normal organs including blood and tumors resulting in very poor tumor-to-blood ratios.

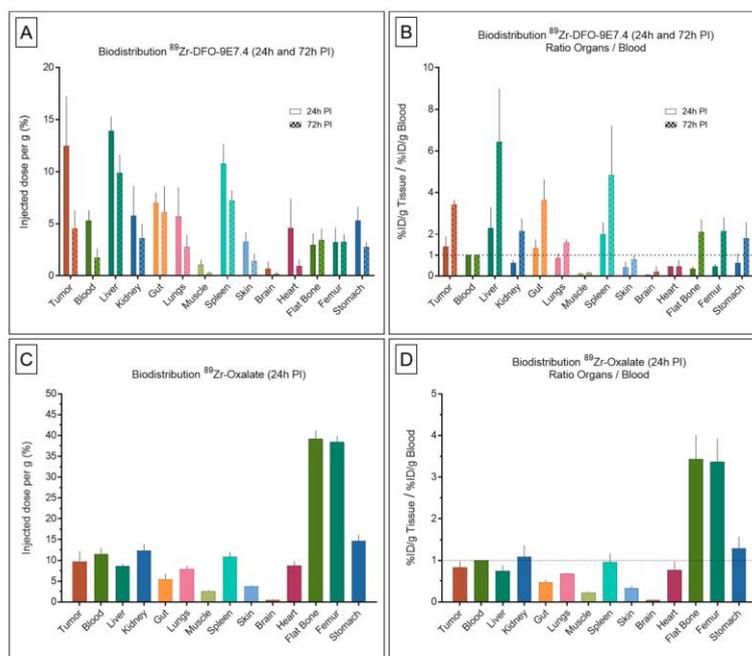


Figure 1. Biodistribution results and organ-to-blood ratios of ⁸⁹Zr-DFO-9E7.4, ⁸⁹Zr-oxalate in tumor-bearing mice. Ex vivo biodistribution results (A) and organ-to-blood ratios (B) of ⁸⁹Zr-DFO-9E7.4 at 24 h and 72 h post-injection (PI), in the subcutaneous tumor model (*n* = 3 for each group). Ex vivo biodistribution results (C) and organ-to-blood ratios (D) of ⁸⁹Zr-oxalate at 24 h PI (*n* = 3). Values are expressed in percentage of the injected radioactive dose per gram of tissue (%ID/g) and presented as mean ± SD.

Table 1. Biodistribution results and organ-to-blood ratios of ⁸⁹Zr-DFO-9E7.4, ⁸⁹Zr-oxalate in tumor-bearing mice. Ex vivo biodistribution results and organ-to-blood ratios of ⁸⁹Zr-DFO-9E7.4 at 24 h and 72 h post-injection (PI), in the subcutaneous tumor model (*n* = 3 for each group). Ex vivo biodistribution results and organ-to-blood ratios of ⁸⁹Zr-oxalate at 24 h PI (*n* = 3). Values are expressed in percentage of the injected radioactive dose per gram of tissue (%ID/g) and presented as mean +/- SD.

Organs	⁸⁹ Zr-DFO-9E7.4 (24 h PI)		⁸⁹ Zr-DFO-9E7.4 (24 h PI)		⁸⁹ Zr-DFO-9E7.4 (72 h PI)		⁸⁹ Zr-DFO-9E7.4 (72 h PI)		⁸⁹ Zr-Oxalate (24 h PI)		⁸⁹ Zr-Oxalate (24 h PI)	
	Ratio		Ratio		Ratio		Ratio		Ratio		Ratio	
	Median	SD	Median	SD	Median	SD	Median	SD	Median	SD	Median	SD
Tumor	12.48	4.77	1.42	0.47	4.53	1.76	3.42	0.22	9.67	2.52	0.83	0.15
Blood	5.33	0.95	1.00	0.00	1.77	0.85	1.00	0.00	11.57	1.38	1.00	0.00
Liver	13.93	1.36	2.30	1.00	9.90	1.75	6.44	2.55	8.60	0.53	0.75	0.13
Kidney	5.78	2.83	0.62	0.13	3.60	1.37	2.15	0.61	12.33	1.53	1.09	0.27
Gut	7.03	0.95	1.34	0.41	6.13	2.47	3.65	0.98	5.47	1.29	0.47	0.06
Lungs	5.70	2.79	0.86	0.22	2.77	1.14	1.60	0.16	7.90	0.79	0.69	0.01
Muscle	1.05	0.49	0.11	0.03	0.27	0.15	0.16	0.04	2.63	0.21	0.23	0.01
Spleen	10.78	1.86	2.00	0.56	7.23	1.01	4.85	2.36	10.90	1.01	0.96	0.21
Skin	3.28	0.90	0.41	0.25	1.40	0.69	0.80	0.18	3.77	0.15	0.33	0.05
Brain	0.68	0.71	0.05	0.03	0.20	0.17	0.20	0.25	0.50	0.10	0.04	0.01
Heart	4.60	2.81	0.45	0.02	0.93	0.64	0.46	0.29	8.70	1.13	0.77	0.20
Flat Bone	2.98	1.07	0.34	0.12	3.43	1.12	2.11	0.60	39.20	2.03	3.44	0.58
Femur	3.23	1.38	0.45	0.11	3.30	0.70	2.16	0.63	38.43	1.40	3.37	0.55
Stomach	5.30	1.35	0.62	0.46	2.77	0.45	1.82	0.76	14.67	1.53	1.29	0.28

2.2. Small Animal PET and CT Imaging

2.2.1. PET Imaging of Subcutaneous Tumor

In vivo, targeting of MM lesions by ^{89}Zr -DFO-9E7.4 was firstly evaluated in a syngeneic model of mice bearing subcutaneous tumors. PET imaging experiments (Figures 2 and 3) confirmed biodistribution observations and helped to visualize in vivo distributions of ^{89}Zr -DFO-9E7.4 over time. On PET images obtained at 24 h PI, subcutaneous (SC) tumors were clearly visible with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 (Figure 2A) while presenting very modest accumulation with ^{89}Zr -oxalate (Figure 2C), with ^{18}F -FDG-PET being used as control imaging (Figure 2B). Figure 3 illustrates the progressive decreasing contrast of SC tumors at 24 h, 48 h and 72 h PI and the conspicuous increasing bones uptake (predominant on coxo-femoral joints, shoulders and knees). High liver, spleen and intestines uptakes were observed at all the time points. Because of this ^{89}Zr accumulation in bones, as early as 48 h PI, 24 h PI time-point seems the optimal one for immuno-PET imaging with this radio-immunoconjugate.

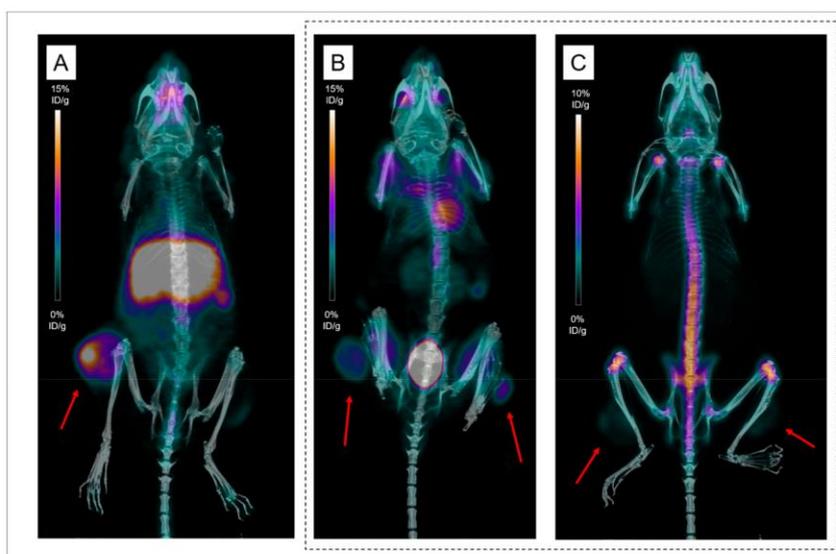


Figure 2. Positron emission tomography (PET) imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4, ^{18}F -FDG-PET and ^{89}Zr -oxalate in tumor-bearing mice. Maximum intensity projections of PET and CT imaging at 24 h post-injection (PI) (A) of Mouse 1 showing uptake of a subcutaneous tumor (Tumors are indicated by red arrows). Maximum intensity projections of PET and CT imaging with ^{89}Zr -oxalate at 24 h PI (C) of Mouse 10 showing low uptakes in both subcutaneous tumors while clearly visible on maximum intensity projections of ^{18}F -FDG-PET and CT imaging (B).

2.2.2. PET Imaging of Disseminated Disease

To establish a model of disseminated disease, mice were injected intravenously via a tail vein and the distribution was assessed using bioluminescence. Mice injected IV developed lesions in the skull, spine, sacrum, iliac wings and members (Table S1).

PET imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 was performed 24 h, 48 h and 72 h PI (Figure 4). Besides the physiological uptakes also observed in the SC model, bone metastases were easily distinguished with excellent tumor-to-background ratios. Table S1 shows the lesion territories for each imaging method. Imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 was able to detect all the lesions observed with bioluminescence imaging.

High contrast was observed at all time-points yet, as observed in the SC model, PET images that were realized at 24 h PI seemed less hampered by aspecific bone uptakes (Figure 4).

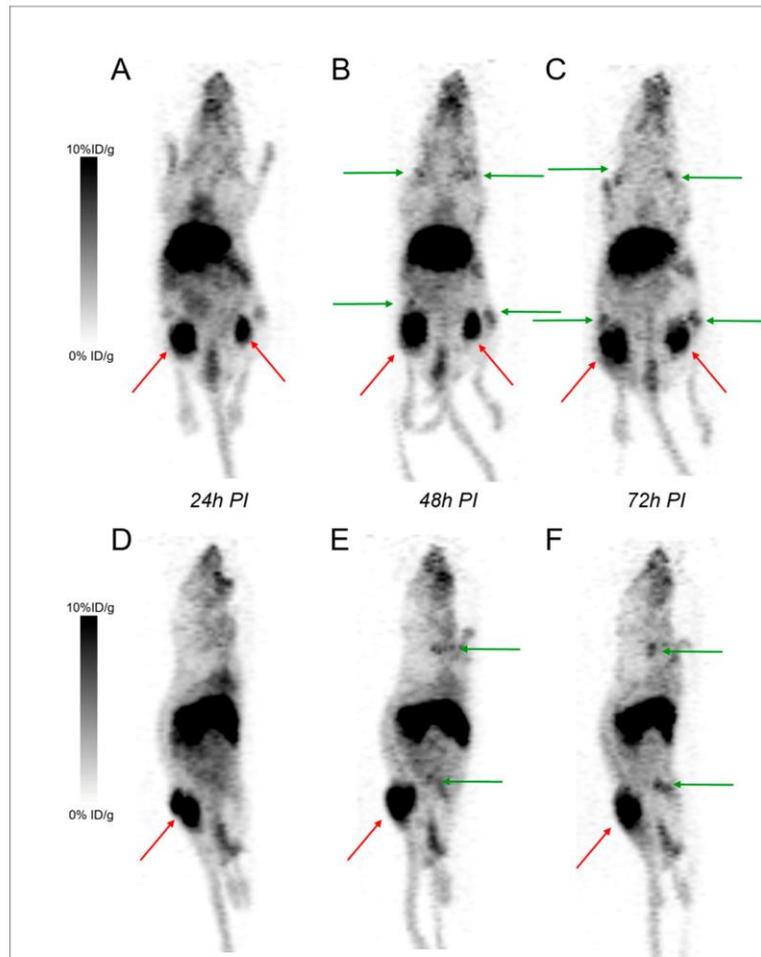


Figure 3. PET imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 in the subcutaneous (SC) model. Maximum intensity projections of PET imaging at 24 h post-injection (PI) (A;D), 48 h PI (B;E) and 72 h PI (C;F) showing uptake of a subcutaneous tumor and of an inguinal lymph node (Tumors are indicated by red arrows) (Mouse 8). Green arrows showed conspicuous binding of free ^{89}Zr over time at sites of osseous turnover.

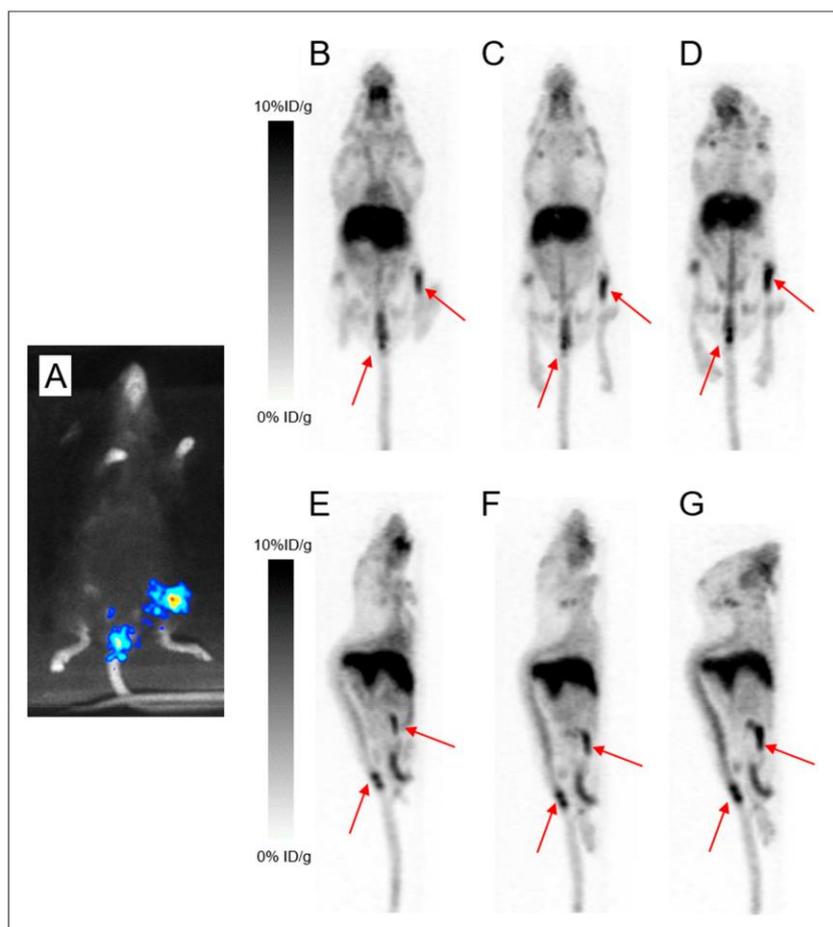


Figure 4. PET imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 in the disseminated model. Bioluminescence imaging (A) revealing lesions in the sacrum and the left femur. Maximum intensity projections of PET and CT imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 at 24 h post-injection (PI) (B;E), 48 h PI (C;F), and 72 h PI (D;G) showing uptakes in the sacrum and left femur (Tumors are indicated by arrows) (Mouse 13).

2.2.3. Focus on Bones and Bone Marrows

A representative group of mice with femur lesions imaged at 24 h and 48 h PI were studied in more detail regarding bone uptake of ^{89}Zr (Figure 5). Both femurs of the mice were harvested and digital autoradiography acquisitions were performed. An accumulation of activity was observed on PET and autoradiography images in mineralized constituents of the bones (compact bone and epiphysis) with similar uptakes between ^{89}Zr -DFO-9E7.4 at 48 h PI and ^{89}Zr -oxalate. This apparent strong affinity of ^{89}Zr for the bones and joints resulted in a hampered contrast for visualization of the MM lesions in the bone marrow cellular compartment observed at 48 h PI compared to the images realized at 24 h PI (Figure 5).

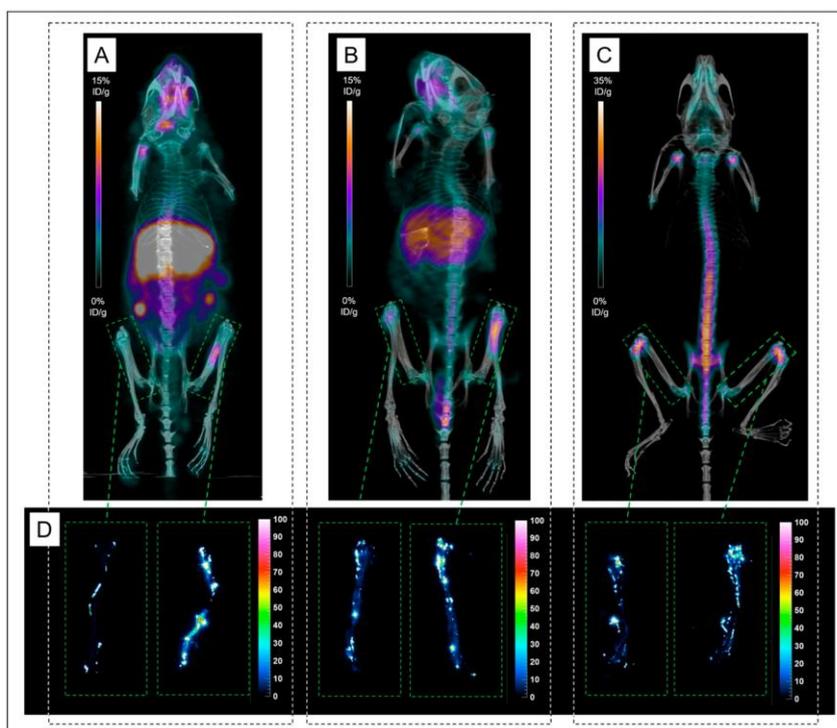


Figure 5. PET imaging and Digital autoradiography acquisitions performed on femurs of Mice imaged with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 or ^{89}Zr -oxalate. Maximum intensity projections of PET and CT imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 at 24 h post-injection (PI) (A) of Mouse 14 showing uptake in the left femur. Maximum intensity projections of PET and CT imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 at 48 h PI (B) of Mouse 15 showing uptake in the left femur. Maximum intensity projections of PET and CT imaging with ^{89}Zr -oxalate at 24 h PI (C) of Mouse 19. Digital autoradiography acquisitions performed on femurs of Mice 14, 15 and 19 (D).

Figure 6 illustrates the altered contrast observed in the disseminated model starting as early as 24 h PI. PET imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 at 24 h PI of Mice 16 and 17 (Figure 6.B,C,E,F) showed multiple osseous uptakes corresponding to MM lesions as assessed by bioluminescence imaging, used as the gold standard. Yet symmetric joints' uptake (shoulders and knees) was also observed on PET imaging of Mouse 17, corresponding to false-positive osseous foci due to free ^{89}Zr .

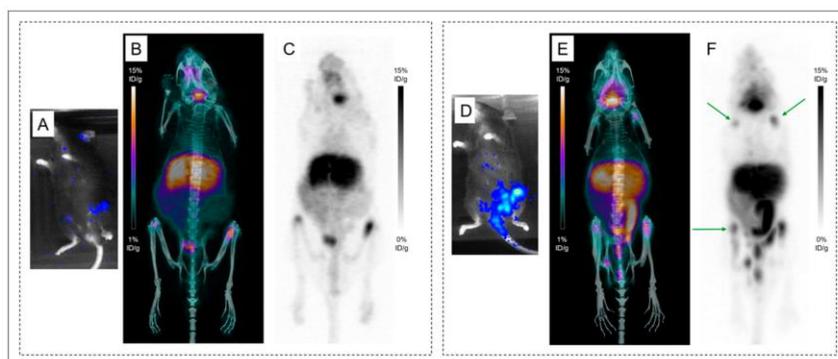


Figure 6. Altered contrast in the disseminated model imaged with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 at 24 h post-injection. Bioluminescence imaging (A) revealing lesions in both femurs. Maximum intensity projections of PET and CT imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 at 24 h post-injection (PI) (B) and maximum intensity projections of PET imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 at 24 h PI (C) showing uptake in both femurs (Mouse 16). Bioluminescence imaging (D) revealing lesions in the sacrum, left femur and both iliac wings. Maximum intensity projections of PET and CT imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 at 24 h PI (E) and maximum intensity projections of PET imaging with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 at 24 h PI (F) showing uptake in the sacrum, left femur and both iliac wings (Mouse 17). Multiple false-positive osseous foci were also observed (indicated by green arrows).

2.3. Comparison of Both Radioimmunoconjugates

2.3.1. In the Same Mouse

To determine the best radio-immunoconjugate for CD138 immuno-PET imaging in MM bone lesions, ^{89}Zr -labeled and ^{64}Cu -labeled 9E7.4 were compared. ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 first and ^{89}Zr -DFO-9E7.4 seven days after were used for serial imaging (Table S1) and high-contrast images showing specific tumor uptakes were obtained (Figure 7). PET images were collected at 24 h PI as optimal contrast was observed at this time point for both tracers. Both tracers were able to detect all the lesions observed with bioluminescence imaging. ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 was also able to detect skull infringement of the Mouse 18 (Figure 7E), undistinguishable on ^{18}F -FDG-PET images (Figure 7B). Higher tumor-to-normal tissue contrast was observed on ^{89}Zr -DFO-9E7.4, probably due to the seven-day interval between both immuno-PET imaging and the continuous tumor progression, as assessed by the skull infringement's visualization on the second ^{18}F -FDG-PET images (Figure 7F).

2.3.2. Between Both Experiments

Besides, despite similar levels of tumor and organ uptakes, few differences in the metabolism of the ^{89}Zr - and ^{64}Cu -labeled mAbs were observed at 24 h PI, as displayed in biodistribution experiments (Figure 8), extracted from Figure 1 and our recent published work [11]. ^{89}Zr -DFO-9E7.4 showed similar uptakes than ^{64}Cu -labeled 9E7.4 in the liver ($13.92 \pm 1.36\% \text{ID/g}$ versus $9.04 \pm 0.36\% \text{ID/g}$, respectively, at 24 h PI; $p = 0.133$; non-parametric test) and highest accumulation in bones (3.1 ± 1.15 versus 1.48 ± 0.29 , respectively, at 24 h PI; $p = 0.006$; non-parametric test), spleen and blood. This notably resulted in net higher tumor to blood ratios for the ^{64}Cu -immunoconjugate (4.08 ± 1.09 versus 1.42 ± 0.24 , respectively, for ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 and ^{89}Zr -DFO-9E7.4 at 24 h PI; $p = 0.0391$; non-parametric test). Similarly, significantly higher tumor to bone ratios for the ^{64}Cu -labeled 9E7.4 were observed (Figure 9) (8.59 ± 3.64 for ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 at 24 h PI versus 4.13 ± 1.06 and 1.35 ± 0.32 for ^{89}Zr -DFO-9E7.4 at 24 h and 72 h PI, respectively; $p = 0.0127$; non-parametric test).

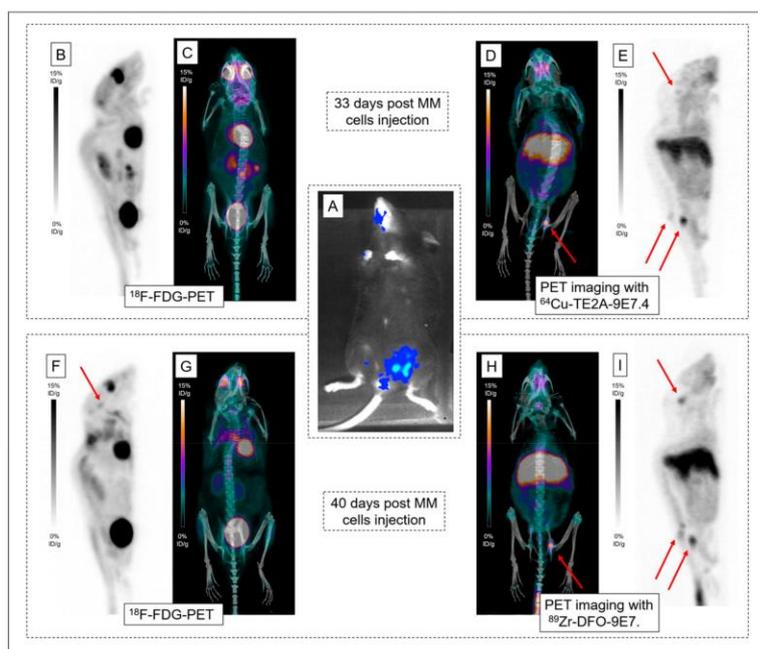


Figure 7. PET imaging with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ and $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$. Bioluminescence imaging (A) revealing lesions in the spine and the left iliac wing. Maximum intensity projections of $^{18}\text{F-FDG-PET}$ and CT (B,C) and maximum intensity projections of PET and CT imaging with $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ at 24 h post-injection (PI) (D,E), realized 33 days post multiple myeloma (MM) cells injection in Mouse 18. Maximum intensity projections of $^{18}\text{F-FDG-PET}$ and CT (F,G) and maximum intensity projections of PET and CT imaging with $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ at 24 h (PI) (H,I), realized 40 days post MM cells injection. Pathological uptakes were spotted by red arrows in the skull, spine and the left iliac wing.

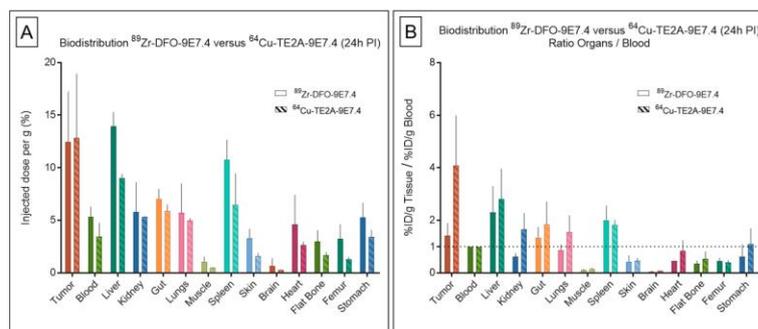


Figure 8. Biodistribution results and organ-to-blood ratios of $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ and $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ in tumor-bearing mice. Ex vivo biodistribution results (A) and organ-to-blood ratios (B) of $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ and $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ at 24 h post-injection (PI) in the subcutaneous tumor model ($n = 3$ for each group). Values are expressed in percentage of the injected radioactive dose per gram of tissue (%ID/g) and presented as mean \pm SD.

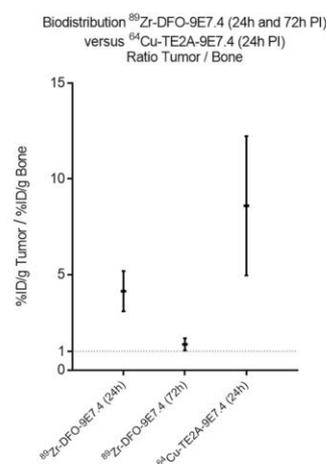


Figure 9. Tumor-to-bone ratios of $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ and $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$. Tumor-to-bone ratios of $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ at 24 h post-injection (PI) and $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ at 24 h and 72 h PI in the subcutaneous tumor model ($n = 3$ for each group). Values are expressed in percentage of the injected radioactive dose per gram of tissue (%ID/g) and presented as mean \pm SD.

3. Discussion

In recent years, immuno-PET established itself as a promising tool for personalized medicine in the context of multimodality treatment strategies [7]. In this context, the favorable properties of ^{89}Zr for mAbs imaging have resulted in the growing interest and use of this isotope [17]. Given our past experiences with the anti-CD138 mAb 9E7.4 labeled with ^{64}Cu [11], we evaluated in this present work ^{89}Zr as an alternative radiolabel for proper imaging of MM tumors with 9E7.4. This study showed that $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ binds effectively to CD138 tumors and allows MM imaging in a syngeneic mouse model (Figures 2–4 and Figure 7). The radiotracer displayed good targeting properties, enabling high-contrast imaging as early as 24 h PI. The images showed excellent tumor to background ratios and although the contrast decreased at 48 h PI and 72 h PI, the tumors were clearly visible with $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$. The biodistribution data agreed well with the small animal PET results and showed $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ peak uptake in the MM tumors at 24 h PI (12.47 ± 4.77 %ID/g) which decreased over time. Overall, $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ presented markedly lower accumulation in non-target tissues with decreasing activity at 72 h PI, except for the liver, which displayed the second highest uptake at 24 h PI (13.92 ± 1.36 %ID/g) and showed longer tracer residency times (Figure 1). Only flat bones (2.97 ± 1.07 %ID/g at 24 h PI and 3.43 ± 1.12 %ID/g at 72 h PI) and femurs (3.22 ± 1.38 %ID/g at 24 h PI and 3.30 ± 0.70 %ID/g at 72 h PI) showed increasing activity between 24 h and 72 h PI (Figure 1). Such observations were not noted with the same antibody radiolabeled with ^{64}Cu (data not published, observed between 24 h and 48 h PI) and were consistent with some preclinical studies describing the known *in vivo* gradual transchelation of ^{89}Zr over time [18].

Indeed, to date, DFO is the most common chelator used in ^{89}Zr -labeled radioimmuno-conjugates' studies [17,20]. However, despite good stability of the $^{89}\text{Zr-DFO}$ complex over a short period of time in preclinical studies, prolonged *in vivo* circulation times result in substantial release of ^{89}Zr from DFO and increase of ^{89}Zr uptake in the bones [18,21–24]. As seen by PET images, ^{89}Zr bone depositions were markedly observed at the epiphyses of humerus, tibia and femur bones at 48 h and 72 h PI (Figures 3 and 4), however also as early as 24 h PI. Due to a strong affinity for phosphate, ^{89}Zr is steadily incorporated to hydroxyapatite, phosphates constituents of bones and particularly in

the epiphyses where more active bone formation takes place [18,25]. This is illustrated by the bone dissection, PET and autoradiography imaging (Figure 4) where clear visual separation of the marrow cellular compartment with intra-medullary lesions from the mineralized bone seemed less evident at 72 h PI than 24 h PI. PET images with ^{89}Zr -DFO-9E7.4 slowly yet surely “turned into” PET images with ^{89}Zr -oxalate over time (Figures 3–5). Yet, stability of the isotopes after chelation with conjugates and fate of free radionuclides are fundamental questions for isotope selection in the design of a radiotracer. Indeed, dissociation of the ^{89}Zr -DFO complex could reduce the efficacy of an immuno-PET probe as an effective tool for bone lesions imaging as non-specific binding of free ^{89}Zr at sites of osseous turnover could induce false-positive osseous foci. This potential drawback is illustrated in Figure 6 as multiple epiphyses false-positive osseous foci are observed in Mouse 17.

Thus, although ^{89}Zr may hold great potential, this isotope is currently limited for both pre-clinical studies and clinical transition. In the oncological mouse model, many metastases occur in the metaphyses and epiphyses of the long bones. These sites conjugate active bone remodeling and high blood flow with fenestrated sinusoids which may predispose to tumor cells embolization and tumors growth in rodents [26,27]. Yet, with the “bone-seeking” nature of ^{89}Zr making these localizations preferential sites for bone accumulation too, this could directly impact immuno-PET imaging and its use as a therapeutic planning companion. Indeed, multiple preclinical studies reported the use of ^{89}Zr -labeled mAbs with elevated uptakes in the bones which (although not always described) clearly altered PET images’ interpretations [22–24,28,29]. These results are also in agreement with precedent findings of the use of immuno-PET as a scouting procedure before radioimmunotherapy (RIT) with large disparity of the distribution of ^{89}Zr -conjugates and RIT conjugates [30–32]. Not to mention the fact that these preclinical studies were realized in human tumor xenografts models which usually overestimate tumor-uptake as being the sole source of antigen expression as opposed to the syngeneic mouse model.

In regards to clinical translation, ^{89}Zr -labeled conjugates have shown minimal uptakes in bones in most of the few human studies found in the literature. Significantly slower bone turnover is indeed observed in comparison to rodents and ^{89}Zr release is not expected to hinder the use of this radionuclide in patients [33–36]. Yet, recent works reporting a high level of false-positive suspicious ^{89}Zr -trastuzumab-avid foci in patients with breast cancer [37,38] again caused concern for the translation of this radionuclide and chelator couple.

In this study, we have also opposed ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 and ^{89}Zr -DFO-9E7.4 with the purpose of choosing the best tracer. As seen previously, free ^{89}Zr and ^{64}Cu from unstable chelates are known to accumulate in the bone and liver, respectively. Yet, our data showed similar uptakes of ^{89}Zr -labeled and ^{64}Cu -labeled 9E7.4 in the liver (13.92 ± 1.36 %ID/g versus 9.04 ± 0.36 %ID/g, respectively, at 24 h PI). At the same time point, bone uptakes of ^{89}Zr -DFO-9E7.4 were higher than ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 (3.1 ± 1.15 versus 1.48 ± 0.29 , respectively, at 24 h PI; $p = 0.0061$; non-parametric test) while the opposite was observed for tumor-to-blood ratio (1.42 ± 0.24 versus 4.08 ± 1.09 , respectively, at 24 h PI; $p = 0.0391$; non-parametric test). Weighing these factors alone, ^{64}Cu -labeled 9E7.4 appears as the best tracer for immuno-PET imaging. This conclusion is in agreement with the only other study which directly compared these two radionuclides in a preclinical model [39], however also with two recent works depicting the development of two immuno-PET tracers using CD38-directed human antibody daratumumab and ^{89}Zr [40] and ^{64}Cu [41], respectively, in xenograft MM mice model. Even if different methodologies were applied, the ^{64}Cu -labeled radioconjugate seems to be the better choice. The development of better chelator agent for ^{89}Zr as described in a recent review by Heskamp et al. [42] might change the face of the ranking in the future.

Consistent preclinical and clinical studies have been performed showing the potential for proper estimation of the probe biodistribution of immuno-PET before RIT [7]. Indeed, by translating tumor-to-background ratios into potential absorbed radiation doses, this approach allows for improved optimal dosing for personalized medicine in the context of multimodality treatment strategies. Moreover, ^{64}Cu with the beta-emitting ^{67}Cu provides an interesting theranostic pair with easy switch

between diagnostic and therapeutic applications [16,43]. Up until now, due to its difficult production process, research on ^{67}Cu is still restricted [16]. Nonetheless, the feasibility of anti-CD138 RIT was reported by our team with encouraging dosimetry results. CD138 targeting with a mAb coupled to a radionuclide emitting alpha particles also represents a potential new therapeutic option for MM and the use of alpha emitters with longer half-lives, such as ^{211}At (7.2 h), should be evaluated in the clinic.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Lines and Cultures

The 5T33 murine MM cell line that was used in this study was kindly provided by Dr. Harvey Turner (Nuclear Medicine Service, Fremantle Hospital, Western Australia) with the permission of Dr. Jiri Radl (TNO Institute, Leiden, Netherlands) [44]. Cells were transfected with luciferase cDNA as previously described [45]. Then, 5T33-Luc(+) were cultured in RPMI1640 medium (Gibco, Saint Aubin, France) containing 2 mM L-glutamine and 10% heat-inactivated fetal calf serum (PAA Laboratories/GE Healthcare Europe GmbH) at 37 °C, 5% CO_2 , 95% humidity.

4.2. Preparation of Immunoconjugates and Immuno-PET Tracers

4.2.1. 9E7.4 Antibody

The 9E7.4 mAb was obtained by immunization of a rat with a 40-amino-acid peptide (GeneCust, Luxembourg, Luxembourg) derived from the murine CD138 protein (aa 90–130) (GenBank: CAA80254.1). Its characterization was ensured within the team as previously described [19]. The isotype of this antibody is IgG2a, κ , and its binding specificity is around 1×10^{-10} M.

4.2.2. Labeling and Controls with ^{89}Zr

DFO is the most common chelator used in ^{89}Zr -labeled radioimmunoconjugates studies. P-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine B (DFO-SCN) was purchased from Macrocyclics (Dallas, USA). DFO-9E7.4 was prepared according to published protocols [20] by conjugating DFO-SCN to 9E7.4 mAb to secondly chelate ^{89}Zr ($t_{1/2} = 78.4$ h; β^+ , 22.7%, $E_{\beta^+ \text{ max}} = 897$ keV). Briefly, an aliquot of 4 mg/mL of 9E7.4 was prepared in borate buffered saline solution (0.3 M, pH 9.0). Freshly dissolved DFO-SCN in DMSO was added to the mixture in a 1:5 mAb:chelator molar ratio. The conjugation proceeded for 3 h at room temperature on an agitating block. The DFO-9E7.4 was purified from excess DFO-SCN by 50 kDa membrane dialysis using Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) with 0.25 M sodium acetate buffer (pH 5.5) as dialysis buffer and concentrated to 1.5 mg/mL.

For ^{89}Zr labeling, under constant shaking, 185 MBq of ^{89}Zr -oxalate was adjusted to pH 7.2 in HEPES buffer (0.5 M) and Na_2CO_3 (2 M). Finally, 330 μL of DFO-9E7.4 (1.5 mg/mL) was added and the pH was readjusted to 7.5 using HEPES buffer (0.5 M). The mixture was incubated at room temperature for 60 min. Radiochemical purity was determined by thin layer chromatography ITLC-SG using a citrate buffer (pH 4.5; 0.1 M) and was 93.8%. The ^{89}Zr -labeled immuno-conjugate was thus secondly purified by size exclusion chromatography using a PD-10 column (Sephadex G25, GE Healthcare, Chicago, IL, USA). The radiochemical purity was finally assessed by ITLC-SG. The immunoreactivity of ^{89}Zr -DFO-9E7.4 was determined using magnetic beads (Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) labeled with a 40 amino acids peptide recognized by the 9E7.4 antibody according to the supplier's protocol. The radiochemical purity and its immunoreactivity were 98% and $80 \pm 5\%$, respectively. At the end of the radiolabeling, the specific activity for ^{89}Zr -DFO-9E7.4 was 5 ± 0.8 MBq/100 μL (116 ± 13 MBq/mg).

4.2.3. Labeling and Controls with ^{64}Cu

Copper-64 ($t_{1/2} = 12.7$ h; β^+ , 17.8%, $E_{\beta^+ \text{ max}} = 656$ keV; β^- , 38.4%, $E_{\beta^- \text{ max}} = 573$ keV) was obtained from the ARRANAX cyclotron (GIP ARRANAX, Saint-Herblain, France) using the

reaction $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ and was delivered as $^{64}\text{CuCl}_2$ in HCl 0.1N. Preparation and radiolabeling of $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ was carried out following our standard procedure and as previously reported in a recent work [11]. The radiolabeling yield and specific activity post-purification of the bioconjugate were $95 \pm 2.8\%$ and 188 ± 27 MBq/mg, respectively, and its immunoreactivity was $81 \pm 7\%$.

4.2.4. Preparation of ^{89}Zr Oxalate

The supplied ^{89}Zr -oxalate was neutralized with Na_2CO_3 (2 M) and diluted with saline (0.9% NaCl) to give a final oxalate concentration of 10 mM.

4.3. Animal Studies

4.3.1. Animal Model: Subcutaneous Tumor Model and IV Disseminated Tumor Model

Female C57BL/KalwRij mice were purchased from Envigo and housed under conventional conditions at the Experimental Therapeutic Unit animal facility (SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes, license number: B-44-278). Experiments were approved by the local veterinary committee (reference 00143.01, 28 march 2014) and carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Mice were 17 weeks old at the time of the experiments.

Twelve mice were grafted subcutaneously (SC) with 2.10^6 5T33-Luc(+) cells suspended in 100 μL of PBS 20 days before the first PET images. Six mice were grafted on the right leg and six on both legs. Tumors were grown to a size of 0.3–0.8 cm in diameter in line with ethical consideration in animal experiments.

To establish the optimal radiolabeled 9E7.4 mAb for bone lesions immuno-PET in MM, a well-known experimental disseminated model was generated: 1.10^6 5T33-Luc(+) cells were suspended in 100 μL of PBS and injected via the tail vein into seven mice 34 days before the first PET images. Mice were monitored for bone marrow lesions by bioluminescence imaging over 33 days.

4.3.2. Bioluminescence Imaging

Mice were serially imaged using 2D bioluminescence imaging as previously described [14] to locate tumor progression.

The mice were anesthetized with intraperitoneal injection of 100 $\mu\text{L}/10\text{g}$ of an anesthetic solution (consisting of 1 mL ketamine at 100 mg/mL (Panpharma); 0.5 mL xylazine at 20 mg/mL (Bayer); and 8.5 mL PBS). Mice were injected intraperitoneally with 100 μL of luciferin (Interchim, 12 mg/mL) 5 min before being imaged. Mice were imaged in ventral and dorsal positions using a Photon IMAGER™ (Biospace Lab, Paris, France) for 30 s. The images were analyzed using the M3Vision™ software (Biospace Lab, Paris, France).

4.3.3. Small Animal ImmunoPET-CT Imaging

PET-CT preclinical exams were performed on our local imaging center, CIMA (Centre d'Imagerie Multimodale Appliquée, Nantes, France).

For the SC model, nine mice were imaged with $^{18}\text{F-FDG-PET}$ and $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ (Mice 1 to 9) and three with $^{18}\text{F-FDG-PET}$ and $^{89}\text{Zr-Oxalate}$ (Mice 10 to 12).

For the disseminated model, five mice were imaged with $^{18}\text{F-FDG-PET}$ and $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$ (Mice 13 to 17). Mice 18 and 19 were imaged with $^{18}\text{F-FDG-PET}$ and $^{64}\text{Cu-TE2A-9E7.4}$ in a first session and secondly imaged one week later with $^{18}\text{F-FDG-PET}$ and $^{89}\text{Zr-DFO-9E7.4}$.

One mouse (Mouse 20) with no graft was imaged with $^{89}\text{Zr-Oxalate}$ as control imaging for this radionuclide.

For $^{18}\text{F-FDG-PET}$ imaging, mice were fasted overnight (6 h to 12 h) with free access to water. Mice were warmed for at least one hour, anesthetized with inhaled isoflurane 2.5% and intravenously injected with 10 MBq of $^{18}\text{F-FDG}$ in a volume of 100 μL through the lateral tail vein. Mice were maintained under anesthesia for a 1 h uptake period and then scanned (350–650 keV energy window,

20 min listmode acquisition, 3D rebinning followed by OSEM-MAP reconstruction) on a multi-modality preclinical imaging system (Inveon™, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). CT acquisitions (80 kV, 0.5 mA) were also performed immediately before the PET imaging. The reconstructed PET images were analyzed using Inveon Research Workplace (Siemens Healthcare).

For ^{89}Zr PET studies, similar procedures were followed 24 h post- ^{18}F -FDG-PET imaging, except that no fasting was performed and imaging occurred at 24 h, 48 h and 72 h post-injection (PI). Considering the long physical half-life of ^{89}Zr and the pharmacokinetic profile of antibody-based radiotracers [11], time points before 24 h were not realized for longitudinal PET imaging studies. Each mouse was intravenously injected with 5 MBq of radiotracer (^{89}Zr -DFO-9E7.4 or ^{89}Zr -Oxalate) in a volume of 100 μL via the lateral tail vein. According to the ^{89}Zr decay, the specific activity at the injection time was between 116 MBq/mg and 180 MBq/mg for ^{89}Zr -DFO-9E7.4.

For ^{64}Cu PET studies, similar procedures were followed and imaging occurred at 24 h PI. Mice were intravenously injected with 10 MBq of ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 in a volume of 100 μL via the lateral tail vein. According to the ^{64}Cu decay, the specific activity at the injection time was between 140 MBq/mg and 170 MBq/mg.

4.3.4. Biodistribution Study

Tracer biodistribution studies were carried out in all the SC-tumor-bearing mice after PET imaging ($n = 3$ for each group): at 24 h and 72 h PI for ^{89}Zr -DFO-9E7.4 and at 24 h PI for ^{89}Zr -oxalate. Tumor, blood and other selected tissues (liver, kidney, gut, lungs, muscle, spleen, skin, brain, heart, flat bone, femur and stomach) were dissected, weighed and counted on a calibrated and normalized gamma-counter. For each organ, the percentage of injected dose per gram (%ID/g) was calculated. The organ to blood ratios were also compared.

4.3.5. Digital Autoradiography

Femurs of Mice 14, 15 and 20 were removed, fast-frozen in cold 2-methylbutane solution, embedded in optimal-cutting temperature compound and cut into 10 μm sections using a cryomicrotome (CM3050 Leica Biosystems®). Sections were mounted on Superfrost™ slides and digital autoradiography images were obtained on a BeaQuant - Real-time autoradiography (Ai4R, Nantes, France). Image analysis was performed on the dedicated software Beamage® (version 1.0, Ai4R, Nantes, France).

4.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 7.00. Differences in uptake were tested for significance using the non-parametric Mann-Whitney test for two groups. A p value below 0.05 was considered significant.

5. Conclusions

In this study, we synthesized ^{64}Cu - and ^{89}Zr -labeled anti-CD138 antibodies that were able to detect subcutaneous MM tumors and bone marrow lesions with high sensitivity, outperforming ^{18}F -FDG-PET in this preclinical model. In a theranostic approach, the stability issue and “bone-seeking” nature of ^{89}Zr could directly impact immuno-PET imaging and its use as a therapeutic planning companion. Imaging ^{64}Cu -anti-CD138 antibody indeed had the most optimal tumor-to-non-target tissue ratios for translation into humans as a specific and promising new imaging radiopharmaceutical agent in MM. These data also support ^{64}Cu -TE2A-9E7.4 as a promising imaging tool for selecting patients before the realization of RIT.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/10/2564/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, C.B., S.G. and M.C.; methodology, C.B., S.G. and M.C.; software, T.C. and N.C.; validation, C.B., S.G. and M.C.; formal analysis, C.B., S.G. and M.C.; investigation, C.B., S.G., B.C. and

M.C.; resources, S.G., F.G., A.F.-C., P.R.-L.S., M.B., L.R.-V., F.H., R.T. and B.C.; data curation, T.C.; writing—original draft preparation, C.B. and S.G.; writing—review and editing, M.C., F.K.-B. and C.B.-M.; supervision, M.C., F.K.-B. and C.B.-M.

Funding: This research was funded in part by grants from the French National Agency for Research, called “Investissements d’Avenir” IRON LabEx n° ANR-11-LABX-0018-01, IGO LabEx n° ANR-11-LABX-0016-01, Siric ILIAD, DHU Oncogrefe, ArronaxPlus Equipex n° ANR-11-EQPX-0004 and NExT n° ANR-16-IDEX-0007.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Radioactivity Technical Platform, and especially Catherine Maurel and Séverine Lambot, the UTE IRS-UN, and particularly Sylvia Lambot, and the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell), and specifically Myriam Robard and Stephanie Blandin, for their help.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of the data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

⁶⁴ Cu	copper-64
DFO	desferrioxamine B
DFO-SCN	P-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine B;
¹⁸ F-FDG	[18]-Fluorodeoxyglucose
mAb	monoclonal antibody
MM	multiple myeloma
PET	positron emission tomography
PI	post-injection
RIT	radioimmunotherapy
SC	subcutaneously
TE2A	TE2A-benzyl isothiocyanate
⁸⁹ Zr	Zirconium-89

References

- Bergsagel, P.L. Where we were, where we are, where we are going: Progress in multiple myeloma. *Am. Soc. Clin. Oncol Educ Book* **2014**, *2014*, 199–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Moreau, P.; San Miguel, J.; Sonneveld, P.; Mateos, M.V.; Zamagni, E.; Avet-Loiseau, H.; Hajek, R.; Dimopoulos, M.A.; Ludwig, H.; Einsele, H.; et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2017**, *24*, vi133–vi137. [[CrossRef](#)]
- Harry, P. Recent advances in understanding multiple myeloma. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* **2017**, *10*, 267–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brioli, A.; Melchor, L.; Cavo, M.; Morgan, G.J. The impact of intra-clonal heterogeneity on the treatment of multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **2014**, *165*, 441–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lonial, S.; Durie, B.; Palumbo, A.; San-Miguel, J. Monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma: Current status and future perspectives. *Leukemia* **2016**, *30*, 526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bailly, C.; Leforestier, R.; Jamet, B.; Carlier, T.; Bourgeois, M.; Guérard, F.; Touzeau, C.; Moreau, P.; Chérel, M.; Kraeber-Bodéré, F.; et al. PET Imaging for Initial Staging and Therapy Assessment in Multiple Myeloma Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 445. [[CrossRef](#)]
- Bailly, C.; Cléry, P.-F.; Faivre-Chauvet, A.; Bourgeois, M.; Guérard, F.; Haddad, F.; Barbet, J.; Chérel, M.; Kraeber-Bodéré, F.; Carlier, T.; et al. Immuno-PET for Clinical Theranostic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *18*, 57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sanderson, R.D.; Yang, Y. Syndecan-1: A dynamic regulator of the myeloma microenvironment. *Clin. Exp. Metastasis* **2008**, *25*, 149–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ren, Z.; van Andel, H.; de Lau, W.; Hartholt, R.B.; Maurice, M.M.; Clevers, H.; Kersten, M.J.; Spaargaren, M.; Pals, S.T. Syndecan-1 promotes Wnt/β-catenin signaling in multiple myeloma by presenting Wnts and R-spondins. *Blood* **2017**, *131*, 982–994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cavo, M.; Terpos, E.; Nanni, C.; Moreau, P.; Lentzsch, S.; Zweegman, S.; Hillengass, J.; Engelhardt, M.; Usmani, S.Z.; Vesole, D.H.; et al. Role of (18)F-FDG PET/CT in the diagnosis and management of multiple

- myeloma and other plasma cell disorders: A consensus statement by the International Myeloma Working Group. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, e206–e217. [\[CrossRef\]](#)
11. Bailly, C.; Gouard, S.; Lacombe, M.; Saëc, P.R.-L.; Chalopin, B.; Bourgeois, M.; Chouin, N.; Tripier, R.; Halime, Z.; Haddad, F.; et al. Comparison of Immuno-PET of CD138 and PET imaging with ⁶⁴CuCl₂ and ¹⁸F-FDG in a preclinical syngeneic model of multiple myeloma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 9061. [\[CrossRef\]](#)
 12. Kelly, K.R.; Siegel, D.S.; Chanan-Khan, A.A.; Somlo, G.; Heffner, L.T.; Jagannath, S.; Zimmerman, T.; Munshi, N.C.; Madan, S.; Mohrbacher, A.; et al. Indatuximab Ravtansine (BT062) in Combination with Low-Dose Dexamethasone and Lenalidomide or Pomalidomide: Clinical Activity in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Blood* **2016**, *128*, 4486.
 13. Heffner, L.T.; Jagannath, S.; Zimmerman, T.M.; Lee, K.P.; Rosenblatt, J.; Lonial, S.; Lutz, R.J.; Czeloth, N.; Osterroth, F.; Ruehle, M.; et al. BT062, an Antibody-Drug Conjugate Directed Against CD138, Given Weekly for 3 Weeks in Each 4 Week Cycle: Safety and Further Evidence of Clinical Activity. *Blood* **2012**, *120*, 4042.
 14. Chérel, M.; Gouard, S.; Gaschet, J.; Sai-Maurel, C.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A.; Bourgeois, M.; Gestin, J.-F.; Bodéré, F.K.; Barbet, J.; et al. ²¹³Bi radioimmunotherapy with an anti-mCD138 monoclonal antibody in a murine model of multiple myeloma. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 1597–1604. [\[CrossRef\]](#)
 15. Rousseau, C.; Ferrer, L.; Supiot, S.; Bardiès, M.; Davodeau, F.; Faivre-Chauvet, A.; Baumgartner, P.; Wijdenes, J.; Lacombe, M.; Barbet, J.; et al. Dosimetry results suggest feasibility of radioimmunotherapy using anti-CD138 (B-B4) antibody in multiple myeloma patients. *Tumour Biol.* **2012**, *33*, 679–688. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 16. Follacchio, G.A.; De Feo, M.S.; Monteleone, F.; De Vincentis, G.; Liberatore, M. Radiopharmaceuticals labelled with copper radionuclides: Clinical results in human beings. *Curr. Radiopharm.* **2018**, *11*, 22–23. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 17. Jauw, Y.W.S.; Menke-van der Houven van Oordt, C.W.; Hoekstra, O.S.; Hendrikse, N.H.; Vugts, D.J.; Zijlstra, J.M.; Huisman, M.C.; van Dongen, G.A.M.S. Immuno-Positron Emission Tomography with Zirconium-89-Labeled Monoclonal Antibodies in Oncology: What Can We Learn from Initial Clinical Trials? *Front. Pharm.* **2016**, *7*, 131. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 18. Abou, D.S.; Ku, T.; Smith-Jones, P.M. In vivo biodistribution and accumulation of ⁸⁹Zr in mice. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38*, 675–681. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 19. Fichou, N.; Gouard, S.; Maurel, C.; Barbet, J.; Ferrer, L.; Morgenstern, A.; Bruchertseifer, F.; Faivre-Chauvet, A.; Bigot-Corbel, E.; Davodeau, F.; et al. Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model. *Front. Med.* **2015**, *2*, 76. [\[CrossRef\]](#)
 20. Zeglis, B.M.; Lewis, J.S. The Bioconjugation and Radiosynthesis of ⁸⁹Zr-DFO-labeled Antibodies. *J. Vis. Exp.* **2015**, *96*, e52521.
 21. Holland, J.P.; Divilov, V.; Bander, N.H.; Smith-Jones, P.M.; Larson, S.M.; Lewis, J.S. ⁸⁹Zr-DFO-J591 for immunoPET of prostate-specific membrane antigen expression in vivo. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 1293–1300. [\[CrossRef\]](#)
 22. Williams, S.-P. Tissue distribution studies of protein therapeutics using molecular probes: Molecular imaging. *AAPS J.* **2012**, *14*, 389–399. [\[CrossRef\]](#)
 23. Chen, F.; Goel, S.; Valdovinos, H.F.; Luo, H.; Hernandez, R.; Barnhart, T.E.; Cai, W. In Vivo Integrity and Biological Fate of Chelator-Free Zirconium-89-Labeled Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Nano* **2015**, *9*, 7950–7959. [\[CrossRef\]](#)
 24. England, C.G.; Ehlerding, E.B.; Hernandez, R.; Rekoske, B.T.; Graves, S.A.; Sun, H.; Liu, G.; McNeel, D.G.; Barnhart, T.E.; Cai, W. Preclinical Pharmacokinetics and Biodistribution Studies of ⁸⁹Zr-Labeled Pembrolizumab. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 162–168. [\[CrossRef\]](#)
 25. Wuthier, R.E. A zonal analysis of inorganic and organic constituents of the epiphysis during endochondral calcification. *Calcif Tissue Res.* **1969**, *4*, 20–38. [\[CrossRef\]](#)
 26. Rosol, T.J.; Tannehill-Gregg, S.H.; Corn, S.; Schneider, A.; McCauley, L.K. Animal models of bone metastasis. *Cancer Treat. Res.* **2004**, *118*, 47–81.
 27. Yoneda, T. Arterial microvascularization and breast cancer colonization in bone. *Histol. Histopathol.* **1997**, *12*, 1145–1149.
 28. Hernandez, R.; England, C.G.; Yang, Y.; Valdovinos, H.F.; Liu, B.; Wong, H.C.; Barnhart, T.E.; Cai, W. ImmunoPET imaging of tissue factor expression in pancreatic cancer with ⁸⁹Zr-Df-ALT-836. *J. Control. Release* **2017**, *264*, 160–168. [\[CrossRef\]](#)

29. Hernandez, R.; Sun, H.; England, C.G.; Valdovinos, H.F.; Ehlerding, E.B.; Barnhart, T.E.; Yang, Y.; Cai, W. CD146-targeted immunoPET and NIRF Imaging of Hepatocellular Carcinoma with a Dual-Labeled Monoclonal Antibody. *Theranostics* **2016**, *6*, 1918–1933. [[CrossRef](#)]
30. Aerts, H.J.W.L.; Dubois, L.; Perk, L.; Vermaelen, P.; van Dongen, G.A.M.S.; Wouters, B.G.; Lambin, P. Disparity between in vivo EGFR expression and ⁸⁹Zr-labeled cetuximab uptake assessed with PET. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 123–131. [[CrossRef](#)]
31. Perk, L.R.; Visser, G.W.M.; Vosjan, M.J.W.D.; Stigter-van Walsum, M.; Tijink, B.M.; Leemans, C.R.; van Dongen, G.A.M.S. (⁸⁹Zr) as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals (⁹⁰Y) and (¹⁷⁷Lu) in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 1898–1906.
32. Perk, L.R.; Visser, O.J.; Stigter-van Walsum, M.; Vosjan, M.J.W.D.; Visser, G.W.M.; Zijlstra, J.M.; Huijgens, P.C.; van Dongen, G.A.M.S. Preparation and evaluation of (⁸⁹Zr)-Zevalin for monitoring of (⁹⁰Y)-Zevalin biodistribution with positron emission tomography. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006**, *33*, 1337–1345. [[CrossRef](#)]
33. Menke-van der Houven van Oordt, C.W.; Gootjes, E.C.; Huisman, M.C.; Vugts, D.J.; Roth, C.; Luik, A.M.; Mulder, E.R.; Schuit, R.C.; Boellaard, R.; Hoekstra, O.S.; et al. ⁸⁹Zr-cetuximab PET imaging in patients with advanced colorectal cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 30384–30393.
34. Jansen, M.H.; Veldhuijzen van Zanten, S.E.M.; van Vuurden, D.G.; Huisman, M.C.; Vugts, D.J.; Hoekstra, O.S.; van Dongen, G.A.; Kaspers, G.-J.L. Molecular Drug Imaging: ⁸⁹Zr-Bevacizumab PET in Children with Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 711–716. [[CrossRef](#)]
35. Bahce, I.; Huisman, M.C.; Verwer, E.E.; Ooijevaar, R.; Boutkourt, F.; Vugts, D.J.; van Dongen, G.A.; Boellaard, R.; Smit, E.F. Pilot study of (⁸⁹Zr)-bevacizumab positron emission tomography in patients with advanced non-small cell lung cancer. *EJNMMI Res.* **2014**, *4*, 35. [[CrossRef](#)]
36. Van Loon, J.; Even, A.J.G.; Aerts, H.J.W.L.; Öllers, M.; Hoebbers, F.; van Elmpt, W.; Dubois, L.; Dingemans, A.-M.C.; Lalisang, R.I.; Kempers, P.; et al. PET imaging of zirconium-89 labelled cetuximab: A phase I trial in patients with head and neck and lung cancer. *Radiother. Oncol.* **2017**, *122*, 267–273. [[CrossRef](#)]
37. Ulaner, G.A.; Hyman, D.M.; Ross, D.S.; Corben, A.; Chandarlapaty, S.; Goldfarb, S.; McArthur, H.; Erinjeri, J.P.; Solomon, S.B.; Kolb, H.; et al. Detection of HER2-Positive Metastases in Patients with HER2-Negative Primary Breast Cancer Using ⁸⁹Zr-Trastuzumab PET/CT. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 1523–1528. [[CrossRef](#)]
38. Ulaner, G.A.; Hyman, D.M.; Lyashchenko, S.K.; Lewis, J.S.; Carrasquillo, J.A. ⁸⁹Zr-Trastuzumab PET/CT for Detection of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastases in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Primary Breast Cancer. *Clin. Nucl. Med.* **2017**, *42*, 912–917. [[CrossRef](#)]
39. Natarajan, A.; Mayer, A.T.; Reeves, R.E.; Nagamine, C.M.; Gambhir, S.S. Development of Novel ImmunoPET Tracers to Image Human PD-1 Checkpoint Expression on Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Humanized Mouse Model. *Mol. Imaging Biol.* **2017**, *19*, 903–914. [[CrossRef](#)]
40. Ghai, A.; Maji, D.; Cho, N.; Chanswangphuwana, C.; Rettig, M.; DiPersio, J.; Akers, W.; Dehdashti, F.; Achilefu, S.; Vij, R.; et al. Preclinical development of CD38-targeted (⁸⁹Zr)-DFO-daratumumab for imaging multiple myeloma. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59*, 216–222. [[CrossRef](#)]
41. Caserta, E.; Chea, J.; Minnix, M.; Viola, D.; Vonderfecht, S.; Yazaki, P.; Crow, D.; Khalife, J.; Sanchez, J.F.; Palmer, J.M.; et al. Copper-64-labeled daratumumab as a PET/CT imaging tracer for multiple myeloma. *Blood* **2018**, *131*, 741–745. [[CrossRef](#)]
42. Heskamp, S.; Raavé, R.; Boerman, O.; Rijpkema, M.; Goncalves, V.; Denat, F. ⁸⁹Zr-Immuno-Positron Emission Tomography in Oncology: State-of-the-Art ⁸⁹Zr Radiochemistry. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 2211–2223. [[CrossRef](#)]
43. Ahmedova, A.; Todorov, B.; Burdzhiev, N.; Goze, C. Copper radiopharmaceuticals for theranostic applications. *Eur J. Med. Chem* **2018**, *157*, 1406–1425. [[CrossRef](#)]

44. Radl, J.; Croese, J.W.; Zurcher, C.; Van den Enden-Vieveen, M.H.; de Leeuw, A.M. Animal model of human disease. Multiple myeloma. *Am. J. Pathol.* **1988**, *132*, 593–597.
45. Gouard, S.; Pallardy, A.; Gaschet, J.; Faivre-Chauvet, A.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A.; Maurel, C.; Matous, E.; Kraeber-Bodéré, F.; Davodeau, F.; et al. Comparative analysis of multiple myeloma treatment by CD138 antigen targeting with bismuth-213 and Melphalan chemotherapy. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41*, e30–e35. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Clinical Cancer Research

Interim PET analysis in first line therapy of multiple myeloma: Prognostic value of Δ SUVmax in the FDG-avid patients of the IMAJEM study

Clement Bailly, Thomas Carlier, Bastien Jamet, et al.

Clin Cancer Res Published OnlineFirst August 1, 2018.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0741
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2018/08/01/1078-0432.CCR-18-0741.DC1
Author Manuscript	Author manuscripts have been peer reviewed and accepted for publication but have not yet been edited.

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, use this link http://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2018/08/01/1078-0432.CCR-18-0741 . Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

Interim PET analysis in first line therapy of multiple myeloma: Prognostic value of Δ SUVmax in the FDG-avid patients of the IMAJEM study

Clément Bailly^{1,2†} and Thomas Carlier^{1,2,†}, Bastien Jamet², Thomas Eugene², Cyrille Touzeau^{1,3}, Michel Attal³, Cyrille Hulin⁴, Thierry Facon⁵, Xavier Leleu⁶, Aurore Perrot⁷, Laurent Garderet⁸, Margaret Macro⁹, Denis Caillot¹⁰, Philippe Moreau^{1,11}, Françoise Kraeber-Bodéré^{1,2,12}, Caroline Bodet-Milin^{1,2}

¹ Nantes-Angers Cancer Research Center (CRCINA), University of Nantes, Inserm UMR1232, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes, France.

² Department of Nuclear Medicine, CHU de Nantes, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France.

³ Department of Hematology, IUCT Oncopole, 1 Avenue Irène Joliot-Curie, 31100 Toulouse, France

⁴ Department of Hematology, CHU Haut Leveque, 33600 Pessac, France

⁵ Department of Hematology, CHRU Lille, 2 Avenue Oscar Lambret, 59000 Lille, France

⁶ Department of Hematology, CHU de Poitiers, 2 Rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France

⁷ Department of Hematology, CHU de Nancy, rue du Morvan, 54500 Vandoeuvre les Nancys, France

⁸ Department of Hematology, CHU de St Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine; 75012 Paris, France

⁹ Department of Hematology, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14033 Caen, France

¹⁰ Department of Hematology, CHU de Dijon, 2 bd Maréchal de Lattre de Tassigny; 21000 Dijon, France

¹¹ Department of Hematology, CHU de Nantes, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France.

¹² Department of Nuclear Medicine, ICO-René Gauducheau, Boulevard Jacques Monod, 44805 Saint-Herblain, France.

†: Contributed equally to this work

Running Title: Prognostic value of Δ SUVmax in multiple myeloma

Keywords: Multiple Myeloma; FDG-PET; SUV; Therapeutic evaluation; IMAJEM trial

Additional information:

- Financial support:

-This work was supported by PO1-155258 and P50-100707 from the French Ministry of Health, Soutien aux Techniques Innovantes Coûteuses 2010 Cancer STIC 10/03.

-This work has been supported in part by grants from the French National Agency for Research, called “Investissements d’Avenir” IRON Labex n° ANR-11-LABX-0018-01 and ArronaxPlusEquipex n° ANR-11-EQPX-0004, and by grants from DHU Oncogreffes and SIRIC ILIAD (Imaging and Longitudinal Investigations to Ameliorate Decision-making in multiple myeloma and breast cancer).

- Corresponding author:

- Dr Caroline Bodet-Milin
Department of Nuclear Medicine, CHU de Nantes,
1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France.
Tel: +33 240084136; Fax: +33 240084218
E-mail: caroline.milin@chu-nantes.fr

- Disclosures of conflicts of Interest

- Moreau: Advisory Boards for Celgene, Janssen, Takeda, Novartis, Amgen.
- Other authors: no disclosure.

- Count:

- Text word count: 2308
- Abstract word count: 182
- Table/figure count: 1 figure and 3 tables
- Supplementary data: 2 figures
- Number of references: 24

Abstract

Purpose: To assess the prognostic value of interim FDG-PET analysis using decrease in maximum standardized uptake value (SUVmax) versus visual analysis in patients with multiple myeloma (MM).

Experimental design: We evaluated the prognostic value of FDG-PET after three cycles of lenalidomide, bortezomib and dexamethasone (RVD) in patients with FDG-avid MM included in the French prospective multicenter IMAJEM study. All images were centrally reviewed and interpreted using visual criteria and maximal standardized uptake value reduction (Δ SUVmax). Known prognostic factors, such as the revised International Staging System and biochemical response after three cycles of chemotherapy were also evaluated.

Results: In the multivariate analysis, only Δ SUVmax ($p < 0.001$, HR=5.56; 95% CI: 1.96 – 15.81) and biochemical response after three cycles of RVD, ($p = 0.025$, HR=0.29; 95% CI: 0.1 – 0.85) appeared as independent prognostic factors, with a more discriminative HR for Δ SUVmax. Δ SUVmax analysis (> -25 vs $\leq -25\%$) identified patients with improved median PFS (22.6 months and not reached, respectively).

Conclusion: Δ SUVmax appears to be a powerful tool for the prediction of long-term outcome in patients with FDG-avid MM. Other prospective studies are needed to further validate this prognostic biomarker.

Statement of significance:

SUVmax reduction improves the early prognostic value of interim positron emission tomography scans in multiple myeloma patients

Introduction:

The last decade has seen the growing use of positron emission tomography using ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG-PET) for the staging and assessment of therapy in multiple myeloma (MM)^{1,2}. Several studies have shown the prognostic value of this imaging technique. At baseline, the number of focal lesions (FL)^{3,4}, the maximum standardized uptake value (SUVmax)⁴ and volume-based parameters⁵ have been reported to be associated with shorter progression-free survival (PFS) in MM patients. Similarly, FDG-PET normalization before maintenance has been demonstrated to favourably affect PFS^{3,4,6}, despite different criteria of normalization among studies. For instance, in the French IMAJEM (IMAgérie du JEune Myélome) study, a visual assessment using liver background as cut-off was used to distinguish PET positivity and negativity⁶. A significantly improved PFS was reported in patients, whose disease became PET-negative before maintenance⁶, whereas after only three courses of lenalidomide bortezomib and dexamethasone (RVD) as initial therapy, the PFS was improved among patients with a negative PET, but the improvement was not statistically significant. Quantitative measurements may improve the prognostic value of interim PET analysis, as demonstrated in lymphoma^{1,7-9}. The purpose of this study was to assess the prognostic value of interim FDG-PET performed after three courses of chemotherapy analysed using decrease in SUVmax in the FDG-avid MM patient population included in the French prospective multicenter IMAJEM study.

Materials and methods

Patients

The present study is based on the IMAJEM trial, which is part of the IFM/DFCI2009 study (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01309334). The aims, inclusion and exclusion criteria have previously been reported¹⁰. The IFM/DFCI clinical trial is aimed at evaluating the combination of RVD versus RVD plus autologous stem-cell transplantation, followed by lenalidomide maintenance in patients with de novo MM, younger than 65 years of age. A subgroup of 134 MM patients were enrolled into the prospective IMAJEM trial with the primary aim of comparing the detection rate of bone lesions using MRI and FDG-PET at diagnosis, after three cycles of RVD and before maintenance.⁶ All patients signed a written informed consent form. The IMAJEM study was locally approved by the institutional ethics committee (University Hospital, Nantes, France) and in accordance with the precepts of the Helsinki declaration.

FDG-PET/CT evaluation

For this analysis, FDG-PET images performed at diagnosis and following three cycles of RVD (interim FDG-PET) were considered. Each of the 18 centers involved in this study applied their own acquisition procedure for patient imaging. Briefly, all patients fasted for at least four hours before the examinations. The blood glucose level required prior to FDG administration was set to be ≤ 150 mg/dL. Whole-body imaging was performed between 60 to 80 minutes after injection of FDG (from 3 to 7 MBq/kg) and the same procedure was repeated for each of the three PET/CT examinations required in this protocol. FDG-PET data from the 18 centers were centrally collected and analyzed. For the present analysis, only patients with FDG-avid bone marrow focal lesions (FL), defined as uptake higher than liver background, were considered. In these patients with FL, diffuse bone marrow involvement (BMI) and extra-medullary disease (EMD) were also described⁶.

For baseline and interim FDG-PET images, the most intense bone marrow FL (not necessarily the same at baseline and at interim analysis) was considered for SUV measurement and the percentage difference of SUVmax (Δ SUVmax) between baseline and interim FDG-PET was calculated as previously described¹¹. In cases where the lesions disappeared after three cycles of RVD, the SUVmax was set at 1. Patients with a new lesion at three months (suspected progressive disease) were excluded from this analysis.

In addition to SUVmax, a visual analysis using the standard Deauville 5-point scale (DS)¹² on the most intense residual lesion was done during the interim FDG-PET analysis, as proposed in the IMPeTUS Italian criteria¹³, and patients were classified as DS 1-3 or DS 4-5.

For the purpose of comparison, the Δ SUVmax between the most intense lesion (either FL, BMI or EMD) at baseline and after three cycles of RVD (not necessarily identical) was also considered. For this analysis, and in order to minimize false positive results due to a BMI

6

signal after chemotherapy, we chose to disregard patients with the highest SUVmax regarding BMI after three cycles of RVD when their baseline BMI had been considered negative.

Since SUVmax values may harbor significant bias and because of potential variance due to the multicentric nature of this study¹⁴, a normalization of the SUVmax was performed against the liver SUVmax (ratio between FL SUVmax and liver SUVmax), as already successfully done in interim PET analyses in patients with Hodgkin lymphoma¹⁵. The percentage difference of this normalized SUVmax was depicted as $\Delta rSUVmax$ in our study and assessed using the same population as for $\Delta SUVmax$. A similar analysis was also performed considering $\Delta rSUVmax$ between the most intense lesion (either FL, BMI or EMD) at baseline and after three cycles of RVD as described previously.

Statistical analysis

PFS was the period from the end of the three cycles of RVD to the date of documented progressive disease, death from any cause or last follow-up. Association with PFS was examined using a univariate Cox regression model and considering quantitative parameters (SUVmax, $\Delta SUVmax$ or $\Delta rSUVmax$) as dichotomized variables. Because PFS was significantly prolonged in the transplantation group of the IMAJEM population⁶ (median, 50 months v 36 months, respectively), the analysis was also conducted adjusted for treatment arms. Age, hemoglobin, the revised International Staging System (R-ISS) and biochemical response after three cycles of RVD according to IMWG criteria^{7,16} were also considered in this univariate analysis. A correction for multiple testing was subsequently performed using the Benjamini-Hochberg approach. Parameters demonstrating significant association with PFS at univariate level were then evaluated using a stepwise multivariate Cox analysis including no more than four variables given the number of events observed (20 progressions) and the rule of thumb (at least 5 to 10 events per variable). The R-ISS and biochemical response were also included in the multivariate model. The optimal $\Delta SUVmax$ threshold was derived from the maximally selected rank statistics¹⁷ from the 'maxstat' R package and used to compare high- and low-risk groups for quantitative parameters by choosing the cut-off point associated with the most significant relation with outcome. The hazard ratio (HR) and associated *p* values were derived for these dichotomized quantitative parameters. The survival curves were drawn using the Kaplan-Meier method and the difference evaluated with the exact log-rank test. A value of *p* < 0.05 was considered statistically significant. All tests were conducted with R version 3.4.1 (R Foundation, Vienna, Austria).

Results

Among the 134 patients enrolled in the IMAJEM study, 71 patients with lesions more intense than liver background were considered for this analysis (Figure S1). Patient demographic and clinical characteristics were similar to those of the entire IMAJEM population⁶. Thirty eight patients were treated in arm A and 33 in arm B. Our cohort included 71 patients with FL (100%), 46 patients (65%) with diffuse BMI and 6 patients (8%) with EMD at baseline. Median baseline FL SUVmax was 6.4 (ranging from 3.5 to 27.1) with 65 (92%) of the 71 FDG-avid MM patients presenting a SUVmax value higher than 4.2. On interim FDG-PET analysis, 45 patients (64%) still presented with FL, 25 (35%) patients had BMI and 2 patients (2%) had EMD. Median residual FL SUVmax was 1.7 (ranging from 1.0 to 15.0).

The characteristics of the studied parameters are summarized in Table 1. The median follow-up time was 21.5 months. Twelve progressions occurred in arm A while 8 occurred in arm B.

The univariate Cox regression analysis for survival outcomes considering each parameter is shown in Table 2. The only significant parameter for PFS was Δ SUVmax ($p=0.003$ after multiple tests correction) calculated using the most intense FL. Two examples are shown in Figure S2. It is interesting to note that interim visual analysis using DS 1-3 vs 4-5, interim SUVmax and known prognostic factors, such as R-ISS, biochemical response (very good partial response (VGPR) or better) after three cycles of RVD in the same population did not reach significance in the univariate analysis (Table 2).

The Kaplan-Meier analysis for Δ SUVmax resulted in a median PFS of 22.6 months for those patients in the high-risk group (Δ SUVmax $>-25\%$). The median PFS has not been reached in the low-risk group (Δ SUVmax $\leq-25\%$) with a HR=4.41 ($p<0.001$) (Figure 1). Results were similar when adjusted for treatment arm ($p=0.005$).

In the multivariate analysis, only Δ SUVmax ($p=0.001$, HR=5.56; 95% CI: 1.96 – 15.81) and biochemical response (VGPR or better) after three cycles of RVD ($p=0.025$, HR=0.29; 95% CI: 0.1 – 0.85) appeared as independent prognostic factors with a more discriminative HR for Δ SUVmax.

Incorporation of BMI and EMD in the analysis did not alter the results (Table 3) except for only Δ SUVmax being retained in the multivariate analysis ($p=0.023$; HR=3.41; 95% CI: 1.18 – 9.84).

A similar evaluation was conducted using liver normalization of SUVmax (Table 3). The survival curves for Δ rSUVmax exhibited a similar trend with a good stratification between the high- and low risk groups (HR=3.26; 95% CI: 1.22 – 8.73; $p=0.007$) and a median PFS of 22.6 months vs not reached, respectively. Again, a similar trend was reported when taking into account BMI, EMD and normalizing by the liver SUVmax (Table 3).

Discussion

This study demonstrates the added prognostic value of a quantitative measurement of early treatment-induced changes in SUVmax after three treatment cycles compared to visual analysis in patients with FDG-avid MM. To our knowledge, this paper is the first to report the relevance of SUVmax variation in MM patients treated homogeneously in a prospective clinical trial in the setting of frontline intensive therapy, including proteasome inhibitors and immunomodulatory drugs. It is difficult to compare our results to previously published studies due to differences in therapies and PET interpretation criteria applied. Usmani et al. reported a significant prognostic value of FDG-PET after seven days of an induction therapy using two cycles of VTD-PACE (bortezomib, thalidomide, dexamethasone; 4-day continuous infusions of cisplatin, doxorubicin, cyclophosphamide, etoposide; Total Therapy 3 protocol, $p=0.0003$). The prognostic PET biomarker in the study by Usmani et al. was the persistence of more than three FL¹⁸. In contrast, the FDG PET results after three courses of RVD in the IMAJEM study affected PFS without reaching significance, however, the PET criterion considered was normalization⁶.

In the present study, we hypothesized that a semi-quantitative method could potentially be more sensitive than visual analysis to evaluate early response to chemotherapy, as has been shown in lymphoma,¹⁹⁻²². Indeed, the ability to identify slow and fast responders is important, as early tumor shrinkage is associated with a deeper response²³. We decided to compare the standard DS validated in lymphoma to SUVmax and Δ SUVmax. Visual analysis also appeared relevant for application in MM as suggested by the recently proposed IMPeTUS criteria¹³, even if not yet prospectively validated. As previously done in lymphoma^{19,20}, only MM patients with FDG-avid lesions at baseline (uptake higher than liver background) were included in the analysis, considering a low baseline SUVmax as a drawback for Δ SUVmax calculation²⁴. This subgroup might represent a necessary limitation of our study, however, patients with low FDG-avid MM may harbor a more indolent form of the disease². Only 6 (8%) of our patients presented a SUVmax lower than the previously reported⁴ prognostic threshold of 4.2. Moreover, patients showing new lesions after three cycles of RVD suggesting progression were not included in the analysis of Δ SUVmax. Considering the specific population included in our study, a semi-quantitative analysis using Δ SUVmax was superior to interim SUVmax and visual analysis based on DS criteria in predicting PFS. This strong prognostic value was observed in both treatment arms and independent of biochemical response assessed according to the IMWG criteria⁷. Results have yet to be interpreted with caution due to the relatively smaller number of patients with biochemical response assessment after 3 cycles of RVD ($n=57$). It was also confirmed using a normalized Δ rSUVmax allowing for a reduction in the variability of SUV measurements. Although reactive bone marrow hyperplasia induced by G-CSF treatment or due to repopulating marrow in patients with anemia is not rare post-chemotherapy, the Δ SUVmax calculation remained significantly associated with PFS when BMI SUVmax was considered in the quantitative analysis in patients with BMI at baseline.

Our results are consistent with previous findings in lymphoma. Indeed, in patients with FDG-avid MM, the Δ SUVmax-method may represent the dynamic and continuous process of metabolic reduction of tumor cells during treatment more accurately than a visual scale^{1,20}. Moreover, it was found to have higher inter-observer reproducibility and outcome prediction performance than DS in patients with FDG-avid lesions^{8,11,19}.

This study had some inherent limitations as it explored two sets of parameters which do not necessarily reflect the same situation at baseline and after three cycles of RVD. It was retrospectively designed to address the question of the prognostic value of prospectively measured markers, which may be useful for imaging-guided therapy in combination with baseline risk factors. At the current time, prognostic parameters are identified at diagnosis, before the onset of therapy. The aim is to use these parameters to define risk-adapted therapies, or to devise trial protocols focusing on patients with specific risk factors. Of note, other prognostic parameters can now be defined at specific time-points during therapy. These “dynamic” prognostic parameters, such as response after induction or imaging biomarkers such as delta SUV, could be used in the future to change or adapt therapy in case of suboptimal response. Our study shows the importance of PET in this dynamic assessment of response, which could be complementary to the assessment of MRD within the bone marrow by next-generation flow cytometry or next-generation sequencing.

In this study, Δ SUVmax was a powerful tool to predict long-term outcomes in patients with FDG-avid MM and superior to visual assessment. This study shows the potential added value of integrating FDG-PET alongside known prognostic factors, such as R-ISS and biochemical response, in the management of MM. This prognostic biomarker should be confirmed in other cohorts of MM patients.

Table 1: Patient characteristics and PET parameters studied after three cycles of RVD

Parameters		Number of missing values
<i>At diagnosis</i>		
Age (years) (median, range)	61 (37 – 65)	0
Male (%)	44 (62)	0
R-ISS I/II/III (%)	12 (17)/45 (63)/14 (20)	0
Hemoglobin (g/dL) (median, range)	10.0 (8.0 – 14.0)	0
Presence of BMI (%) / EMD (%)	47 (66) / 6 (8)	0
Median baseline SUVmax (range)	6.4 (3.5 – 27.1)	0
<i>After 3 cycles of RVD</i>		
Biochemical response : SD/PR/VGPR/CR (%)	0 (0) / 27 (47) / 27 (47) / 3 (6)	14
FL or EMD residual DS: 1-3(%) ; 4-5 (%)	42 (59) ; 29 (41)	0
Median residual highest FL SUVmax (range)	1.7 (1.0 – 15.0)	0
Median Δ SUVmax in % (range)	-71 (-96 – +62.5)	0
Δ SUVmax \leq -25% (%)	56 (79)	
Δ SUVmax $>$ -25% (%)	15 (21)	

R-ISS: Revised International Staging System; SUVmax: maximum standardized uptake value; DS: Deauville Scale; FL: Focal Lesion; RVD: lenalidomide, bortezomib and dexamethasone; SD: stable disease; PR: partial response; VGPR: very good partial response; CR: complete response; BMI: diffuse bone marrow involvement; EMD: extra-medullary disease

Table 2: Univariate Cox regression analysis for PFS after three cycles of RVD

Parameter	Hazard ratio	95% confidence interval	<i>p</i> value
Age (>50)	2.15	0.83 – 5.61	0.12
R-ISS II to III	2.35	0.90 – 6.13	0.08
Hemoglobin (>9.4g/dL)	2.08	0.82 – 5.28	0.12
Biochemical Response (VGPR or better)	0.37	0.13 – 1.06	0.06
Interim DS (4-5 vs 1-3)	1.95	0.78 – 4.92	0.11
Δ SUVmax (>-25%)	4.54	1.85 – 11.11	<0.009

In bold: *p* values that remain still significant after multiple test corrections

; R-ISS: Revised International Staging System; VGPR: very good partial response; DS: Deauville Score; SUVmax: maximum standardized uptake value.

Table 3: Univariate and multivariate Cox regression analysis for PFS after three cycles of RVD and for the different definition of variation of SUVmax

	Univariate Cox analysis		Multivariate Cox analysis ^a		
	HR (95 % CI)	P value	Variable	HR (95 % CI)	P value
Δ SUVmax ^{FL}	4.54 (1.85 – 11.11)	<0.001	Δ SUVmax	5.56 (1.96 – 15.81)	0.001
			VGPR or better	0.29 (0.10 – 0.85)	0.025
Δ rSUVmax ^{FL}	3.33 (1.35 – 7.69)	0.008	Δ rSUVmax	3.02 (1.12 – 8.16)	0.029
			VGPR or better	0.32 (0.11 – 0.92)	0.035
Δ SUVmax ^{FL-BMI-EMD}	3.43 (1.31 – 9.03)	0.012	Δ SUVmax ^{FL-BMI-EMD}	3.41 (1.18 – 9.84)	0.023
Δ rSUVmax ^{FL-BMI-EMD}	3.65 (1.27 – 10.47)	0.016	Δ rSUVmax ^{FL-BMI-EMD}	2.87 (0.96 – 8.63)	0.060

^a Multivariate model including Δ SUVmax, R-ISS and biochemical response (VGPR or better) (n=57)

FL: Focal Lesion; BMI: diffuse bone marrow involvement; EMD: extra-medullary disease

Δ SUVmax^{FL}: percentage difference of SUVmax between FL at baseline and interim FDG-PET

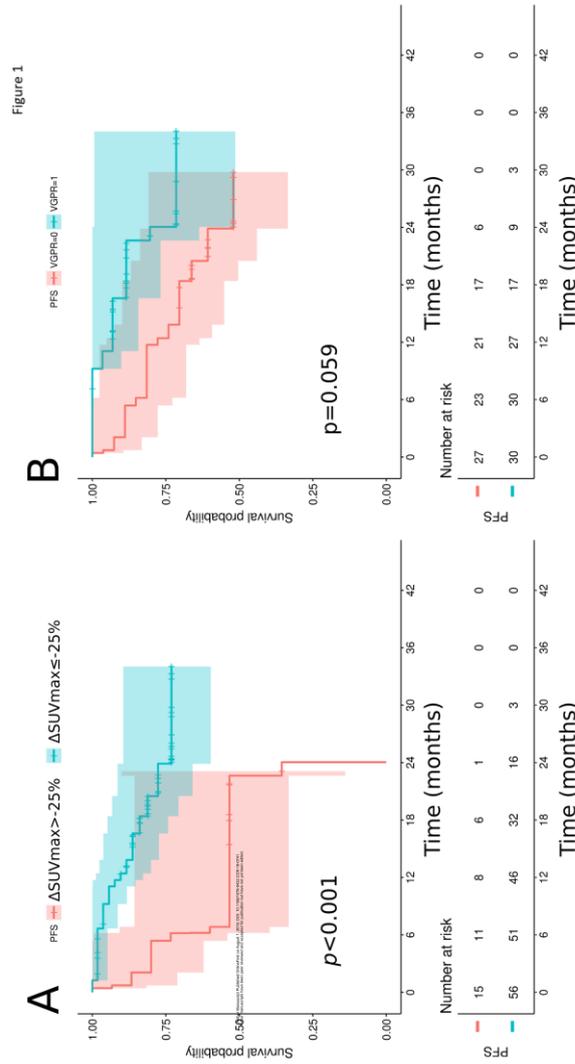
Δ rSUVmax^{FL}: percentage difference of SUVmax normalized against the liver SUVmax between FL at baseline and interim FDG-PET

Δ SUVmax^{FL-BMI-EMD}: percentage difference of SUVmax between either FL, BMI or EMD at baseline and interim FDG-PET

Δ rSUVmax^{FL-BMI-EMD}: percentage difference of SUVmax normalized against the liver SUVmax between either FL, BMI or EMD at baseline and interim FDG-PET

In bold: significant *p* values

Figure 1: Kaplan-Meier curves for PFS according to Δ SUVmax of the most intense FL between FDG-PET at diagnosis and after three cycles of RVD and biochemical response after three cycles of RVD (VGPR or better)



References:

1. Cavo M, Terpos E, Nanni C, et al. Role of (18)F-FDG PET/CT in the diagnosis and management of multiple myeloma and other plasma cell disorders: a consensus statement by the International Myeloma Working Group. *Lancet Oncol.* 2017;18(4):e206–e217.
2. Bailly C, Leforestier R, Jamet B, et al. PET Imaging for Initial Staging and Therapy Assessment in Multiple Myeloma Patients. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2):.
3. Bartel TB, Haessler J, Brown TLY, et al. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood.* 2009;114(10):2068–2076.
4. Zamagni E, Patriarca F, Nanni C, et al. Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood.* 2011;118(23):5989–5995.
5. McDonald JE, Kessler MM, Gardner MW, et al. Assessment of Total Lesion Glycolysis by 18F FDG PET/CT Significantly Improves Prognostic Value of GEP and ISS in Myeloma. *Clin. Cancer Res.* 2017;23(8):1981–1987.
6. Moreau P, Attal M, Caillot D, et al. Prospective Evaluation of Magnetic Resonance Imaging and [(18)F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-Computed Tomography at Diagnosis and Before Maintenance Therapy in Symptomatic Patients With Multiple Myeloma Included in the IFM/DFCI 2009 Trial: Results of the IMAJEM Study. *J. Clin. Oncol.* 2017;JCO2017722975.
7. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2016;17(8):e328-346.
8. Lin C, Itti E, Haioun C, et al. Early 18F-FDG PET for Prediction of Prognosis in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma: SUV-Based Assessment Versus Visual Analysis. *J Nucl Med.* 2007;48(10):1626–1632.
9. Nanni C, Cottreau AS, Lopci E, et al. Report of the 6th International Workshop on PET in lymphoma. *Leuk. Lymphoma.* 2017;58(10):2298–2303.
10. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *New England Journal of Medicine.* 2017;376(14):1311–1320.
11. Itti E, Lin C, Dupuis J, et al. Prognostic value of interim 18F-FDG PET in patients with diffuse large B-Cell lymphoma: SUV-based assessment at 4 cycles of chemotherapy. *J. Nucl. Med.* 2009;50(4):527–533.
12. Meignan M, Gallamini A, Meignan M, Gallamini A, Haioun C. Report on the First International Workshop on Interim-PET-Scan in Lymphoma. *Leuk. Lymphoma.* 2009;50(8):1257–1260.

13. Nanni C, Versari A, Chauvie S, et al. Interpretation criteria for FDG PET/CT in multiple myeloma (IMPeTUs): final results. IMPeTUs (Italian myeloma criteria for PET USe). *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2018;45(5):712–719.
14. Fahey FH, Kinahan PE, Doot RK, et al. Variability in PET quantitation within a multicenter consortium. *Med Phys*. 2010;37(7):3660–3666.
15. Annunziata S, Cuccaro A, Calcagni ML, et al. Interim FDG-PET/CT in Hodgkin lymphoma: the prognostic role of the ratio between target lesion and liver SUVmax (rPET). *Ann Nucl Med*. 2016;30(8):588–592.
16. Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20(9):1467–1473.
17. Lausen B, Lerche R, Schumacher M. Maximally Selected Rank Statistics for Dose-Response Problems. *Biom. J*. 2002;44(2):131–147.
18. Usmani SZ, Mitchell A, Waheed S, et al. Prognostic implications of serial 18-fluoro-deoxyglucose emission tomography in multiple myeloma treated with total therapy 3. *Blood*. 2013;121(10):1819–1823.
19. Itti E, Meignan M, Berriolo-Riedinger A, et al. An international confirmatory study of the prognostic value of early PET/CT in diffuse large B-cell lymphoma: comparison between Deauville criteria and Δ SUVmax. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2013;40(9):1312–1320.
20. Meignan M, Gallamini A, Itti E, et al. Report on the Third International Workshop on Interim Positron Emission Tomography in Lymphoma held in Menton, France, 26–27 September 2011 and Menton 2011 consensus. *Leukemia & Lymphoma*. 2012;1–6.
21. Meignan M, Itti E, Gallamini A, Younes A. FDG PET/CT imaging as a biomarker in lymphoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2015;42(4):623–633.
22. Barrington SF, Kluge R. FDG PET for therapy monitoring in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2017;44(Suppl 1):97–110.
23. Dytfeld D, Griffith KA, Friedman J, et al. Superior overall survival of patients with myeloma achieving very good partial response or better to initial treatment with bortezomib, pegylated liposomal doxorubicin, and dexamethasone, predicted after two cycles by a free light chain- and M-protein-based model: extended follow-up of a phase II trial. *Leuk. Lymphoma*. 2011;52(7):1271–1280.
24. Casasnovas R-O, Meignan M, Berriolo-Riedinger A, et al. SUVmax reduction improves early prognosis value of interim positron emission tomography scans in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2011;118(1):37–43.

Titre : Nouveaux Biomarqueurs en imagerie du Myélome Multiple

Mots clés : Myélome Multiple, Biomarqueurs, Imagerie, immunoTEP, hétérogénéité

Résumé : Malgré d'importants progrès lors de cette dernière décennie, le myélome multiple reste encore une maladie incurable et l'identification de nouveaux biomarqueurs permettant de toujours mieux sélectionner les patients de mauvais pronostic éligibles à une thérapie plus intensive demeure d'actualité. L'imagerie en médecine nucléaire s'inscrit parfaitement dans cette démarche en permettant d'observer in vivo, de façon non invasive, l'expression et la distribution des biomarqueurs accessibles dans les cibles tumorales. Cette hétérogénéité de signatures moléculaires peut être appréciée qualitativement ou quantitativement, par l'intermédiaire de multiples traceurs apportant des informations phénotypiques, métaboliques, complémentaires ou en explorant les distributions et fixations de chaque traceur individuellement. La première partie de ce travail a été consacrée à l'évaluation pré-clinique d'anticorps ciblant le syndecan-1 ou CD138, une protéoglycane utilisée comme marqueur standard par de nombreux laboratoires pour l'identification et la purification de cellules myélomateuses. La seconde partie a évalué des paramètres quantitatifs d'analyse de l'imagerie TEP caractérisant l'hétérogénéité intra-tumorale afin de les corrélérer aux données histologiques. La troisième partie de ce travail a consisté en l'évaluation de la pertinence des paramètres quantitatifs d'analyse de l'imagerie TEP-FDG en clinique sur les données de la cohorte IMAJEM.

Title : New Biomarkers in Multiple Myeloma Imaging

Keywords : Multiple Myeloma, Biomarker, Imaging, ImmunoPET, Heterogeneity

Abstract : Despite significant progress over the past decade, multiple myeloma remains an incurable disease and the identification of new biomarkers to better select patients with poor prognosis who are eligible for more intensive therapy remains a priority. Nuclear medicine imaging fits perfectly into this approach by allowing non-invasive in vivo observation of the expression and distribution of accessible biomarkers in tumor targets. This heterogeneity of molecular signatures can be assessed qualitatively or quantitatively, through multiple tracers providing complementary, phenotypic and metabolic, information or by exploring the distributions and uptakes of each tracer. The first part of this work was devoted to the pre-clinical evaluation of antibodies targeting syndecan-1 or CD138, a proteoglycan used as a standard marker by many laboratories for the identification and purification of myeloma cells. The second part evaluated quantitative parameters for the analysis of PET imaging characterizing intra-tumor heterogeneity in order to correlate them with histological data. The third part of this work consisted in evaluating the relevance of quantitative parameters for the analysis of PET-FDG imaging in the clinic using the data of the IMAJEM cohort.