UNIVERSITE BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE



THESE DE DOCTORAT DE

ONIRIS Comue Universite Bretagne Loire

ECOLE DOCTORALE N° 605 *Biologie Santé* Spécialité : Médecine nucléaire et radiopharmaceutique

Par Floriane MORIO Ep. ETIENNE

Ciblage préclinique du CD22 canin pour l'imagerie phénotypique (immuno-TEMP) et la radioimmunothérapie des chiens spontanément atteints de lymphomes B diffus à grandes cellules

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 31 octobre 2019

Unité de recherche : Equipe 13 : Oncologie nucléaire, CRCINA, UMR 1232 INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Damien Huglo	PU-PH, Université de Lille, Lille
Jean-Luc Cadoré	Pr, VETAGRO-SUP, Marcy l'Etoile

Composition du Jury :

Président :	Vanessa Louzier	Pr, VETAGRO-SUP, Marcy l'Etoile
Examinateurs :	Caroline Bodet-Milin Valérie Gouilleux-Gruart	PU-PH, Université de Nantes, Nantes MCU-PH, Faculté de Médecine de Tours, Tours
Directeur de thèse :	François Davodeau	CR, CRCINA, INSERM, Nantes
Co-encadrante de thèse :	Catherine Ibisch	MC, Oniris, Nantes

Remerciements

A Messieurs les Professeurs Huglo et Cadoré,

Vous me faites le grand honneur d'être rapporteurs de ce travail et de vous déplacer pour la soutenance. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Mesdames les Docteurs Gouilleux-Gruart et Louzier,

Je vous adresse mes plus sincères remerciements pour avoir accepté de faire partie de ce jury et de juger ce travail. Recevez ici le témoignage de tout mon respect.

A Monsieur le Docteur Davodeau,

François, merci de m'avoir fait le grand honneur d'encadrer cette thèse et de m'avoir accordé ta confiance. Tes conseils avisés et ton sens critique, ainsi que ta disponibilité et ta patience, m'ont permis d'aller au bout de cette aventure. Ta rigueur n'a d'égale que ton intérêt pour les résultats : nos discussions scientifiques m'ont été indispensables.

Je suis très heureuse d'avoir partagé cette « aventure canine » avec toi, et ce jusqu'à son dénouement final plus que prometteur.

A Madame le Docteur Ibisch,

Catherine, je te remercie sincèrement pour nos discussions et tes conseils qui m'ont accompagnés tout au long de ces années. Tu m'as ouvert les portes de l'oncologie comparée et de la recherche, et pour cela je t'en suis reconnaissante.

A Madame le Professeur Bodet-Milin,

Caroline, je te remercie pour ta bienveillance et tes encouragements, pour tes conseils avisés, scientifiques ou personnels, pour ton engagement dans ce projet CD22 canin et ta disponibilité. Reçois ici le témoignage de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Abadie,

Jérôme, je te remercie pour ta confiance depuis les débuts d'AMaROC, pour ton écoute et ton infaillible enthousiasme, mais aussi pour m'avoir lancé ce « défi » de thèse de sciences. C'est un plaisir de travailler dans ton équipe.

A Monsieur le Professeur Chérel, responsable de l'équipe 13, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire.

En remerciement de ta bienveillante attention, trouve ici l'expression de ma gratitude.

A tous les membres de l'équipe AMaROC,

A ceux qui y étaient et qui y sont encore, à ceux sont venus partager une tranche de leur vie : il s'agissait de travail mais pas seulement! Merci pour votre bonne humeur et ce fort sentiment d'appartenance à quelque chose de plus grand.

Une mention spéciale pour le Docteur (le vrai titre !) Chouin, qui a toujours pris sur son temps pour initier tant bien que mal la naïve que je suis à la dosimétrie et répondre plusieurs fois aux mêmes questions. Un immense merci Nicolas pour ta patience et ta bienveillance.

Je tiens également à remercier chaleureusement Sonia Bécavin, Marie Roussel, Tiffanie Frécon-Gaudard et Esther Piccirillo pour leur amitié et leur aide au pied levé ; Frédérique Nguyen pour son inestimable pragmatisme et son engagement sans faille ; Elie Dagher, Julie Rousseau, Matthieu Moreau et Nicolas Sas, pour leur amitié et les tranches de rigolade.

A tous les membres de l'équipe 13,

Mes plus chaleureux remerciements pour votre accueil et votre implication dans mon travail : vous m'avez été indispensables pour comprendre les rouages du laboratoire et pour mener à bien un certain nombre de manips.

Je tiens particulièrement à remercier Maxime Berthaud, Catherine Maurel, Maya Diab, Marion Drapeau, Alain Faivre-Chauvet, Patricia Le Saec, Ludovic Ferrer, Caroline Rousseau et Sébastien Gouard pour leur encadrement et le plaisir que j'ai eu à discuter avec eux.

Un grand merci également,

Au « couloir » de médecine-imagerie d'Oniris, pour vos encouragements, votre bienveillance et votre amitié inestimable,

A la « team CRBA », pour votre compréhension et votre gentillesse,

Au service de Nutrition d'Oniris, pour avoir mis à notre disposition des animaux de leur chenil,

A Agnès Béghin, pour son travail et sa confiance dans mes capacités d'encadrement,

A Aurélien Vidal et Mickaël Bourgeois, et plus largement au cyclotron ARRONAX, pour les radiomarquages, leur disponibilité et leur réactivité,

A Thomas, mon irréductible mari,

Nous avons commencé à deux et nous finissons à quatre... Ta présence et ton amour ont été mes plus grands soutiens.

A Maëlys et Brieuc, mes petits chéris,

Vos rires et vos tendres attentions sont ma plus grande motivation.

A ma soeurette et à mon père,

A ma famille,

Merci pour votre présence et vos encouragements. Merci d'y avoir cru quand je n'y croyais plus.

Rien ne sert de courir, il faut partir à point. Le lièvre et la tortue, Jean de La Fontaine.

A mes amis,

Merci d'avoir veillé à garder intact le lien de nos relations malgré les épreuves de la prépa, des études, de l'internat puis du doctorat : je vous adresse mes plus sincères félicitations et vous tire mon chapeau !

A celle qui m'a tant aimée et tant donné, Que j'ai tant admirée et que j'admire d'autant plus depuis que je suis moi-même maman, J'honore du mieux possible ma promesse, et je m'applique. Tu me manques.

> A tous ceux partis trop tôt, Guéna, Patrice, Mémé et Pépé, Aude et Josiane, Baptiste et Edith, Yanik, Marie-Martine, Mélina, Laëtitia, Brigitte, Nous nous souvenons.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	7
Abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	23
Liste des annexes	
PREAMBULE	

1. LA RA	DIOIMMUNOTHERAPIE	
1.1. Gé	néralités sur la radioimmunothérapie	
1.1.1.	Définition de la radioimmunothérapie	
1.1.2.	Caractéristiques de la RIT alpha (α)	
1.1.3.	Caractéristiques de la RIT bêta (β-)	35
1.1.4.	Caractéristiques de la RIT Auger	
1.2. Ve	cteurs utilisés pour la radioimmunothérapie bêta –	
1.2.1.	Anticorps monoclonaux	
1.2.2.	Fragments d'anticorps monoclonaux	
1.2.3.	Affibodies et peptides	46
1.3. Fa	cteurs d'efficacité de la RIT bêta	
1.4. Ap	port de l'imagerie quantitative	
1.4.1.	Définition de l'imagerie phénotypique	53
1.4.1	1.1. Principes de la TEMP et de la TEP	53
1.4.1	1.2. Caractéristiques de l'imagerie phénotypique	55
1.4.2.	Dosimétrie	56
1.4.2	2.1. Activité cumulée	56
1.4.2	2.2. Dose absorbée	58

2. RADIO	IMMUNOTHERAPIE ET PRATIQUES CLINIQUES CHEZ L'HOMME	
2.1. RI	۲ des tumeurs solides	59
2.1.1.	La radioimmunothérapie compartimentée	60
2.1.2.	Radiosensibilisation des cellules cancéreuses en association avec la RIT	62
2.1.3.	Améliorer la pénétration intratumorale et limiter la toxicité : la radioimmunothér	apie pré-ciblée
	(PRIT)	63
2.1.4.	La RIT fractionnée	64
2.1.5.	Utilisation de vecteur de plus petite taille, les peptides	65
2.1.6.	La RIT alpha	67
2.1.7.	Le ciblage d'antigène intracellulaire	67
2.2. RI	۲ des tumeurs hématologiques	
2.2.1.	Myélome multiple	68
2.2.2.	Leucémies	70

2.2.3. Lymphome non hodgkinien	71
2.2.3.1. RIT anti-CD20	71
2.2.3.2. RIT anti-CD22	75
2.3. RIT du DLBCL	77
2.3.1. Généralités sur le DLBCL humain	77
2.3.1.1. Histologie et classification des DLBCL	77
2.3.1.2. Pronostic des DLBCL	80
2.3.2. Prise en charge thérapeutique du DLBCL	83
2.3.3. RIT du DLBCL	86
2.3.3.1. RIT anti-CD20	86
2.3.3.2. RIT anti-CD22	87
3. INTERET DU MODELE SPONTANE CANIN DE DLBCL	88
3.1. Modèles animaux expérimentaux de DLBCL	
3.2. Modèles spontanés canins en oncologie	90
3.2.1. Proximité phylogénétique et environnementale	90
3.2.2. Modèles de cancers spontanés canins	91
3.2.2.1. Cas de l'ostéosarcome canin	
3.2.2.2. Cas du carcinome mammaire triple négatif canin	
3.2.2.3. Cas du mélanome malin canin	94
3.2.2.4. Cas du sarcome histiocytaire disséminé canin	95
3.3. DLBCL canin	96
3.3.1. Classification des DLBCL canins et score de hit	96
3.3.2. Présentation clinique et stade des DLBCL canins	97
3.3.3. Thérapie	99
3.4. Oncologie et médecine nucléaire chez l'animal de compagnie	99
3.4.1. La TEMP au gallium-67	
3.4.2. La TEP/TDM au fluorodésoxyglucose radiomarqué au fluor-18 (¹⁸ F-FDG)	
3.4.3. La TEP/TDM à la fluorothymidine radiomarquée au fluor-18 (¹⁸ F-FLT)	
3.5. Positionnement du modèle spontané canin de DLBCL	101

CHAPITRE 2.	OBJECTIFS DU TR	VAIL DE THESE	
-------------	------------------------	----------------------	--

CHAPIT	RE 3. MATERIELS ET METHODES	
1. AN	VTICORPS	111
2. LI	GNEES CELLULAIRES EXPRIMANT LE CD22	
2.1.	Lignée cellulaire Daudi exprimant le CD22 humain (hCD22)	112
2.2.	Lignée cellulaire CLBL-1 exprimant le CD22 canin (cCD22)	113
3 тғ	ST DF CROSS-RFACTIVITE PAR METHODE FLISA SANDWICH · CARTOGRAPHI	(F
EPITO	PIQUE	
4. CY	TOMETRIE EN FLUX	
4.1.	Détermination de l'affinité relative (K _D) de l'anticorps hLL2 dirigé contre le CD22 114	2 humain
4.2.	Etude de l'internalisation des complexes antigènes-anticorps	115
4.3.	Evaluation de la positivité de nœuds lymphatiques canins tumoraux vis-à-vis du	cCD22.116
5. AI	DAPTATION DES ANTICORPS ANTI-cCD22 POUR LA MEDECINE NUCLEAIRE	
5.1.	Marquage à l'iode-125	
5.2.	Marquage des anticorps à des radioéléments métalliques	
5.	2.1. Couplage des vecteurs à un agent chélatant, le DOTA	

5.2.1.1. Couplage au DOTA	118
5.2.1.2. Détermination du nombre de ligands par anticorps	118
5.2.2. Marquage au cuivre-64	119
5.2.3. Marquage à l'indium-111	119
5.3. Détermination de l'immunoréactivité des radiopharmaceutiques	
5.3.1. Méthode de Lindmo	121
5.3.2. Utilisation de billes magnétiques coatées avec du cCD22	122
5.3.2.1. Production des billes magnétiques coatées avec du cCD22	122
5.3.2.2. Détermination de l'immunoréactivité des anticorps marqués à l'indium-111	122
6. ETUDES IN VIVO DANS UN MODELE MURIN XENOGREFFE	
6.1. Modèle murin xénogreffé	123
6.2. Etude de biodistribution des anticorps anti-cCD22 marqués à l'iode-125	
6.3. Imagerie phénotypique immuno-TEP/TDM	
7. ETUDE IN VIVO DANS L'ESPECE CANINE	
7.1. Détermination du volume sanguin des organes	
7.1.1. Marquage d'albumine humaine au technetium-99m	
7.1.2. Etude de la stabilité du ^{99m} Tc-VASCULOCIS dans le sérum de chien	
7.1.3. Imagerie TEMP/TDM au ^{99m} Tc-VASCULOCIS	125
7.2. Etude de biodistribution de l'anticorps anti-cCD22 ¹¹¹ In-DOTA-10C6 chez des chien	s sains
d'expérimentation et des chiens développant spontanément un DLBCL	
7.2.1. Imagerie quantitative immuno-TEMP/TDM	
7.2.1.1. Activité spécifique inférieure à 10 MBq.mg ⁻¹ : en présence d'une co-infusion d'une g	grande
quantité d'anticorps froid 10C6	
7.2.1.2. Activité spécifique supérieure à 50 MBq.mg ⁻¹ : en l'absence de co-infusion d'une gra	ande
quantité d'anticorps froid 10C6	127
7.2.1.3. Paramètres d'acquisition et de reconstruction des images TEMP/TDM	127
7.2.2. Pharmacocinétique sanguine	128
7.3. Quantification des imageries phénotypiques	
7.3.1. Contourage des régions d'intérêt	128
7.3.2. Dosimétrie	128
7.4. Test ELISA indirect : monitoring de la réponse immunitaire anti-anticorps murins	129

CHAPITRE 4	• RESULTATS	131	L

1.	CARTOGRAPHIE EPITOPIQUE DU cCD22	.134
		-

2. CINETIQUE D'INTERNALISATION DES COMPLEXES ANTIGENE-ANTICORPS ANT	I-CD22 136
2.1. Comportement internalisant de l'anticorps hLL2	137
2.1.1. Calcul de l'affinité relative (K _D) de l'anticorps hLL2	
2.1.2. Cinétique d'internalisation du complexe hCD22-hLL2	
2.2. Comportement internalisant des anticorps anti-cCD22	

3. ETUDE PHARMACOCINETIQUE A L'AIDE DE QUATRE ANTICORPS ANTI-CCD22 MARQUES

A L'IOD	E-125
3.1.	Marquage des anticorps anti-cCD22 10C6, 1E3, 6B7 et 5C2 à l'iode-125141
3.2.	Immunoréactivité des anticorps anti-cCD22 ¹²⁵ I-10C6, ¹²⁵ I-1E3, ¹²⁵ I-6B7 et ¹²⁵ I-5C2142
3.3.	Etude de biodistribution des anticorps anti-cCD22 ¹²⁵ I-10C6, ¹²⁵ I-1E3, ¹²⁵ I-6B7 et ¹²⁵ I-5C2

4. ETUDE	E <i>IN VIVO</i> DANS UN MODELE MURIN XENOGREFFE	
4.1. Ad	aptation des anticorps anti-cCD22 pour leur utilisation en imagerie immuno-TE	P/TDM
4.1.1.	Couplage des anticorps anti-cCD22 5C2 et 10C6 au DOTA (avec résultats du nombre de	e ligands).
4.1.2.	Immunoréactivité des anticorps anti-cCD22 DOTA-5C2 et DOTA-10C6	
4.1.3.	Marquage des anticorps DOTA-5C2 et DOTA-10C6 au cuivre-64	
4.2. Etu	ude du comportement <i>in vivo</i> des anticorps ⁶⁴ Cu-DOTA-10C6 et ⁶⁴ Cu-DOTA-5C2	149
4.2.1.	Imagerie immuno-TEP/TDM	150
4.2.2.	Etude de biodistribution	

1. CONTEXTE DE LA MISE EN PLACE DE CET ESSAI PRECLINIQUE CHEZ L'ANIMAL

SPONT	ANEMENT MALADE	
1.1.	Besoin de la recherche clinique chez l'Homme	153
1.2.	Contexte juridique	155
1.3.	Etat des lieux de la médecine nucléaire dans la pratique vétérinaire en France	156
1.4.	Contraintes supplémentaires à ce qui est fait chez l'Homme	157
1.4	A.1. Radioprotection	157
1.4	.2. Anesthésies générales répétées	158

2. MISE AU POINT D'OUTILS POUR SE PLACER AU NIVEAU D'EXIGENCE DES ESSAIS CLINIQUES MENES CHEZ L'HOMME 160 2.1. Détection d'anticorps canins anti-10C6 160 2.1.1. Résultats chez les chiens sains 160 2.1.2. Résultats chez les chiens malades 162

2.2.	Radiomarquages à l'indium-111 et à l'yttrium-90 à l'APUI	.163
2.3.	Détermination de l'immunoréactivité du radiopharmaceutique ¹¹¹ In-DOTA-10C6	.167

Partie C. METHODOLOGIE D'EXPLOITATION DE L'IMAGERIE PHENOTYPIQUE169

1.	CORRELATION ENTRE LES DONNEES DU COMPTEUR GAMMA ET CELLES DES	
ACQ	UISITIONS TEMP/TDM 1	169

1.	DETERMINATION DE LA PHARMACOCINETIQUE SANGUINE DU RADIOPHARMACEUTIQUE
111]]	183-100TA-10C6

2.	CARACTERISATION DE LA BIODISTRIBUTION DU RADIOPHARMACEUTIQUE ¹¹¹ In-DOTA-
10C	6

3. CALCUL DE LA DOSE DEPOSEE AUX ORGANES DANS UN CONTEXTE DE RIT A L'YTTRIUM-

TITEL I									
4.1.	Calc	cul du volume sa	nguii	n des organes : foie, re	ins, rate, poumons e	et moelle	oss	euse	190
4.1	.1.	Caractéristiques	du	radiopharmaceutique	99mTc-VASCULOCIS	injecté	à	trois	chiens
		d'expérimentation	n						190
4.1	.2.	Détermination du	volu	me sanguin des organes	chez des chiens sains	d'expérir	nent	ation	
4.2.	Eval	luation de la dist	tribu	tion du pourcentage d	activité injectée pré	ésente da	ans l	es orga	anes
	en li	ien avec leur vol	ume	sanguin				-	192
4.3.	Calc	cul de la dose ab	sorbé	e aux organes liée à l'	accumulation du rac	liopharn	nace	eutique	dans

1. VALIDATION DU CIBLAGE TUMORAL CHEZ UN CHIEN SPONTANEMENT MALADE
1.1. Recrutement d'un chien spontanément malade2
1.1.1. Obtention du consentement éclairé des propriétaires
1.1.2. Diagnostic clinique et stade du DLBCL
1.1.3. Analyse histologique et immunohistochimique des nœuds lymphatiques envahis par le DLBCL
1.1.4. Evaluation de l'expression du cCD22 dans les nœuds lymphatiques tumoraux par cytométrie
flux2
1.2. Imagerie phénotypique après injection de l'anticorps anti-cCD22 ¹¹¹ In-DOTA-10C62
1.3. Pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe : comparaison avec les chiens
sains
2. EFFET DE LA VARIATION DE L'ACTIVITE SPECIFIOUE DU RADIOPHARMACEUTIOUE
INIECTE ¹¹¹ In-DOTA-10C6 SUR SA PHARMACOCINETIOUE
21 Pharmacocinétique sanguine
2.2. Riodistribution dans les organes sains
2.2. Etudo docimátrique dans un contexto de DIT à l'uttrium 00
2.3. Etude dosmieti ique dans un contexte de Ki i a i ytti iuni-90
2.3.1. Calcul de la dose absorbée aux organes liée à l'accumulation du radionharmaceutique 111
2.5.2. Calcul de la dose absorbee aux organes nee à l'accultulation du l'adiopharmaceutique
3 VALIDATION DU CIBLACE TUMORAL EN L'ARSENCE DE CO-INIECTION DE L'ANTICORPS
5. VALIDATION DO CIDEAGE TOMORAL EN L'ADSENCE DE CO-INJECTION DE L'ANTICONTS EDAID 1006 CHE7 IIN CHIEN ATTEINT DE DI DOI
2.1 Descritoment d'un abien grontenément atteint de DI DCI
5.1. Recrutement d'un chien spontanement ádairá das manuiátairas
3.1.1. Obtention du consentement éclaire des proprietaires
3.1.2. Diagnostic cimique et state du DLBCL
3.1.3. Analyse histologique et immunohistochimique des nœuds lymphatiques envanis par le DLBCL
214 Evaluation de l'avpression du cCD22 dans les nouds lumphatiques tumeraux par sutemátric
5.1.4. Evaluation de l'expression du CCD22 dans les nœuds lymphatiques tumoraux par cytometrie
3.2 Imagerie phénotypique après injection de l'anticorps anti-cCD22 1111n-DOTA-10C6 on
<i>1.2.</i> Imagenic phenotypique après injection de l'anticorps anti-co <i>b</i> 22 ¹¹¹ III-DOTA-1000 ell

	3.3. Calcul des doses absorbées aux organes en l'absence de co-infusion de l'anticorps froid
	10C6
	2.2.1.1 Dharmacocinétique conguine du radionharmacoutique 1111 DOTA 1006
	3.3.1.1. Pharmacocinetique sanguine du radiopharmaceutique 1111n-DOTA-1006 dans les organes sains 226
	2 2 1 2 Dharmacocinétique du radiopharmacoutique ¹¹¹ In DOTA 10C6 dans les sites tumoraux 228
	3.3.1.5. Final inacocinetique du l'autophan inaceutique In-DOTA-1000 dans les sites tumoraux.220
	5.5.2. Evaluation des doses absorbées aux organes dans un contexte de Kri and-CD22 à l'yth luin-90 à
CHA	PITRE 5. DISCUSSION
1.	LE MODELE SPONTANE CANIN DE DLBCL235
2.	VALIDATION DE L'ANTICORPS 10C6 POUR LA THERAPIE DES CHIENS ATTEINTS DE
	DLBCL
0	
3.	IMAGERIE QUANTITATIVE : PROBLEMATIQUE ET METHODE DE QUANTIFICATION DES
	IMAGES
4	CO INCLISION ET VADIATION DE L'ACTIVITE SDECICIOUE 252
4.	CO-INFUSION ET VARIATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE
CON	CLUSION CENEDALE 261
CON	CLUSION GENERALE
PER	SPECTIVES
ANN	EXES
BIB	LIOGRAPHIE

Abréviations

ABC : activated B-like cell

ACAM : anticorps canins anti-anticorps murins

ACE : antigène carcinoembryonnaire (*CEA*, *carcinoembryonic antigen*)

ADC : anticorps conjugué avec un médicament (*antibody drug conjugate*)

ADCC: cytotoxicité cellulaire anticorpsdépendante (*antibody dependant cellular cytotoxicity*)

ADN : acide désoxyribonucléique

AES : affinity enhancement system

AI : activité injectée

AMM : autorisation de mise sur le marché

ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

APUI : annexe de la pharmacie à usage interne

ARN : acide ribonucléique

B2m : bêta-2 microglobuline

BCR : récepteur à l'antigène des cellules B (*B-cell antigen receptor*)

BRAF : murine sarcoma viral oncogene homolog B

BSA : albumine sérique bovine (bovine serum albumin)

CBNPC : carcinome bronchique non à petites cellules

cCD22 : CD22 canin

CCM : chromatographie sur couche mince

CD : cluster of differenciation

CDC : cytotoxicité dépendante du complément (complement dependant cytotoxicity)

CDR : complementary determining region

CE : corps entier

CERVO : comité d'éthique pour la recherche clinique vétérinaire d'Oniris

CEV : compartiment extravasculaire

CH : domaine constant de la chaine lourde

CHO : *chinese hamster ovary*

CHOP : cyclophosphamide, hydroxyadriamycine, Oncovin® (vincristine), prednisone

CHUV : centre hospitalier universitaire vétérinaire

CHX-A"DTPA : acide trans-cyclohexyltriamine penta-acétique

CL : domaine constant de la chaine légère

CMC : carcinome mammaire canin

CMT : carcinome médullaire de la thyroïde

COPLA : cyclophosphamide, Oncovin[®] (vincristine), prednisone, L-asparaginase, adriamycine

CPF : contaminant perfluoré

CPP : comité de protection des personnes

CR : réponse complète

CRIT : radioimmunothérapie compartimentée

CRu : réponse complète non confirmée

DE : double-expression

DH : double-hit

DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules (*diffuse large B-cell lymphoma*)

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMT : dose maximale tolérée

DO : densité optique

DOTA : acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tétracétique

DTPA : acide diéthylènetriaminepenta-acétique

ECOG : Eastern cooperative oncology group

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

ELISA: dosage immunoenzymatique sur support solide (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

EMA : European medicines agency

EpCAM : epithelial cell adhesion molecule

ER : récepteur aux oestrogènes

Fab : fragment having the antigen binding

Fc : fragment cristallisable

FcγRn : récepteur néonatal humain du fragment Fc

FDA : federal drug administration (US-FDA)

FDG : fluorodésoxyglucose

FISH : fluorescent in situ hybridization

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

FLIPI : index pronostique international pour les lymphomes folliculaires

FLT : fluorothymidine

GBM : glioblastome multiforme

GC : centro-germinatif (germinal center)

GELF : groupe d'étude des lymphomes folliculaires

GFP : green fluorescent protein

GMP : bonnes pratiques de fabrication (*good manufacturing pratices*)

HAMA : anticorps humains anti-souris (human anti-murine immunoglobuline antibodies)

hLL2 : anticorps humanisé antiCD22 humain

HER2: human epidermal growth factor receptor-2

HES : hématoxyline, éosine, safran

HPLC: chromatographie liquide sous haute pression

HRP : horseradish peroxydase

HSG : histamine-succinyl-glycine

IEDDA : inverse-electron-demand Diels-Alder

Ig : immunoglobuline

IHC : immunohistochimie

IPI : index pronostique international

IRM : imagerie par résonnance magnétique

iTLC-SG : instant thin layer chromatography – silica gel

IV: intraveineuse

K_a : constante d'association

K_d : constante de dissociation

 $K_D: \mbox{constante d'affinit\'e relative}$

LAL : leucémie aiguë lymphoïde

LAM : leucémie aiguë myéloïde

LDH : lactate déshydrogénase

LF : lymphome folliculaire

LH : lymphome de Hodgkin

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LNH : lymphome non-hodgkinien

LVol : volume lésionnel

MIRD : medical internal radiation dose

MM : myélome multiple

MOH : moelle osseuse hématopoïétique

ND : non déterminé

NF1 : neurofibromin 1 tumor receptor

NK : natural killer

NMRI : naval medical research institute

NL : nœud lymphatique

NOD : non-obese diabetic

NRAS : neuroblastoma RAS viral (V-Ras) oncogene homolog

NSG : NOD-SCID avec IL-2Rynull

OMS : organisation mondiale de la santé

PBS : phosphate buffered saline

PCB : polychlorobisphényls

PE : phycoérythrine

PFA : paraformaldéhyde

PO: per os

PR : récepteur à la progestérone

PRIT : radioimmunothérapie préciblée

PSA : antigène spécifique de la prostate (*prostate specific antigen*)

PTEN : phosophatase and tensin homolog mutated in multiple advanced cancers 1

R-CHOP: rituximab, cyclophosphamide, hydroxyadriamycine, Oncovin[®] (vincristine), prednisone

R-DA-EPOCH : R-EPOCH à doses ajustées (rituximab, etoposide, prednisone, Oncovin[®] (vincristine), cyclophosphamide, hydroxyadriamycine

R-DHAP : rituximab, dexaméthasone, cytarabine à dose élevée, cisplatine

RFB : retardateur de flamme bromé

R-GPD : rituximab, gemcitabine, dexaméthasone, cisplatine

R-ICE : rituximab, ifosfamide, carboplatine, etoposide

r-IPI : IPI révisé

RIT : radioimmunothérapie

scFv : single chain variable fragment

SCID : severely compromised immune deficient

SH : sarcome histiocytaire

SNP : single nucléotide polymorphism

STIM : service transversal d'imagerie médicale (d'Oniris)

SUV : standardized uptake value

SVF : sérum de veau fœtal

TCA : acide trichloroacétique

TDM : tomodensitométrie

TEL : transfert d'énergie linéique

TEMP: tomographie par émission monophotonique

TEP : tomographie par émission de positon TfR : récepteur à la transferrine TGL : total lesion glycolysis TH : triple-hit TMB: 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine TN : triple -négatif TNE-GEP: neuroendocrine tumeur gastroentéropancréatique TP53 : tumor protein 53 UV : ultraviolet VH : domaine variable de la chaine lourde VL : domaine variable de la chaine légère VR : volume restreint WHO : world health organization

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Principe de la radioimmunothérapie avec injection du radiopharmaceutique par voie intraveineuse
<u>Figure 2 :</u> Structures d'une immunoglobuline G composées de deux chaines lourdes et deux chaines légères
<u>Figure 3</u> : Différentes générations d'anticorps thérapeutiques : anticorps murins, chimériques, chimériques humanisés, humanisés et humains
Figure 4 : Fragments obtenus par digestion enzymatique d'une IgG à la pepsine et à la papaïne
<u>Figure 5</u> : Fragments d'anticorps obtenus par ingénierie moléculaire accompagnés de leur poids moléculaire, de leur demi-vie et de leur voie d'élimination
Figure 6 : Facteurs déterminants de l'efficacité de la RIT
Figure 7 : Exemples de groupements chélateurs bifonctionnels utilisés en radioimmunothérapie 51
Figure 8 : Principe et composante d'une gamma caméra
<u>Figure 9</u> : Principe de la tomographie par émission de positons : la détection d'un photon γ en coïncidence
<u>Figure 10 :</u> Illustration des différents phénomènes perturbant la détection des rayonnements avec une gamma caméra
<u>Figure 11 :</u> Courbe de survie (kaplan-Meier) des sous-groupes de DLBCL définis par détermination de profils d'expression génique
<u>Figure 12 :</u> Algorithmes immunohistochimiques : A) algorithme de Choi initial ; B) algorithme de Choi modifié ; C) algorithme de Hans ; D) algorithme de Hans modifié
Figure 13 : Survie selon le r-IPI chez 365 patients atteints de DLBCL et traités par R-CHOP
Figure 14 : Approche thérapeutique des DLBCL
<u>Figure 15</u> : Marquages immunohistochimiques à l'aide des anticorps anti-cCD22 sur des coupes histologiques de nœuds lymphatiques de chiens sains et lymphomateux (DLBCL)
<u>Figure 16 :</u> Exemple de l'étude de compétition en ELISA sandwich pour l'anticorps biotinylé anti- cCD22 1E3
Figure 17 : Photographie de l'automate Modular Lab Standard d'ARRONAX119
<u>Figure 18 :</u> Configuration du système automatisé Modular Lab Standard pour le radiomarquage de l'anticorps DOTA-10C6 à l'indium-111120
<u>Figure 19 :</u> Exemple de l'étude de compétition en ELISA sandwich pour l'anticorps biotinylé anti- cCD22 1E3
<u>Figure 20 :</u> Schématisation de la diversité et du chevauchement des épitopes reconnus par les anticorps murins anti-cCD22

<u>Figure 24 :</u> Evaluation de la quantité d'anticorps anti-cCD22 fixés sur leur cible à la surface des cellules (lignée CLBL-1) après incubation à 4°C et 37°C et cinétique d'internalisation du complexe antigène-anticorps – Anticorps 6B7, 5F8, 1E3 et 2D1, reconnaissant deux épitopes chevauchants. 140

<u>Figure 26 :</u> Test d'immunoréactivité par la méthode de LINDMO en excès d'antigènes après marquage à l'iode-125 des anticorps anti-cCD22 10C6, 6B7 et 5C2......143

<u>Figure 29 :</u> Comparaison de la biodistribution des anticorps anti-cCD22 10C6, 1E3, 6B7 et 5C2 marqués à l'iode-125 à différents temps post-injection (1, 4 et 16 h)......145

<u>Figure 30</u> : Résultats de l'iTLC-SG des anticorps 5C2 et 10C6 couplés au DOTA (à gauche) et représentation des rendements de cette chromatographie sur couche mince associés (à droite).

<u>Figure 32</u>: Validation du ciblage tumoral dans un modèle murin avec l'anticorps ⁶⁴Cu-DOTA-10C6 au temps 16 h post-injection (coupe longitudinale)......151

Figure	36	:	Résultats	des	analyses	HPLC	réalisées	sur	l'anticorps	froid	DOTA-10C6	et	le
ra	diop	ha	rmaceutiqu	111 le 111 l	n-DOTA-1	0C6 en	fin de radi	omar	quage, réalis	ées à A	RRONAX	1	65

<u>Figure 37</u> : Résultats des analyses réalisées à ARRONAX par la méthode de CCM réalisées sur le radiopharmaceutique ¹¹¹ In-DOTA-10C6 en fin de radiomarquage166
<u>Figure 38 :</u> Résultats des analyses HPLC réalisées à ARRONAX sur le radiopharmaceutique ¹¹¹ In-DOTA- 10C6 aux temps 6 h et 24 h post-production166
<u>Figure 39 :</u> Immunoréactivité du radiopharmaceutique ¹¹¹ In-DOTA-10C6168
<u>Figure 40 :</u> Corrélation existant entre les pourcentages d'activité injectée par gramme de sang calculés avec les données du compteur gamma et à partir des acquisitions TEMP/TDM chez deux chiennes saines (DOR.ALI et DAI.ALI)
<u>Figure 41 :</u> Contourage large du corps entier sur l'image de fusion TEMP/TDM à J1 (NOR.ALI) : coupe transversale thoracique sur animal en décubitus ventral (poumons, foie, extrémités distales des membres pelviens)
<u>Figure 42 :</u> Contourage sur l'acquisition TDM de petits volumes au sein des reins, du foie, de la rate et des poumons (NOR.ALI)
<u>Figure 43 :</u> Comparaison des pourcentages d'activité injectée par kilogramme d'organe en contourant l'organe entier sur les images TDM et en déterminant des petits volumes au sein de ces organes : données obtenues chez trois chiens sains (BAC.ALI, NOR.AI et DOR.ALI) pour les reins, le foie, la rate et les poumons
<u>Figure 44 :</u> Contourage manuel du tube de sang sur les coupes transversales des acquisitions TEMP/TDM: exemple de l'acquisition à J0 pour l'animal NOR.ALI
<u>Figure 45</u> : Pharmacocinétique sanguine chez trois chiens sains d'expérimentation du radiopharmaceutique ¹¹¹ In-DOTA-10C6 avec co-infusion de l'anticorps froid 10C6182
<u>Figure 46</u> : Pharmacocinétique du radiopharmaceutique ¹¹¹ In-DOTA-10C6 avec co-injection d'anticorps froid 10C6 chez trois chiens sains (BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI) : corps entier, reins, foie, poumons, rate et moelle osseuse hématopoïétique (MOH) des vertèbres lombaires
<u>Figure 47 :</u> Imputation du pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe lié à la circulation du radiopharmaceutique ¹¹¹ In-DOTA-10C6 dans le compartiment vasculaire ainsi que lié à sa présence dans le parenchyme tissulaire chez des chiens sains (BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI) : étude du foie, des reins, des poumons, de la rate et de la moelle osseuse hématopoïétique des vertèbres lombaires
<u>Figure 48 :</u> Anatomie de la cavité abdominale dans l'espèce canine : positionnement relatif du foie et des reins
<u>Figure 49 :</u> Evolution au cours du temps de l'immunoréactivité du radiopharmaceutique ¹¹¹ In-DOTA- 10C6 présent dans le plasma du chien BAC.ALI198
<u>Figure 50 :</u> Immunomarquages réalisés sur les lames histologiques issues du nœud lymphatique mandibulaire droit du chien AMI.NIC202
<u>Figure 51 :</u> Détermination par analyse immunohistochimique du sous-type et du double score de hit du DLBCL d'AMI.NIC203

- <u>Figure 52</u> : Analyse par cytométrie en flux de l'expression du cCD21, cCD20 et cCD22 au niveau de la membrane des cellules tumorales du nœud lymphatique mandibulaire droit du chien AMI.NIC.

- <u>Figure 56</u> : Pharmacocinétique sanguine chez deux chiennes d'expérimentation saines du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 en l'absence de co-infusion de l'anticorps froid 10C6..210

- <u>Figure 59 :</u> Coloration HES (hématoxyline, éosine, safran) et immunomarquages réalisés sur les lames histologiques issues des biopsies des nœuds lymphatiques préscapulaires de la chienne FAX.FRE.

- <u>Figure 63</u>: Détermination au compteur gamma de la pharmacocinétique sanguine du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 en l'absence de co-injection de l'anticorps froid 10C6 chez une chienne atteinte de DLBCL et comparaison avec les chiennes saines DOR.ALI et DAI.ALI.

- <u>Figure 65 :</u> Pharmacocinétique du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 en l'absence de co-injection de l'anticorps froid 10C6 dans les organes envahis de l'animal FAX.FRE (rate, moelle osseuse hématopoïétique des vertèbres lombaires et nœuds lymphatiques) : comparaison avec les animaux sains.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques d'une sélection de radioisotopes émetteurs alpha
<u>Tableau 2 :</u> Caractéristiques d'une sélection de radioisotopes émetteurs β
<u>Tableau 3 :</u> Caractéristiques d'une sélection de radioisotopes émetteurs d'électrons Auger
Tableau 4 : Caractéristiques des différentes classes d'immunoglobulines humaines
<u>Tableau 5 :</u> Caractéristiques des différentes sous-classes d'IgG humaines
<u>Tableau 6 :</u> Anticorps monoclonaux approuvés par la FDA et l'EMA pour une utilisation thérapeutique en oncologie
<u>Tableau 7 :</u> Résumé des facteurs prédictifs de l'efficacité anti-tumorale de la RIT chez les patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens75
<u>Tableau 8 :</u> Classification de 84 cas de DLBCL selon l'algorithme de Hans et l'algorithme de Choi (new algorithm) : comparaison avec la classification par analyse des profils d'expression génique 79
Tableau 9 : Echelle d'activité (performance status) selon l'échelle ECOG
Tableau 10 : Classification de Ann Arbor modifiée
<u>Tableau 11 :</u> Résumé des études cliniques de RIT anti-CD20 en première ligne de traitement chez des patients atteints de DLBCL
<u>Tableau 12 :</u> Résumé des avantages et inconvénients des différentes souches de souris disponibles pour réaliser des xénogreffes de lignées cellulaires cancéreuses
<u>Tableau 13 :</u> Classification des lymphomes canins en stades et sous-stades cliniques d'après la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé
<u>Tableau 14 :</u> Protocole COPLA majoritairement utilisé en médecine vétérinaire en France
<u>Tableau 15 :</u> Taux de production, isotypes et affinités relatives des sept anticorps anti-cCD22 nus produits dans le laboratoire d'accueil
<u>Tableau 16 :</u> Evaluation de la positivité de nœuds lymphatiques canins tumoraux vis-à-vis du cCD22 : références des réactifs utilisés ainsi que leur concentration d'utilisation
<u>Tableau 17 :</u> Evaluation de la positivité de nœuds lymphatiques canins tumoraux vis-à-vis du cCD22 : incubations successives réalisées sur les cellules des différents puits117
<u>Tableau 18 :</u> Test ELISA indirect de surveillance de la réponse immunitaire anti-anticorps murins : références des réactifs utilisés ainsi que leur concentration d'utilisation
<u>Tableau 19 :</u> Rappel des taux de production, isotypes et affinités relatives des 7 anticorps anti-cCD22 nus produits dans le laboratoire d'accueil
Tableau 20 : Réactivités croisées mise en évidence par des tests ELISA sandwich
Tableau 21 : Caractéristiques du marquage des anticorps anti-cCD22 à l'iode-125142

Tableau 22 : Fractions immunoréactives des anticorps anti-cCD22 marqués à l'iode-125144
<u>Tableau 23 :</u> Evaluation de la perte d'immunoréactivité après couplage des anticorps au DOTA148
Tableau 24 :Caractéristiques du marquage au cuivre-64 des anticorps anti-cCD22 DOTA-10C6 et DOTA-5C2 par ARRONAX.149
<u>Tableau 25 :</u> Activité et quantité d'anticorps anti-cCD22 couplé au DOTA et marqué au cuivre-64 injectées dans chacune des souris
<u>Tableau 26 :</u> Périodicité des prélèvements sériques réalisés après une injection unique de ¹¹¹ In-DOTA- 10C6 chez des chiens d'expérimentation sains
<u>Tableau 27 :</u> Périodicité des prélèvements sériques réalisés après une injection unique de ¹¹¹ In-DOTA- 10C6 chez des chiens spontanément atteints de DLBCL162
<u>Tableau 28 :</u> Caractéristiques des produits finaux issus des radiosynthèses du radiopharmaceutique ¹¹¹ In-DOTA-10C6 réalisées à ARRONAX164
<u>Tableau 29 :</u> Equations des courbes de régression linéaire déterminées à partir des graphes représentant les pourcentages d'activité injectée par gramme de sang calculés avec les données du compteur gamma en fonction des valeurs calculées à partir des acquisitions TEMP/TDM chez les chiens BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI
<u>Tableau 30 :</u> Paramètres de segmentation (volume, homogénéité de densité tissulaire et rondeur de l'organe) utilisés dans le logiciel 3D Slicer pour effectuer un contourage automatique du foie, des reins, de la rate et des poumons chez les chiens sains et malades ayant reçu une injection du radiopharmaceutique 111n-DOTA-10C6
<u>Tableau 31 :</u> Caractéristiques du mélange co-infusé d'anticorps froid 10C6 et du radiopharmaceutique ¹¹¹ In-DOTA-10C6 réalisée chez 3 chiens d'expérimentation sains
<u>Tableau 32 :</u> Doses auto-absorbées aux organes par mégabéquerel injecté calculées chez des chiens sains dans le cadre d'une radioimmunothérapie anti-cCD22 réalisée avec le radiopharmaceutique ⁹⁰ Y-DOTA-10C6 avec co-injection d'une grande quantité d'anticorps froid 10C6188
<u>Tableau 33 :</u> Doses auto-absorbées à la moelle osseuse hématopoïétique (MOH) par mégabéquerel injecté calculées chez des chiens sains dans le cadre d'une radioimmunothérapie anti-cCD22 réalisée avec le radiopharmaceutique ⁹⁰ Y-DOTA-10C6 avec co-injection d'anticorps froid 10C6 pour une dose totale d'anticorps de 1,5 mg.kg ⁻¹
<u>Tableau 34 :</u> Activités injectées de ^{99m} Tc-VASCULOCIS et délai existant entre l'injection du bolus du radiopharmaceutique et le début de l'acquisition TEMP
<u>Tableau 35 :</u> Volume sanguin circulant des organes d'intérêt canins192
<u>Tableau 36 :</u> Part de la dose auto-absorbée des organes (foie, reins, poumons, rate et moelle osseuse hématopoïétique) liée à la circulation du radiopharmaceutique ¹¹¹ In-DOTA-10C6 dans le compartiment sanguin et de celle liée à son accumulation dans le parenchyme tissulaire, chez trois chiens sains (BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI)
<u>Tableau 37 :</u> Résultats des examens complémentaires réalisés dans le cadre du bilan d'extension suite au diagnostic clinique de lymphome B multicentrique chez AMI.NIC

- <u>Tableau 39 :</u> Demi-vies biologiques du radioimmunoconjugué ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le sang de quatre chiennes d'expérimentation pour lesquels l'activité spécifique du produit injecté diffère......211

Liste des annexes

<u>Annexe 1 :</u> Synopsis du protocole détaillé de l'essai clinique de médecine nucléaire proposé aux chiens spontanément atteints de DLBCL surexprimant le CD22273
<u>Annexe 2 :</u> Lettre d'information au propriétaire (étude clinique de médecine nucléaire proposé aux chiens spontanément atteints de DLBCL surexprimant le CD22)277
<u>Annexe 3</u> : Consentement éclairé ((étude clinique de médecine nucléaire proposé aux chiens spontanément atteints de DLBCL surexprimant le CD22)
<u>Annexe 4 :</u> Cross-doses calculées pour les organes sains des chiens sains et des chiens malades dans un contexte de RIT anti-CD22 à l'yttrium-90
<u>Annexe 5</u> : Analyse histopathologique et immunohistochimique réalisée sur le nœud lymphatique mandibulaire retiré chirurgicalement chez le chien AMI.NIC
<u>Annexe 6 :</u> Myélogramme et analyse histopathologique et immunohistochimique réalisée les biopsies de nœud lymphatique préscapulaire chez la chienne FAX.FRE
Annexe 7 · Article "SPECT-CT imaging of dog spontaneous diffuse large R-cell lymphoma targeting

PREAMBULE

L'efficacité des thérapies cytotoxiques anticancéreuses traditionnelles s'accompagne d'une toxicité significative pour les cellules saines, ce qui peut se traduire par des succès mitigés. Durant les 30 à 40 dernières années, une meilleure compréhension des différences moléculaires existant entre les cellules tumorales et les cellules saines a mené au développement de thérapies ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses, particulièrement en utilisant des anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux. La nature ciblée de ces thérapies ouvre la porte à la promesse d'une plus grande efficacité et d'une moindre toxicité, clé du succès.

L'une de ces stratégies thérapeutiques développées est de lier un anticorps dirigé contre un antigène tumoral à un radioélément émetteur de rayonnements cytotoxiques : il s'agit de la radioimmunothérapie ou RIT.

L'efficacité de la radioimmunothérapie a été évaluée en recherche préclinique et clinique sur un large spectre de cancers. Globalement, le succès de cette option thérapeutique est limité dans le cas des tumeurs solides. Les meilleurs résultats ont été obtenus dans les cas d'hémopathies malignes, et ce malgré une myélotoxicité avérée. Toutefois en Europe aujourd'hui, seule une spécialité de RIT est commercialisée. Il s'agit du ZEVALIN[®], un anticorps murin anti-CD20 indiqué en consolidation du traitement des patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens.

Cet échec apparent de la RIT à s'inscrire de manière pérenne dans la prise en charge thérapeutique des cancers s'explique notamment par l'existence de plusieurs facteurs limitant l'efficacité de la RIT. Ainsi, en dehors de l'apparition d'anticorps humains anti-souris (Human Anti-Murine immunoglobuline Antibodies ou HAMA) mise en évidence lors de l'utilisation d'anticorps monoclonaux d'origine murine, et contrée par l'humanisation des anticorps aujourd'hui administrés aux patients, d'autres problèmes sont à prendre en considération. Il s'agit notamment d'une pénétration intratumorale insuffisante et d'une distribution hétérogène de l'antigène ciblé au sein des masses tumorales, induisant la délivrance d'une dose trop faible aux tumeurs, et d'une accumulation du radiopharmaceutique dans les organes sains à l'origine d'une toxicité limitante. Ces éléments font l'objet de recherches assidues avec pour objectif l'identification d'antigènes cibles optimaux et l'élaboration de nouveaux radiopharmaceutiques présentant une pharmacocinétique adéquate.

Il faut cependant souligner que l'évaluation des protocoles de RIT en recherche clinique est effectuée chez des patients ayant déjà bénéficié de plusieurs lignes de traitement, hébergeant des cancers multi-résistants et dont la moelle osseuse est très souvent fragilisée. De plus, les études de dosimétrie qui permettraient de calculer les doses déposées aux tumeurs et aux organes sains, pour adaptation de l'activité injectée à chaque individu, ne sont pas réalisées en routine. Le plus souvent, seuls les premiers patients inclus sont soumis à ces études afin de valider la pharmacocinétique et la dosimétrie en situation de maladie.

Pourtant, la dosimétrie conditionne l'efficacité de la RIT. Ainsi, l'obtention de données concernant la dosimétrie pour chaque patient pourrait permettre d'adapter un plan de traitement

général aux individus sujets à une toxicité trop importante mais également à ceux dont les tumeurs bénéficieraient de l'administration d'une activité plus élevée. Ces informations peuvent être obtenues par la réalisation d'imageries phénotypiques pré-thérapeutiques de type immuno-TEMP et immuno-TEP, le tout de manière non invasive.

Ces études de dosimétrie étant contraignantes pour les patients, elles ne sont pas mises en œuvre de manière systématique.

Le développement d'un nouveau radiopharmaceutique pourrait tirer bénéfice d'une étape supplémentaire d'évaluation dans un modèle de cancer spontané de l'animal, où les individus sont de taille plus proche de celle de l'Homme contrairement aux modèles murins. En effet, les caméras TEMP et TEP sont identiques à celles employées chez le patient humain. Les méthodologies de dosimétrie et d'optimisation de la RIT développées dans ce cadre animal alors seraient plus facilement transposables en médecine humaine. De plus, le caractère spontané d'un tel modèle le rapproche de la réalité biologique du cancer chez l'Homme en comparaison avec les modèles murins majoritairement exploités. Les interactions entre le système immunitaire de l'organisme receveur et le radiopharmaceutique injecté, ainsi que sa pharmacocinétique, sont comparables.

Enfin, travailler chez l'animal spontanément malade permet d'évaluer le traitement proposé chez des individus naïfs de toute thérapie puisque les options de prise en charge en oncologie vétérinaire sont limitées et le plus souvent palliatives.

Ainsi, l'obtention de résultats prometteurs dans un modèle animal de cancer spontané pourrait permettre de faciliter la mise en place d'essais cliniques de RIT chez l'Homme pour promouvoir cette option thérapeutique.

Notre travail de thèse a porté sur l'évaluation pré-clinique du ciblage du CD22 canin chez des chiens spontanément atteints de lymphome B diffus à grandes cellules pour une application en imagerie par tomographie par émission monophotonique, appelée immuno-TEMP, et en radioimmunothérapie (RIT). Cette revue bibliographique a pour objectif de présenter les caractéristiques de la RIT bêta anti CD22 du lymphome B diffus à grandes cellules chez l'Homme et de présenter l'intérêt d'adresser certaines questions scientifiques au modèle animal spontané canin correspondant.

CHAPITRE 1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1. LA RADIOIMMUNOTHERAPIE

La radiothérapie externe est aux cotés de la chimiothérapie et de la chirurgie l'une des stratégies thérapeutiques les plus utilisées dans le traitement des différents cancers. L'irradiation des patients se fait à l'aide d'un accélérateur de particules, ce qui limite, à quelques exceptions près, son indication à un traitement locorégional des tumeurs. L'utilisation de rayonnements ionisants pour traiter des cancers diffus ou à un stade métastatique est donc exceptionnelle et l'option thérapeutique privilégiée dans ce cadre sera un traitement anticancéreux systémique (chimiothérapie, hormonothérapie ou autre agent thérapeutique dit ciblé). Celui-ci présente, selon la multitude de traitements chimiques disponibles, une morbidité non négligeable et dans certains cas une efficacité limitée.

La radiothérapie interne vectorisée a sur le principe la même indication que la chimiothérapie et peut lui être une alternative ou un complément. Elle consiste à administrer au patient par voie locale ou systémique un agent pharmaceutique (vecteur) spécifique de la cellule tumorale couplé à un isotope radioactif. Le vecteur se fixe spécifiquement sur sa cible biologique. Les particules ou rayonnements ionisants émis par le radionucléide détruisent sélectivement cette cible.

1.1. Généralités sur la radioimmunothérapie

1.1.1. Définition de la radioimmunothérapie

La radioimmunothérapie (RIT) est une radiothérapie interne utilisant le plus souvent comme agent de vectorisation un anticorps monoclonal ou un fragment d'anticorps. Le vecteur, conjugué de manière stable à un radionucléide émetteur de rayonnements alpha ou bêta -, ou encore plus rarement d'électrons Auger, reconnaît spécifiquement un antigène surexprimé par les cellules cibles et le plus souvent localisé au niveau de la membre cellulaire, comme l'illustre la <u>Figure 1</u>. Le principal objectif de la RIT est de délivrer des doses d'irradiation cytotoxiques aux cellules cancéreuses sans provoquer de dommage significatif dans les tissus sains.

L'administration du radiopharmaceutique peut se faire par voie intraveineuse, intrapéritonéale, intrapleurale ou intrathécale. Le radiopharmaceutique se distribue dans l'organisme par la circulation sanguine, par diffusion ou par convection (Larson SM *et al.*, 2015). Les effets

cytotoxiques des rayonnements ionisants sont majoritairement dus à des phénomènes radiobiologiques (dommages à l'ADN).



<u>Figure 1 :</u> Principe de la radioimmunothérapie avec injection du radiopharmaceutique par voie intraveineuse.

L'anticorps monoclonal couplé à un radionucléide est injecté au patient par voie intraveineuse. Il diffuse dans l'organisme par voie systémique et se fixe sur son antigène cible, surexprimé par les cellules tumorales. Les rayonnements ionisants libérés par la désintégration du radioisotope sont à l'origine de phénomènes conduisant à la mort cellulaire.

1.1.2. Caractéristiques de la RIT alpha (α)

Lorsque les rayonnements ionisants émis proviennent d'émetteurs α , on parle de RIT alpha. Les principaux radionucléides émetteurs de particules α utilisés en thérapie sont référencés dans le <u>Tableau 1</u>.

Les particules α libérées sont des noyaux d'hélium chargés positivement, de haute énergie (3 à 9 MeV) et pouvant parcourir 50 à 100 µm en ligne droite dans l'eau, ce qui correspond de 3 à 5 fois le diamètre d'une cellule cancéreuse (Mulford DA. *et al.*, 2005). Les particules α , caractérisées par un

transfert d'énergie linéique (TEL) élevé (approximativement 100 keV. μ m⁻¹). En raison de ce TEL élevé le dépôt d'énergie de quelques particules par cellule est suffisant pour la détruire. Les particules α provoquent des cassures double brin de l'ADN difficilement réparables lorsqu'elles s'accumulent. L'effet cytotoxique des particules α est peu sensible à l'hypoxie, au débit de dose d'irradiation et indépendant du cycle cellulaire (Sgouros G. *et al.*, 2010).

De part ces caractéristiques, les émetteurs alpha sont indiqués dans le traitement de situations cliniques associées à une très faible masse tumorale, c'est-à-dire en situation de maladie résiduelle ou microscopique. En effet, le dépôt d'énergie des particules α présente un pic de Bragg (la majeure partie de l'énergie est déposée en fin de parcours) : la RIT α est adaptée au ciblage des cellules tumorales isolées ou en cluster.

Actuellement, la RIT α fait l'objet de plusieurs essais cliniques chez des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë, de glioblastome, de carcinome ovarien, de lymphome B non-hodgkinien ou encore de mélanome (Rosenblat TL. *et al.*, 2010 ; Allen BJ. *et al.*, 2011 ; Krolicki L. *et al.*, 2017).

Isotope	Principales particules émises	Demi-vie	Energie des particules alpha (MeV)
²¹¹ At	1 α	7,2 h	6
²²⁵ Ac	4 α, 2β	10 j	6 à 8
²¹² Bi	1 α, 1 β	60,6 min	6
²¹³ Bi	1 α, 2 β	46 min	6
²²³ Ra	4 α, 2 β	11,4 j	6 à 7
²¹² Pb	1 α, 2 β	10,6 h	7,8
¹⁴⁹ Tb	1 α	4,2 h	4

<u>Tableau 1 :</u> Caractéristiques d'une sélection de radioisotopes émetteurs alpha.</u> Mulford DA. *et al.*, 2005.

1.1.3. Caractéristiques de la RIT bêta (β –)

Les particules β - sont des électrons chargés négativement dotés d'une énergie de 30 keV à 2,3 MeV et peuvent parcourir 50 µm à 12 mm dans les tissus. Les particules β - ont un transfert d'énergie linéique faible (0,2 keV.µm⁻¹) et un parcours long non linéaire dans l'eau. Ce long parcours permet d'irradier des cellules tumorales à distance et la mise en place d'un effet de « feu croisé » au sein des masses tumorales. Ce phénomène de « feu croisé » permet donc la destruction de cellules non ciblées mais adjacentes, augmentant l'efficacité de la RIT tout en étant associé à une toxicité plus grande (Milenic DE. *et al.*, 2004).

Les principaux radionucléides émetteurs de particules β - utilisés en thérapie sont référencés dans le <u>Tableau 2</u>.

Isotope	Principales particules émises	Demi-vie	Energie maximale des particules beta (MeV)
¹³¹ I	β-, γ	8 j	0,61
90Y	β-	2,7 j	2,28
¹⁷⁷ Lu	β-, γ	6,8 j	0,5
⁶⁷ Cu	β-, γ	2,6 j	0,58

<u>Tableau 2 :</u> Caractéristiques d'une sélection de radioisotopes émetteurs β-. D'après Kraeber-Bodéré F. *et al.*, 2015.

L'effet cytotoxique des rayonnements β – est majoritairement dû à la formation de radicaux libres. Ces radicaux libres induisent de nombreux dommages à l'ADN sous forme de cassures simple brin. Présentes en trop grand nombre, ces cassures sont difficilement résolues pas les mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN, à l'origine de la mort cellulaire. Des conditions hypoxiques sont à l'origine de radiorésistances, notamment au centre des masses tumorales (Martins CD. *et al.*, 2018).

Actuellement, la RIT β – est la seule modalité de RIT appliquée en routine clinique avec une spécialité pharmaceutique commercialisée en Europe et destinée aux patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens, le Zevalin® (Aghevlian S. *et al.*, 2017).

1.1.4. Caractéristiques de la RIT Auger

Les rayonnements Auger sont libérés lors de transitions non radiatives lorsqu'un atome excité présentant une vacance électronique retrouve un état stable par saut d'un électron périphérique vers la place vacante (transition électronique). Ainsi ces transitions non radiatives multiplient le nombre de vacances électroniques et induisent un phénomène d'émission en cascade d'électrons de faible énergie (< 25 keV) regroupés sous le nom d'électrons Auger. La distance parcourue par ces radiations ionisantes est très faible (< 50 nm) pour un transfert d'énergie linéaire élévé (4 – 26 keV.µm⁻¹). Leur utilisation en thérapie n'est envisagée que pour traiter les cellules isolées ou les micrométastases (Aghevlian S. *et al.*, 2017).

Les principaux radionucléides émetteurs d'électrons Auger candidats pour une utilisation en thérapie sont référencés dans le <u>Tableau 3</u>. Actuellement la RIT Auger est en développement préclinique, essentiellement dans des modèles de xénogreffes murins, même si certains essais ont débuté chez l'homme (Morris MJ. *et al.*, 2005).
Isotope	Nombre d'électrons Auger	Domi vio	Energie maximale	
	émis par désintégration	Denn-vie	(keV)	
125 [26	57 j	31,7	
^{195m} Pt	36	4 j	64	
¹¹¹ In	15	2,8 j	26	
⁶⁷ Ga	5	3,3 j	9,6	

<u>Tableau 3 :</u> Caractéristiques d'une sélection de radioisotopes émetteurs d'électrons Auger. D'après Aghevlian S. *et al.*, 2017 ; Martins CD. *et al.*, 2018.

1.2. Vecteurs utilisés pour la radioimmunothérapie bêta –

En 1973, le premier ciblage in vivo d'un antigène tumoral humain à l'aide d'un anticorps radiomarqué a été décrit : l'antigène carcino-embryonnaire CEACAM5, exprimé par un modèle de hamster xénogreffé avec un carcinome colique humain, a été ciblé par un anticorps de chèvre radiomarqué avec de l'iode-131. Huit jours après l'injection du radiopharmaceutique par voie intracardiaque, la détection au compteur gamma de la radioactivité présente dans les tumeurs et les différents organes a mis en évidence une concentration quatre fois plus importante de l'anticorps radiomarqué dans le tissu tumoral que dans le sang (Primus FJ. et al., 1973). Des résultats similaires ont été obtenus par la même équipe l'année suivante, avec en supplément la visualisation sur un photoscan des foyers tumoraux exprimant l'antigène CEACAM5 (Goldenberg DM. et al., 1974). Quatre ans plus tard, la première utilisation de ce même anticorps radiomarqué est décrite en clinique : 18 patients atteints de cancers métastatiques variés sont imagés après administration par voie intraveineuse de l'anticorps caprin anti-CEACAM5 radiomarqué à l'iode-131. Quatre-vingt-dix pour cent des tumeurs primitives et 83 % des métastases connues sont visualisés à la scintigraphie. De plus, cette technique d'imagerie a permis de révéler en supplément l'existence de quatre sites métastatiques que les méthodes de diagnostic conventionnelles n'avaient jusqu'alors pas mis en évidence (Goldenberg DM. et al., 1978).

Depuis ces premiers résultats prometteurs, la production de vecteurs pour une application en médecine nucléaire, à la fois pour une utilisation à visée diagnostique et thérapeutique, a été l'objet de nombreuses recherches. Aujourd'hui, de nombreux travaux portent sur des vecteurs de plus petite taille dont la pharmacocinétique rapide peut présenter un avantage comparativement aux anticorps dans certaines applications (imagerie diagnostique en particulier).

1.2.1. Anticorps monoclonaux

Les anticorps sont des hétérodimères de glycoprotéines appartenant à la super famille des immunoglobulines (Ig) secrétées par des cellules B matures au stade plasmocytaire. Il existe plusieurs isotypes (IgG, IgE, IgA, IgM et IgD) mais ce sont les IgG qui sont utilisées en imagerie et en thérapie (<u>Tableau 4</u>). Ces protéines sont composées de deux chaines lourdes (H) et de deux chaines légères (L) identiques deux à deux et reliées par des ponts disulfures. La combinaison des quatre chaines peptidiques aboutit à une structure tridimensionnelle en forme de « Y ». Les chaines lourdes et légères sont constituées de régions variables VH et VL spécifiques de chaque immunoglobuline et portant le site de liaison à l'antigène, ainsi que de parties constantes CH et CL communes à toutes les Ig de même isotype et qui confèrent à l'anticorps ses fonctions effectrices. En effet, c'est à travers une région communément appelée fragment Fc (pour fragment cristallisable) que les Ig interagissent avec différents partenaires du système immunitaire tel que le système du complément ou encore des cellules de l'immunité innée (macrophages, granulocytes, cellules natural killer) qui tous présentent des récepteurs spécifiques au Fc (FcγR) (Schroeder HW. *et al.*, 2010).

Isotype	IgG	IgE	IgA	IgM	IgD	
Forme fonctionnelle	Monomère	Monomère	Dimère	Pentamère	Monomère	
Poids moléculaire (kDa)	146 - 165	188	160 (340)	160 (970)	184	
Demi-vie (j)	5 - 21	2,5	6	5	3	
% des lg sériques	85	0,02	7 - 15	5 - 10	0,3	
Taux sérique (g/L)	8 - 18	< 0,5	3,5 - 4,5	1 - 2	< 0,5	
Sous-classes	4	1	2	1	1	

Tableau 4 : Caractéristiques des différentes classes d'immunoglobulines humaines.

En ce qui concerne les IgG, chaque chaine lourde présente trois domaines constants (nommés CH1, CH2 et CH3) et un domaine variable VH, pour une masse totale de 50 kDa (<u>Figure 2</u>). Chaque chaine légère comprend un domaine constant CL et un domaine variable VL, avec une masse totale de 25 kDa. Ainsi une immunoglobuline d'isotype IgG entière monomérique, composé de ses quatre chaines, présente une masse totale de 150 kDa.

Chaque domaine variable VL et VH comporte trois régions hypervariables ou CDR (Complementary Determining Regions) de 5 à 15 acides aminés formant des boucles entre des régions charpentes ou FR (Framework). Les CDR des VL et VH forment une zone particulière où se trouve le paratope, région de l'anticorps responsable de la liaison à l'épitope, portion de l'antigène reconnue par l'anticorps. Ainsi, une IgG dispose de deux sites de liaison à l'antigène, un à l'extrémité de chaque bras.



<u>Figure 2 :</u> Structures d'une immunoglobuline G composées de deux chaines lourdes et deux chaines légères.

A la différence de la région variable, la région constante n'est pas ou peu impliquée dans la reconnaissance de l'antigène. En revanche elle est caractéristique de l'isotype de l'immunoglobuline ainsi que de sa sous-classe. Il existe 4 sous-classes d'IgG chez l'Homme : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Elles se distinguent structurellement par la longueur de leur zone charnière et le nombre de ponts disulfures présents dans cette même zone. Elles présentent également des fonctions effectrices différentes (<u>Tableau 5</u>).

Sous-classe	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Poids moléculaire (kDa)	146	146	165	146
Longueur de la zone charnière (a.a.)	15	12	62	12
Nombre de ponts disulfures de la zone charnière	2	4	11	2
Demi-vie (j)	21	21	5 - 7,5	21
% dans le sérum	60	25	10	5
ADCC	+	+/-	+++	-
CDC	++	+/-	++	-
Fixation aux récepteurs FcR	+	+	+/-	+

Tableau 5 : Caractéristiques des différentes sous-classes d'IgG humaines. D'après Almagro JC. *et al.* 2018 ; Salfeld JG., 2007. Des IgG sont dites monoclonales lorsqu'elles sont produites par des plasmocytes issus d'un clone de lymphocyte B dont l'affinité pour l'antigène a été à l'origine de son recrutement et son expansion. La mise au point de la technique de production d'hybridome par fusion de splénocytes de souris avec des cellules d'une lignée murine de myélome a permis l'essor des anticorps monoclonaux en permettant d'immortaliser et de sélectionner les lymphocytes B producteurs d'Ig d'intérêt. Les hydridomes permettent de produire à grande échelle *in vitro* des anticorps monoclonaux, spécifiques d'un antigène tumoral d'intérêt. Cette avancée majeure a ouvert la voie à la production efficace d'anticorps destinés à un large éventail d'applications diagnostiques et thérapeutiques (Köhler G. et al., 1976).

Toutefois, les anticorps d'origine murine peuvent être responsables de réactions allergiques sévères chez les patients, et des injections multiples étaient associées à une perte d'efficacité des anticorps monoclonaux administrés. De plus, certaines fonctions des anticorps reposant sur les interactions du fragment Fc avec le reste du système immunitaire, telle la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante, étaient absentes ou limitées (Almagro JC. et al., 2018). D'autres méthodes de production d'anticorps monoclonaux ont été explorées et c'est ainsi que les premiers résultats de chimérisation par génie génétique ont été décrits dans le début des années 80 : les anticorps produits ont un domaine variable d'origine murine et un domaine constant d'origine humaine (Morrison SL. et al., 1984). Ces travaux ont abouti en 1997 à la commercialisation du premier anticorps chimérique, le rituximab (Rituxan®), indiqué dans le traitement des cancers (lymphomes non hodgkiniens et leucémies lymphoïdes chroniques). En parallèle de cette avancée thérapeutique, d'autres technologies visant à augmenter la part d'origine humaine des anticorps monoclonaux ont été développées : humanisation (Jones PT. et al., 1986), sélection d'anticorps humains dans un répertoire phage-display (McCafferty J. et al., 1990) et création de souris transgéniques capables de synthétiser des anticorps humains (Green LL. et al., 1994; Lonberg N. et al., 1994). Toutes ces techniques ont donné naissance à de nombreux anticorps dont la nomenclature est explicitée dans la Figure 3.

L'évolution vers des anticorps monoclonaux humains s'accompagne d'une diminution de l'immunogénicité, même si certains anticorps totalement humains, tel l'adalimumab indiqué pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Humira®, anti-tumor necrosis factor α ou anti-TNF α), se sont avérés immunogènes (Bartelds GM. *et al.*, 2011). Cette évolution s'accompagne également d'une augmentation de la durée de résidence de l'anticorps monoclonal administré dans l'organisme receveur. En effet, les fragments Fc humains assurent une meilleure interaction des IgG avec le récepteur néonatal humain FcγRn, exprimé dans l'endothélium et de nombreux tissus épithéliaux, et dont le rôle est de soustraire les IgG plasmatiques au catabolisme. Les IgG sont pinocytées par les cellules du système réticulo-endothélial et seules les immunoglobulines non liées au FcγRn sont dégradées. Les immunoglobulines liées sont ensuite relarguées dans la circulation sanguine ou dans l'espace interstitiel. Ce processus de pinocytose suivi du recyclage dans le sang rend compte de la longue demi-vie des anticorps possédant un fragment Fc humain (Suzuki T. *et al.*, 2010).



<u>Figure 3</u> : Différentes générations d'anticorps thérapeutiques : anticorps murins, chimériques, chimériques humanisés, humanisés et humains.

Plus l'anticorps comporte des séquences humaines, plus l'immunogénicité potentielle et réduite et plus sa demivie augmente. Les suffixes appliqués aux noms des anticorps permettent d'identifier leur nature : -omab (murin), -ximab (chimérique), -xizumab (chimérique humanisé), -zumab (humanisé) et –umab (humain). D'après Diab M., 2017 ; Ortega C., 2012.

La majorité des anticorps monoclonaux développés et approuvés pour une utilisation en clinique humaine est destinée à un usage thérapeutique en oncologie, plus rarement pour un usage diagnostique par imagerie (les anticorps sont alors combinés à un radioélement) (Strohl WR, 2018). Aujourd'hui, il existe sur le marché 32 spécialités pharmaceutiques à visée thérapeutique composées d'un anticorps monoclonal (<u>Tableau 6</u>) : une concerne un anticorps murin couplé à un radioélément (ZEVALIN®) et quatre concernent des anticorps monoclonaux conjugués avec une molécule cytotoxique (ADCETRIS®, BESPONSA®, KADCYLA® et MYLOTARG®).

SPECIALITE principe actif	Date d'obtention de l'AMM	Туре	Cibles	Applications thérapeutiques	
ADCETRIS® brentuximab vedotin conjugué à la monométhyle auristatine E	FDA/EMA - 2012	IgG1 murine	CD30	LH Lymphome anaplasique à grandes cellules systémique Lymphome T cutané	
APEIRON® dinutuximab beta	FDA/EMA - 2017	IgG1 chimérique	GD2	Neuroblastome à haut risque	
ARZERRA® ofatumumab	FDA – 2009 EMA - 2010	IgG1 humaine	CD20	LLC	
AVASTIN® bevacizumab	FDA - 2004 EMA – 2005	IgG1 humanisée	VEGF	Cancer colorectal Cancer du sein CBNPC non épidermoïde Cancer du rein Cancer épithélial de l'ovaire, des trompe de Fallope ou péritonéal primitif Carcinome du col de l'utérus	
BAVENCIO [®]	FDA/EMA - 2017	IgG1 humaine	PD-L1	Carcinome à cellules de Merkel	
BESPONSA® inotuzumab couplé à l'ozogamicine	FDA/EMA – 2017	IgG4 humanisée	CD22	LAL	
CYRAMZA® ramucirumab	FDA/EMA - 2015	IgG1 humaine	VEGFR2	Cancer de l'estomac et de la jonction gastro-oesophagienne Cancer colorectal CBNPC	
DARZALEX® daratumumab	FDA – 2015 EMA - 2016	IgG1 humaine	CD38	ММ	
EMPLICITI® elotuzumab	FDA – 2015 EMA - 2016	IgG1 humanisée	SLAMF7	ММ	
ERBITUX® cetuximab	FDA/EMA - 2004	lgG1 chimérique	EGFR	Cancer colorectal Carcinome épidermoïde de la tête et du cou	
HERCEPTIN® trastuzumab	FDA – 1998 EMA - 2000	IgG1 humanisée	HER-2	Cancer du sein Cancer gastrique	
GAZYVARO® obinutuzumab	FDA – 2013 EMA – 2014	IgG1 humanisée	CD20	LLC LF	
KADCYLA® trastuzumab conjugué avec l'emtansine	FDA/EMA - 2013	IgG1 humanisée	HER-2	Cancer du sein	
KEYTRUDA® pembrolizumab	FDA – 2014 EMA - 2015	IgG4 humanisée	PD-1	Mélanome CBNPC LH Carcinome urothélial	
LATRUVO® olaratumab	EMA - 2016	IgG1 humaine	PDGFR- α	Sarcome des tissus mou	
MABTHERA® * rituximab	FDA – 1997 EMA – 1998	IgG1 chimérique	CD20	LNH LLC	
MYLOTARG® gemtuzumab couplé à l'ozogamicine	FDA – 2017 EMA – 2018	IgG4 humansiée	CD33	LAM	

OPDIVO® nivolumab	FDA – 2014 EMA - 2015	IgG4 humaine	PD-1	Mélanome CBNPC Carcinome à cellules rénales LH Cancer épidermoïde de la tête et du cou Carcinome urothélial
PERJETA® pertuzumab	FDA – 2012 EMA – 2013	IgG1 humanisée	HER-2	Cancer du sein
PORTRAZZA® nécitumumab	FDA/EAM – 2015	IgG1 humaine	EGFR	CBNPC épidermoïde
TECENTRIQ® atezolizumab	FDA/EMA - 2017	IgG1 humanisée	PD-L1	Carcinome urothélial CBNPC
VECTIBIX® panitumumab	FDA – 2006 EMA - 2007	IgG2 humaine	EGFR	Cancer colorectal
XGEVA® denosumab	EMA -2011 FDA - 2012	IgG2 humaine	RANK-L	Métastases osseuses de tumeurs solides (sein et prostate)
YERVOY® ipilimumab	FDA/EMA - 2001	IgG1 humaine	CTLA4	Mélanome
ZEVALIN® ibritumomab tiuxetan couplé à l'yttrium-90	FDA – 2002 EMA - 2004	IgG1 murine	CD20	LNH

*Il existe de nombreuses autres spécialités avec les mêmes indications et dont l'AMM est postérieure à celle du MABTHERA® : TRUXIMA®, BLITZIMA®, RITEMVIA®, RIXATHON®, RIXIMYO® et RITUZENA®. Leur principe actif est le rituximab, anticorps monoclonal chimérique anti-CD20.

<u>Tableau 6 :</u> Anticorps monoclonaux approuvés par la FDA et l'EMA pour une utilisation thérapeutique en oncologie.

AMM : autorisation de mise sur le marché ; CBNPC : cancer bronchique non à petites cellules ; LAL : leucémie aiguë lymphoïde ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; LF : lymphome folliculaire ; LH : lymphome de Hodgkin ; LLC : leucémie lymphoïde chronique ; LNH : lymphome non hodgkinien ; MM : myélome multiple. D'après Strohl WR., 2018.

L'ibritumomab tiuxetan, utilisé en radioimmunothérapie bêta des lymphomes non hodgkiniens, peut également être radiomarqué avec un émetteur gamma, l'indium-111 et administré dans un contexte d'imagerie diagnostique. Cette utilisation n'est pas prévue par l'autorisation de mise sur le marché (AMM) mais elle a été réalisée dans un contexte d'études dosimétriques dans des essais cliniques en vue de la demande d'AMM. En pratique clinique, la vérification du ciblage du CD20 par l'ibritumomab tiuxetan et les études de dosimétrie sont chronophages et contraignantes pour les patients. Les cellules tumorales lymphomateuses de la très grande majorité des patients surexprimant le CD20, la RIT n'est que très rarement précédée d'une imagerie phénotypique.

Il existe toutefois une IgG_1 murine produite pour une utilisation diagnostique en imagerie clinique, le capromab pendetide (PROSTASCINT®), commercialisée depuis 1996 aux Etats-Unis et radiomarquée à l'indium-111. Cet anticorps monoclonal cible une protéine membranaire spécifique de la prostate, appelée PSMA (prostate-specific membrane antigen) et est indiqué pour réaliser le bilan d'extension des patients atteints de carcinome prostatique à haut risque métastatique. Ce radiopharmaceutique peut également être administré chez les patients précédemment traités mais présentant une élévation de leur taux circulant de PSA (prostate-specific antigen) dans le but de mettre en évidence précocement une éventuelle rechute (Ellis RJ. *et al.*, 2004).

1.2.2. Fragments d'anticorps monoclonaux

Les fragments d'anticorps monoclonaux sont obtenus par clivage enzymatique au niveau de la région charnière par de la papaïne ou de la pepsine (Figure 4). La papaïne dissocie les bras du « Y » et permet d'obtenir deux types de fragments différents : deux Fab (fragment having the antigen binding site) et le Fc. La pepsine digère l'anticorps au-dessous de la région présentant des ponts disulfure de la région charnière, séparant ainsi le Fc d'un fragment F(ab)'2 qui conserve les deux paratopes. Les F(ab)'2 sont éliminés par voie hépatique, leur taille étant supérieure au seuil de filtration rénale.

Les fragments Fab, de plus petite taille que les anticorps monoclonaux, conservent leur capacité de liaison à l'antigène. Cependant, leur caractère monovalent comparativement aux fragments F(ab)'2 diminue leur avidité pour la cible. Ces fragments présentent une meilleure capacité de pénétration dans les tissus tumoraux. Ils sont éliminés par filtration rénale.

Cette diminution de taille permet d'améliorer le ciblage en favorisant la pénétration des radiopharmaceutiques dans la tumeur. En contrepartie, la taille limitée des vecteurs induit une élimination plus rapide de la protéine administrée, associée à un temps de résidence plus faible dans la tumeur que celui d'une IgG intacte.



Figure 4 : Fragments obtenus par digestion enzymatique d'une IgG à la pepsine et à la papaïne.

Un clivage enzymatique d'une IgG réalisée par de la pepsine permet d'obtenir un fragment Fc et un fragment F(ab)'2 (en haut à droite) tandis qu'une digestion enzymatique à la papaïne permet d'obtenir un fragment Fc et deux fragments Fab (en bas à droite). D'après Ortega C., 2012.

Les fragments d'anticorps obtenus par protéolyse peuvent également être générés sous forme recombinante, de taille et de valence variables. Ces formats incluent les fragments monovalents scFv (single chain variable fragment) formés de deux domaines variables VH et VL lié par un peptide de jonction de 10 à 25 acides aminés. A partir de cette chaine scFv, diverses stratégies ont été développées pour produire des multimères de scFv tels les diabodies, triabodies et tetrabodies, ainsi que des chimères telles les scFv-Fc et les minibodies (Figure 5). Les fragments de plus petite taille sont appelés nanobodies et correspondent aux domaines VH et VL des Ig de camélidés. Ces fragments recombinants conservent la spécificité des anticorps complets mais peuvent être produits de manière plus économique et possèdent des caractéristiques de biodistribution et de clairance sanguine intéressantes (Olafsen T. *et al.*, 2010).



<u>Figure 5 :</u> Fragments d'anticorps obtenus par ingénierie moléculaire accompagnés de leur poids moléculaire, de leur demi-vie et de leur voie d'élimination.

Plus les fragments sont de petite taille et plus ils se distribuent de manière homogène dans les masses tumorales tout en étant éliminés plus rapidement, ce qui s'accompagne d'une rétention intratumorale plus faible que celle des IgG intactes. D'après Holliger P. *et al.*, 2005 ; Fu R. *et al.*, 2018.

Ainsi, c'est dans le domaine de l'imagerie que les fragments d'anticorps sont les plus populaires et sont alors radiomarqués avec des radioéléments à courte demi-vie : le bruit de fond est diminué par rapport à celui observé lors de l'utilisation d'IgG du fait de l'absence de la région Fc responsable des fixations non spécifiques et de la persistance à long terme des anticorps dans le sang, à l'origine d'une dégradation du ratio signal/bruit. De plus, l'utilisation de fragments éliminés par voie rénale permet d'envisager une imagerie du tissu hépatique, ce qui est difficilement réalisable avec les IgG, majoritairement dégradées par le foie. Cependant, il est parfois difficile de produire des fragments d'anticorps recombinants possédant la même spécificité que celle de l'immunoglobuline correspondante (Fu R. *et al.*, 2018).

Actuellement, deux spécialités pharmaceutiques radiomarquées au technetium-99m sont commercialisées aux Etats-Unis pour une utilisation diagnostique en imagerie. La première est un fragment Fab', obtenu par protéolyse d'un fragment F(ab)'2 dans des conditions réductrices, ciblant l'antigène CEA et appelé arcitumomab (CEA-SCAN®) : il possède une AMM délivrée en juin 1996 par la FDA pour l'imagerie du cancer colorectal, du cancer du sein et du cancer du poumon à petites cellules (Behr T. *et al.*, 1995 ; Erb DA. *et al.*, 2000). La seconde est un fragment Fab appelé nofetumomab merpentan (VERLUMA®) et ciblant la glycoprotéine EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) : il possède une AMM délivrée en octobre 1996 par la FDA pour l'imagerie des cancers du poumon à petites cellules cellules et non à petites cellules (Straka MR. *et al.*, 2000).

En revanche, en oncologie, aucun fragment d'anticorps n'a encore reçu d'AMM pour une utilisation thérapeutique en médecine nucléaire. Cependant, un grand nombre de ces molécules font l'objet de développement préclinique et clinique.

1.2.3. Affibodies et peptides

Les affibodies sont des protéines de la famille des « anticorps mimétiques » dérivées du domaine B de la protéine A staphylococcique et générées par ingénierie moléculaire (phage display, microbial display-based system, microbead display system, protein complementation assay, cell display) (Löfblom J. *et al.*, 2010). Ils possèdent une région composée de 58 acides aminés dont la structure tridimensionnelle correspond à trois hélices alpha et contient le site de fixation pour leur cible : il s'agit du domaine Z. Ils se rapprochent des anticorps monoclonaux et de leurs fragments par leurs spécificités et leurs affinités mais sont de plus petite taille (6 à 7 kDa) et peuvent tolérer des conditions de température (jusqu'à 90°C) et de pH (2,5 à 11) plus extrêmes. Ces molécules sont produites en grande quantité par synthèse chimique et il est relativement aisé d'y intégrer un groupement facilitant le radiomarquage, tels le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique) et le NOTA (acide 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacétique) (Fu R. *et al.*, 2018).

Aucun affibody ne possède actuellement d'AMM pour une utilisation en oncologie nucléaire. Toutefois, de nombreux composés sont en développement préclinique et clinique, la protéine la plus souvent ciblée étant HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2). Le principal facteur limitant l'utilisation de ces vecteurs pour la radioimmunothérapie est la toxicité rénale, leur élimination se faisant par les reins et leur demi-vie étant de quelques dizaines de minutes seulement (Löfblom J. *et al.*, 2010). De plus petite taille, les peptides sont composés d'une succession d'acides aminés dont le nombre n'excède pas 30 à 40. Les vecteurs peptidiques mis au point sont majoritairement des analogues de peptides dont les récepteurs sont surexprimés par les cellules tumorales ciblées.

Une spécialité pharmaceutique, commercialisée sous le nom d'OCTREOSCAN® depuis 1995, permet après radiomarquage à l'indium-111 d'imager les tumeurs endocrines exprimant les récepteurs à la somatostatine. Le vecteur peptidique est le pentétréotide, un dérivé de l'octréotide (octapeptide), analogue de la somatostatine, couplé au DTPA (acide diéthylène triamine pentaacétique). Ces dernières années, d'autres dérivés de l'octréotide radiomarqué au gallium-68 ont obtenu une AMM pour les mêmes indications : NETSPOT® (DOTATATE : DOTA-tyrosine-3-octréotate), IASOtoc® et SOMAKIT TOC® (DOTATOC : DOTA-edotréotide ou DOTA-tyrosine-3-octréotide) ainsi que DOTA-NOC® (DOTANOC : DOTA-1-Nal3-octréotide). Le faible poids moléculaire de ces analogues de la somatostatine et la très courte demi-vie du radionucléide associé permettent l'obtention d'un bilan d'extension corps entier dans les deux heures suivant l'injection du radiopharmaceutique, avec une spécificité et une sensibilité supérieures aux autres techniques conventionnelles ainsi qu'une dosimétrie plus avantageuse pour les patients (Mojtahedi A. *et al.*, 2014).

Ces molécules peptidiques, analogues de la somatostatine, sont également utilisées pour le traitement par radiothérapie interne des tumeurs neuroendocrines. Plusieurs radiopharmaceutiques ont fait l'objet de développement clinique : l'OcreoTher ou ⁹⁰Y-DOTATATE, le ⁹⁰Y-DOTATOC et le ⁹⁰Y-DOTALAN (⁹⁰Y-DOTA-lanréotide). Toutefois, seul le LUTATHERA a obtenu une AMM en septembre 2017 : le DOTATATE radiomarqué au lutétium-177 est indiqué dans le traitement des tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques (TNE-GEP) bien différenciées au stade métastatique ou inopérable, surexprimant des récepteurs de la somatostatine (Vinjamuri S. *et al.*, 2013).

Actuellement, la recherche préclinique et clinique s'intéressent également aux analogues de la gastrine pour une application chez les patients atteints de cancers médullaires de la thyroïdes (CMT) ainsi qu'aux analogues de la substance P chez les patients atteints de gliomes. En ce qui concerne les cancers hématologiques, un intérêt particulier est porté aux analogues du ligand CXCL12 dont le récepteur est CXCR4 pour une indication thérapeutique chez les patients atteints de myélomes multiples et de leucémies (Nicolas GP. *et al.*, 2018).

1.3. Facteurs d'efficacité de la RIT bêta

Les radiopharmaceutiques utilisés en RIT ont pour objectif de véhiculer jusqu'aux cellules tumorales des isotopes émetteurs de rayonnements ionisants cytotoxiques tout en limitant l'exposition des tissus sains : il est primordial que le ratio efficacité anti-tumorale / toxicité soit élevé. Les radiopharmaceutiques sont composés d'un vecteur, d'un radioisotope et d'un agent chélatant autorisant le radiomarquage du vecteur avec un radioélément métallique. Ainsi, lors de la mise au point d'un radiopharmaceutique, plusieurs considérations doivent être prises en compte, portant à la fois sur le vecteur et le radioélément utilisé, mais également sur l'antigène ciblé. L'ensemble de ces facteurs d'efficacité sont énoncés dans la <u>Figure 6</u> : ils déterminent la durée et les doses d'irradiations des tissus tumoraux et des tissus sains.



Figure 6 : Facteurs déterminants de l'efficacité de la RIT.

L'efficacité d'un traitement par radioimmunothérapie dépend de nombreux facteurs, qui influeront également sur sa toxicité. La pharmacocinétique du vecteur, la demi-vie du radioisotope, l'immunoréactivité du radiopharmaceutique et l'expression de l'antigène ciblé dans les tissus sains et les tissus tumoraux doivent être évaluées pour garantir la destruction des cellules tumorales. D'après Stigbrand *et al.*, 1996.

Les antigènes tumoraux sont considérés comme des antigènes associés aux tumeurs et non comme des antigènes spécifiques des tumeurs. En effet, la très grande majorité des antigènes tumoraux ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses mais sont souvent exprimés, bien qu'à un niveau d'expression plus faible, par certaines populations de cellules saines ou dans des situations pathologiques autres que le cancer. Par ailleurs, certains antigènes sont exprimés par deux ou plusieurs types de cancers, tandis que d'autres sont associés à un seul type de cancer.

Pour un ciblage optimal, les antigènes ciblés doivent être fortement et sélectivement exprimés par les cellules cancéreuses. Cette expression doit être stable et homogène à la surface de la quasitotalité ou de toutes les cellules de la tumeur (Green DJ. et Press OW., 2017). Dans le contexte particulier de la RIT bêta, les rayonnements cytotoxiques véhiculés par le radiopharmaceutique injecté sont destinés à nuire non seulement à la cellule sur laquelle se fixe le vecteur, mais également à ses voisines : la RIT bêta n'est pas l'option thérapeutique optimale pour le traitement des maladies résiduelles ou des leucémies (cellules isolées ou en clusters), mais elle est intéressante pour traiter les cancers caractérisés par l'évolution de masses de diamètre centimétrique. La RIT bêta devient alors particulièrement intéressante, cet effet de « feu croisé » étant un avantage non négligeable face à la problématique de l'hétérogénéité de distribution de l'antigène ciblé au sein des tissus tumoraux (Milenic DE. *et al.*, 2004).

Le nombre d'antigènes par cellule ainsi que la présence de ces mêmes antigènes sécrétés dans la circulation sanguine sont également des facteurs qui affectent le nombre de molécules du radiopharmaceutique capables d'atteindre la cible. En effet, la présence dans le sang d'une forme soluble de l'antigène cible sera à l'origine d'une captation du radiopharmaceutique, le rendant alors moins disponible pour une fixation dans les masses tumorales. En revanche, la présence d'un très grand nombre d'antigènes localisés sur la membrane des cellules tumorales favorise l'accumulation dans le tissu tumoral.

Enfin, dans un contexte de RIT, il n'est pas indispensable que l'antigène ciblé possède une activité fonctionnelle critique pour le maintien de la survie des cellules tumorales. Il est néanmoins important de connaître le devenir du complexe antigène-radiopharmaceutique après fixation de ce dernier sur sa cible. En effet, une stabilisation de ce complexe au niveau membranaire n'a pas les mêmes conséquences qu'une internalisation suivie d'une dégradation. Dans l'hypothèse où le complexe antigène-radiopharmaceutique serait internalisé avant d'être métabolisé, il faudra prendre en compte le comportement du radioélément utilisé sous sa forme libre. Par exemple, l'iode-131, après séparation d'avec son vecteur, est relargué dans l'espace extracellulaire et s'accumule dans la thyroïde : la RIT utilisant l'iode-131 comme radioisotope a une efficacité si le complexe antigène-radiopharmaceutique reste extérieur à la cellule cible (Milenic DE. *et al.*, 2004) ou si l'iode est fixé à l'anticorps à l'aide d'agents couplants restant séquestrés à l'intérieur de la cellule après dégradation de l'anticorps. On parlera alors d'anticorps résidualisants (Stein R. *et al.*, 1995).

Les propriétés physiques (période radioactive, énergie de la particule émise et transfert d'énergie linaire) et chimiques des radioisotopes décident du type de vecteur pouvant être radiomarqués et de quelle manière. Il est primordial de faire correspondre la demi-vie du radioélément avec la pharmacocinétique du vecteur afin de s'assurer que l'accumulation du radiopharmaceutique dans le tissu tumoral permettra la destruction d'un grand nombre de cellules. En RIT bêta, les principaux radioéléments utilisés ont été présentés dans le <u>Tableau 2</u> de la section 1.1.3. Ces isotopes ont des demi-vies variant de 2,6 à 8 jours. En RIT bêta, les vecteurs les plus souvent sélectionnés sont des anticorps complets. Ces derniers s'accumulent lentement dans les tissus tumoraux du fait de leur grande taille, mais circulent également plus longtemps dans le sang : il en

résulte une fixation tumorale importante et un temps de résidence prolongé dans les tumeurs, à l'origine de la délivrance d'une dose de rayonnement capable de détruire les cellules ciblées.

Une attention particulière doit également être portée aux conditions de radiomarquage, les immunoglobulines étant des biomolécules dont la structure tertiaire est déterminée par de nombreuses liaisons non covalentes. Des conditions de température et de pH extrêmes, tout comme des conditions réductrices, nécessaires à certains radiomarquages peuvent affecter leur structure tridimensionnelle. Choisir une stratégie de marquage adaptée au vecteur est une étape clé pour s'assurer la conservation de l'affinité et de la spécificité du vecteur pour sa cible. Le radiomarquage à l'iode-131 se fait par radio-iodination directe des résidus tyrosine ou par l'intermédiaire d'un groupement bifonctionnel capable de se lier au vecteur et à l'isotope de manière covalente, dans des conditions ne dénaturant pas les immunoglobulines. A l'inverse, lorsque le radioisotope émetteur bêta est un métal, les anticorps complets et les fragment d'anticorps sont radiomarqués en deux étapes : la première repose sur le couplage du vecteur avec une molécule chélatrice bifonctionnelle, suivie d'une étape de radiomarquage proprement dite dans des conditions plus douces. Des exemples de molécules chélatrices bifonctionnelles fréquemment utilisés dans l'élaboration des radiopharmaceutiques sont présentés dans la Figure 7. Il s'agit notamment du DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique) qui chélate préférentiellement l'indium et le lutétium, et du CHX-A"DTPA (acide trans-cyclohexyltriamine penta-acétique) qui chélate préférentiellement l'yttrium et le bismuth (Milenic DE. et al., 2004). Ainsi, la liaison de l'isotope à son vecteur, par l'intermédiaire d'un agent chélatant dans le cas des isotopes métalliques ou par liaison covalente comme c'est le cas pour l'iode, doit être cinétiquement et thermodynamiquement stable dans l'organisme receveur. En effet, la dégradation in vivo du radiopharmaceutique aboutissant à la formation de métabolites radioactifs pourrait être à l'origine d'une toxicité et/ou d'une perte d'efficacité de la RIT.

La position des molécules chélatrices, leur nombre et leur taille relative par rapport au vecteur peuvent également influencer l'efficacité du ciblage en modifiant l'immunoréactivité du radiopharmaceutique. Il est en effet essentiel que le site de fixation sur la cible ne soit pas compromis et que le radiomarquage des molécules d'un même lot soit homogène et reproductible afin de favoriser un transfert du radiopharmaceutique en clinique (Fu R., 2018).



Figure 7 : Exemples de groupements chélateurs bifonctionnels utilisés en radioimmunothérapie. La conjugaison du radioélément métallique avec le vecteur se fait par le biais du groupement thiocyanate. Les métaux interagissent avec la molécule chélatrice par le biais des groupements amine et carboxyl. Milenic DE. *et al.*, 2004.

Depuis quelques années, une nouvelle approche de radioimmunothérapie préciblée ou PRIT se développe. La PRIT repose sur l'administration en deux temps de réactifs afin de dissocier la période pendant laquelle une grosse molécule, telle les immunoglobulines, se distribue dans l'organisme et la période d'irradiation des tissus. Les anticorps dirigés contre les cellules tumorales sont injectés sous une forme non radioactive : ils peuvent ainsi s'accumuler lentement dans le tissu tumoral sans que le reste de l'organisme ne soit exposé aux rayonnements cytotoxiques du fait de leur circulation sanguine. Après un temps de latence de 1 à 4 jours au cours duquel la majorité de l'anticorps est éliminé de la circulation sanguine, une molécule de petit poids moléculaire radiomarquée et possédant une très forte affinité pour les anticorps anti-tumoraux est injectée. Ce second réactif est de petite taille et pénètre rapidement dans le tissu tumoral où il est « capturé » par les anticorps de préciblage. Les molécules radioactives non liées sont rapidement éliminées par voie urinaire ou biliaire. L'élimination du radiopharmaceutique libre peut être facilitée en injectant juste avant son administration un agent de clairance dont le rôle est de rendre indisponibles les anticorps anti-tumoraux non liés et encore circulants : la fixation du radiopharmaceutique sur son anticorps cible est ainsi cantonnée au tissu tumoral (Green DJ. et Press W., 2017).

De nombreuses techniques de PRIT ont été évaluées, dont l'utilisation d'un anticorps couplé à la streptavidine et une molécule de DOTA-biotine. Cette approche est actuellement la plus utilisée, mais reste critiquée du fait du fort pouvoir immunogène de la streptavidine et de l'existence de biotine circulante endogène devenant alors un agent compétiteur du DOTA-biotine. Afin de dépasser les limites de ce système streptavidine-biotine, des approches alternatives se sont développées. La méthode la plus avancée dans son développement clinique est appelée « affinity enhancement system » ou AES. Elle repose sur l'utilisation d'un anticorps bispécifique reconnaissant à la fois l'antigène tumoral ciblé et un haptène bivalent radiomarqué. L'affinité de l'haptène pour la forme fixée de l'anticorps anti-tumoral en comparaison à sa forme circulante est augmentée par un effet de coopérativité créée par la bivalence de l'haptène. L'haptène bivalent est alors reconnu par deux anticorps bispécifiques et assure la formation d'un pont à la surface des cellules tumorales, stabilisant ainsi la liaison antigène tumoral – anticorps (Barbet J. *et al.*, 1999). En comparaison avec l'utilisation d'un système de ciblage direct, la technique AES nécessite des études fines afin d'optimiser la fixation tumorale et les doses délivrées. En supplément de tout ce qui a déjà été mentionné, il faut prendre en compte le rapport des doses molaires de l'anticorps et de l'haptène ainsi que l'intervalle d'injection entre l'anticorps et l'haptène (Van de Watering FC. *et al.*, 2014).

Une autre méthode de préciblage s'appuie sur un procédé appelé « chimie-click ». Cette méthode se base sur la chimie biorthogonale, définie par l'équipe de Bertozzi en 2003 : aucun des réactifs n'interagit ou n'interfère avec des processus biologiques *in vivo* (Hang HC. *et al.*, 2003). Dans un contexte de pRIT, l'anticorps reconnaissant spécifiquement un antigène tumoral et la molécule radiomarquée sont équipés chacun d'un groupement complémentaire qui réagissent spécifiquement entre eux. En particulier, les réactions de chimie-click impliquant le trans-cyclooctène (TCO) et des tétrazines déficitaires en électrons se déroulent très rapidement dans les milieux biologiques : ces réactions sont appelées IEDDA réactions (inverse-electron-demand Diels-Alder) (Devaraj NK. *et al.*, 2009). Le développement de cette technique n'en est qu'au stade préclinique, mais cette dernière est très prometteuse.

Malgré toutes ces avancées pour améliorer l'efficacité de la RIT, cette dernière reste une option thérapeutique peu prescrite et seules deux spécialités pharmaceutiques sont aujourd'hui commercialisées : le ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan radiomarqué à l'yttrium-90) et le LUTATHERA® (DOTATATE radiomarqué au lutetium-177). Les limites de l'utilisation de la RIT sont multifactorielles mais reposent principalement sur une administration moins aisée et une disponibilité restreinte en comparaison avec d'autres thérapies. Il faut toutefois souligner qu'un traitement au ZEVALIN® en consolidation d'un premier traitement par polychimiothérapie dans le cadre d'un lymphome non-hodgkinien est moins onéreux qu'une maintenance avec du rituximab. De plus, un traitement par RIT est moins contraignant pour les patients, ce qui devrait représenter un avantage dans la prise en compte de leur qualité de vie (Green DJ. et Press OW., 2017).

1.4. Apport de l'imagerie quantitative

1.4.1. Définition de l'imagerie phénotypique

En oncologie, il est primordial que l'imagerie donne accès à la cartographie des lésions primitives et métastatiques chez des patients, ce qui n'est pas le cas des biopsies généralement réalisées au niveau de la tumeur primitive et parfois de quelques sites secondaires. Ainsi, en pratique clinique, les techniques d'imagerie anatomique telles la tomodensitométrie et l'imagerie par résonnance magnétique sont incontournables pour le diagnostic, la détermination et la révision du stade de la maladie ainsi que pour l'évaluation de la réponse thérapeutique. La médecine nucléaire, quant à elle, permet la caractérisation des lésions tumorales des points de vue métabolique (imagerie fonctionnelle) et moléculaire (imagerie phénotypique) à l'aide de la tomographie par émission monophotonique (TEMP) et de la tomographie par émission de positon (TEP). En effet, l'imagerie fonctionnelle et l'imagerie phénotypique sont en plein essor depuis quelques années : de nombreux vecteurs (anticorps monoclonaux, fragments d'anticorps, etc.) font l'objet d'évaluations préclinique et clinique en vue notamment d'orienter la prescription de thérapies ciblées (Freise AC. et Wu AM., 2015).

1.4.1.1. Principes de la TEMP et de la TEP

La tomographie par émission monophotonique ou TEMP est une technique d'imagerie nucléaire en trois dimensions. Un émetteur de rayonnements gamma, seul ou associé à une molécule dont le tropisme est connu, est injecté au patient, le plus souvent par voie intraveineuse. Une gamma-caméra, constituée d'un collimateur permettant la sélection angulaire des photons et de détecteurs de rayons gamma, tourne autour du patient pendant l'acquisition (Figure 8). Un algorithme de reconstruction tomographique permet ensuite de reconstruire la cartographie tridimensionnelle de la distribution de l'activité radioactive dans le patient. Lorsque cette imagerie est couplée à un examen tomodensitométrique, on parle de TEMP/TDM. Les radioélements principalement utilisés pour réaliser des imageries TEMP sont le gallium-67, le technetium-99m et l'indium-111 (Hutton BF., 2014).



Figure 8 : Principe et composante d'une gamma caméra.

Le collimateur, composé de canaux parallèles, permet de ne comptabiliser que les photons arrivant perpendiculairement à sa surface. Le cristal scintillant convertit l'énergie des photons γ en photons UV. Après conduction par le guide de lumière, les photomultiplicateurs les transforment en signaux électriques amplifiés. Ces derniers sont recueillis et traités par une électronique d'acquisition. Chiavassa S., 2005.

La tomographie par émission de positon ou TEP est également une technique d'imagerie nucléaire en trois dimensions. Un radiopharmaceutique, le plus souvent une molécule ayant un tropisme connu marquée avec un radionucléide émetteur de rayonnements bêta +, est injecté par voie intraveineuse au patient. L'émetteur bêta + se désintègre en libérant un positon qui s'annihile en rencontrant un électron (trajet de 1 à 5 mm en fonction de l'énergie des positons) : deux photons gamma de 511 keV sont alors libérés, partant dans la même direction mais avec des sens opposés. Les capteurs de la caméra TEP, situés tout autour du patient, détectent les photons d'annihilation en coïncidence (c'est-à-dire ceux qui arrivent en même temps), permettant d'identifier la ligne sur laquelle se situe l'émission des photons. Un algorithme de reconstruction permet ensuite d'élaborer les images de la répartition du traceur au niveau d'une partie ou de la totalité du corps sous la forme d'une image 2D ou d'un objet 3D (Figure 9). Les images ainsi obtenues sont dites « d'émission ». La résolution spatiale de l'image est comprise entre 4 et 7 mm en imagerie clinique (Turkington TG., 2001). Lorsque cette imagerie est couplée à un examen tomodensitométrique, le terme employé est « TEP/TDM »; lorsqu'elle est couplée à un examen d'imagerie par résonance magnétique, le terme employé est « TEP/IRM ». Les logiciels de traitement d'images utilisés pour l'exploitation des acquisitions permettent de fusionner les informations apportées par l'imagerie de type anatomique et celles de l'imagerie fonctionnelle. Les radioisotopes principalement utilisés pour la réalisation d'une imagerie TEP sont le fluor-18, le gallium-68, ou encore le scandium-44, le cuivre-64 et le zirconium-89, ces trois derniers éléments étant utilisés en recherche.



Figure 9 : Principe de la tomographie par émission de positons : la détection d'un photon γ en coïncidence. Semah F. *et al.*, 2004.

1.4.1.2. Caractéristiques de l'imagerie phénotypique

En médecine nucléaire, l'imagerie phénotypique est une technique d'imagerie permettant d'observer *in vivo*, à l'échelle du corps entier et de manière non-invasive, l'expression et la distribution de biomarqueurs tumoraux à l'aide de radiopharmaceutiques dont l'élément vectoriel est un anticorps, un fragment d'anticorps ou une protéine se fixant spécifiquement sur sa cible. Lorsque le vecteur utilisé est un anticorps ou un fragment d'anticorps, on parle alors d'immuno-TEMP ou d'immuno-TEP.

Ainsi, l'imagerie phénotypique joue un rôle important dans le diagnostic des cancers, le bilan d'extension et le suivi de la réponse thérapeutique. Les méthodes conventionnelles reposant sur les biopsies sont invasives et sont une source d'inconfort pour le patient. De plus, les biopsies ne sont pas toujours représentatives des marqueurs exprimés dans une masse tumorale du fait d'une forte hétérogénéité de distribution intratumorale possible. En comparaison, l'imagerie phénotypique est beaucoup moins invasive et apporte des informations à propos de l'ensemble des lésions tumorales (site primitif et localisations secondaires). A la différence de la tomographie par émission de positon (TEP) au ¹⁸F-FDG (fluorodésoxyglucose radiomarqué au fluor-18) qui renseigne sur le métabolisme des masses tumorales, l'imagerie phénotypique délivre des informations concernant des biomarqueurs en ciblant spécifiquement des protéines d'intérêt (Löfblom J. *et al.*, 2010). Par exemple,

une étude a été réalisée chez 8 patientes atteintes de cancers du sein dont la surexpression de HER-2 a été objectivée par immunohistochimie sur biopsies. Ces patientes ont reçu une injection de trastuzumab couplé au DOTA et radiomarqué au cuivre-64 (364 à 512 MBq, 5 mg de radiopharmaceutique) associée à une prédose de trastuzumab (45 mg). Les résultats ont montré pour cette technique d'immuno-TEP une sensibilité, lorsque l'imagerie est réalisée à J2 post-injection, comparable à celle de la ¹⁸F-FDG-TEP. L'immuno-TEP renseigne en supplément sur l'hétérogénéité de la surexpression de HER-2 ainsi que sur l'envahissement de certains organes non évalués avec la ¹⁸F-FDG-TEP, comme c'est le cas du cerveau (Mortimer JE. *et al.*, 2014).

Lorsque l'imagerie phénotypique est réalisée en amont d'une RIT utilisant le même vecteur en quantité équivalente et avec des acquisitions successives au cours du temps après l'injection du radiopharmaceutique, il est possible de faire une étude de dosimétrie. Cette dernière a pour objectif de déterminer la dose déposée aux tumeurs et aux organes sains afin de prédire et d'évaluer l'efficacité d'un traitement par RIT tout comme sa toxicité (Löfblom J. *et al.*, 2010).

1.4.2. Dosimétrie

En radioimmunothérapie, l'efficacité anti-tumorale doit s'accompagner d'une préservation des tissus sains. La dosimétrie est une discipline qui permet de déterminer de manière quantitative la dose absorbée reçue par un volume d'intérêt (l'organisme entier, un organe, un tissu) et de la relier à un effet biologique. Le nombre croissant d'essais cliniques de radioimmunothérapie rend nécessaire la réalisation d'études dosimétriques pour évaluer, comparer et optimiser les protocoles de traitement. Lorsque les études dosimétriques sont réalisées en amont du traitement, elles peuvent permettre d'optimiser le traitement en adaptant les activités injectées à la surface corporelle du patient. On parle alors de dosimétrie prédictive. Ce dernier aspect est particulièrement important puisque aujourd'hui, les traitements de RIT sont administrés de manière standardisée. La radiosensibilité individuelle n'est pas prise en compte alors que des variations allant jusqu'à 20% sont observées (Burnet NG. *et al.*, 1996).

La dosimétrie interne des radionucléides s'est développée dès 1920 pour aboutir au formalisme actuel du Comité Médical Internal Radiation Dose ou MIRD en 1968. Ce formalisme a été publié sous forme de 26 pamphlets (Ljungberg M. et al., 2016).

1.4.2.1. Activité cumulée

D'après le formalisme du MIRD, pour calculer la dose absorbée reçue par un organe, il est nécessaire de connaître l'activité cumulée de cet organe. En effet, l'irradiation après administration interne se déroule sur une durée non négligeable. La mesure de l'activité fixée dans l'organe d'intérêt 56 doit être répétée à des temps différents afin d'établir la courbe de décroissance de la fixation dans cet organe. L'activité cumulée se calcule en intégrant l'activité présente dans l'organe (source) au cours du temps : elle correspond à l'aire sous la courbe représentant l'activité (nombre de désintégrations par seconde) mesurée dans l'organe en fonction du temps. Elle correspond à la totalité des désintégrations ayant lieu dans l'organe étudié dans l'intervalle de temps considéré et s'exprime en Bq.s.

En médecine nucléaire, le calcul de l'activité cumulée dans les organes fixant le radiopharmaceutique évalué peut être réalisé à l'aide de plusieurs méthodes. Les méthodes sans imagerie ne sont pas toujours intéressantes en recherche clinique car trop invasives (comptage de l'activité présente dans des biopsies), trop contraignantes (comptage de l'activité présente dans les urines et les selles) ou trop restrictives (comptage de l'activité avec un détecteur externe adapté uniquement pour déterminer l'activité corps entier). Toutefois, le comptage de l'activité présente dans le sang est facilement envisageable et est le plus souvent intégré dans les essais cliniques. Les méthodes avec imagerie en deux dimensions de type scintigraphie planaire, ou en trois dimensions de type TEMP ou TEP, sont ainsi privilégiées : on parle alors d'imagerie quantitative (Siegel JA. *et al.*, 1999).

Le travail de thèse ayant été réalisé à l'aide d'une caméra TEMP, seules les méthodes de dosimétrie concernant la TEMP seront abordées par la suite.

L'imagerie quantitative en tomographie par émission monophotonique se base sur des acquisitions d'images en trois dimensions, ce qui nécessite l'utilisation d'un algorithme de reconstruction adapté. Le temps d'acquisition des images est relativement long, ce qui représente une contrainte pour les patients. Cependant, elle présente l'avantage majeur par rapport au mode planaire de s'affranchir du problème de la superposition des sources, c'est à dire des organes fixant le radiopharmaceutique (Rosenthal MS. *et al.*, 1995).

Il existe des limites à la quantification et à la localisation des sources par imagerie TEMP, la résolution spatiale de la TEMP étant de l'ordre du centimètre. En effet, les gamma caméras ne détectent que les photons primaires émis parallèlement à l'axe des trous des collimateurs. Cette détection est perturbée par plusieurs phénomènes, certains étant illustrés dans la <u>Figure 10</u> :

- l'absorption dans le patient : ce phénomène, aussi appelé atténuation, peut être corrigé grâce à l'utilisation d'une carte d'atténuation déterminée grâce aux informations obtenues par une acquisition tomodensitométrique (scanner ou TDM)
- la diffusion dans le patient
- l'auto-absorption dans les sources épaisses
- la pénétration septale à travers le collimateur
- l'effet de volume partiel
- le bruit de fond

 le temps mort lorsque le taux de comptage est élevé : l'activité injectée doit être adaptée à la taille du patient ainsi qu'à la gamma caméra utilisée

La quantification réalisée à partir des acquisitions d'imagerie TEMP est une étape délicate mais essentielle de la dosimétrie et de nombreux phénomènes physiques doivent être corrigés, notamment la diffusion et l'atténuation. L'activité cumulée est alors déterminée dans des régions correspondant à des organes d'intérêt, comme le foie, la rate, les reins, les poumons ou encore la moelle osseuse hématopoïétique. Selon la taille de l'organe, il est possible de prendre en compte une hétérogénéité de distribution de l'activité cumulée dans ces organes.



Figure 10 : Illustration des différents phénomènes perturbant la détection des rayonnements avec une gamma caméra.

a) absorption, b) diffusion, c) auto-absorption dans les sources épaisses, d) superposition de plusieurs sources (mode planaire), e) pénétration septale à travers le collimateur Chiavassa S., 2005.

1.4.2.2. Dose absorbée

En connaissant l'activité cumulée d'une région cible k et le nombre de particules libérées ainsi que leur énergie respective lors d'une désintégration, il est possible de calculer l'énergie E_k libérée dans une région cible au cours d'un intervalle de temps déterminé. E_k s'exprime en joule.bequerel-¹.seconde-1</sup> (ou J.Bq-¹.s-¹).

La dose absorbée D reçue par une région cible k correspond à la quantité d'énergie E_k déposée dans cette région par les rayonnements ionisants émis par une ou plusieurs sources, par unité de masse m_k de la région cible. D s'exprime en gray (Gy), 1 Gy correspondant à 1 joule.kilogramme⁻¹ (ou J.kg⁻¹).

Le calcul de la dose absorbée reçue par chaque région d'intérêt étant réalisée à l'aide de l'imagerie quantitative, l'activité détectée par les acquisitions TEMP est exprimée en pourcentage d'activité injectée. Les valeurs obtenues, corrigées de la décroissance du radioélément, informent sur la quantité de vecteur présent dans l'organe à un temps donné, ce qui permet ensuite de calculer une dose absorbée correspond au radioélément utilisé en thérapie, le vecteur restant le même.

Lorsqu'une dose absorbée est calculée dans le cadre d'une radioimmunothérapie bêta, il faut prendre en compte la dose absorbée résultant des désintégrations ayant lieu au sein de l'organe en provenance de molécules radioactives fixées par l'organe, mais également des désintégrations ayant lieu dans l'organe étudié en provenance de molécules radioactives fixées par les organes voisins. On parle dans la première situation de self-dose ou dose auto-absorbée et dans la seconde situation de cross-dose. La self-dose et la cross-dose sont égales au produit de l'activité cumulée dans une source par le S-facteur reliant cette source à la cible : la cible et la source sont identiques dans le premier cas, tandis que dans le second cas les sources correspondent aux organes adjacents au volume cible d'intérêt.

Les S-facteurs correspondent aux doses déposées dans la cible étudiée lorsqu'une désintégration se produit dans la source considérée. Ces valeurs sont répertoriées dans des tables et ont été obtenues à partir d'études réalisées sur des fantômes. Il est également possible de les déterminer au cas par cas à l'aide de calculs le plus souvent de type Monte Carlo.

2. RADIOIMMUNOTHERAPIE ET PRATIQUES CLINIQUES CHEZ L'HOMME

La radioimmunothérapie associe la spécificité anti-tumorale des anticorps ou dérivés d'anticorps et les propriétés cytotoxiques des rayonnements ionisants. Alors que la RIT a été introduite avec succès dans la pratique clinique et la prise en charge des cancers hématologiques tels les leucémies et les lymphomes, les résultats observés dans les cas de cancers solides sont plus nuancés.

2.1. RIT des tumeurs solides

Actuellement, seule une spécialité radiopharmaceutique composé d'un peptide radiomarqué a obtenu une AMM pour le traitement par RIT des cancers solides : le LUTATHERA®, pour le traitement

des tumeurs neuroendocrines non opérables. En effet, les résultats obtenus lors des essais cliniques sont modestes et l'index thérapeutique est insuffisant. Les principaux écueils rencontrés dans la RIT des cancers solides sont les suivants (Gudkov SV. *et al.*, 2015) :

- les cellules tumorales des cancers solides sont peu radiosensibles en comparaison avec les cellules tumorales des cancers hématologiques, ce qui peut également être renforcé par l'existence de régions hypoxiques au sein des masses tumorales.
- les tumeurs solides sont moins vascularisées que les cancers hématologiques et le drainage lymphatique y est également plus limité : l'activité, et donc indirectement la quantité d'anticorps radiomarqués, devant être administrée pour assurer des doses efficaces aux tumeurs est plus élevée dans le cas des cancers solides en comparaison avec les cancers hématologiques. Ceci a pour conséquence d'augmenter les risques d'irradiation des tissus sains par la présence d'anticorps radioactifs circulants en plus grande quantité.
- La fixation du radiopharmaceutique débute majoritairement à la périphérie des masses tumorales ce qui peut limiter la diffusion de l'anticorps radiomarqué jusqu'au centre de ces masses tant que tous les « sites périphériques » ne sont pas saturés.

Plusieurs approches ont été développées ces dernières années afin de dépasser ces facteurs limitants : positionnement de la RIT en thérapie néoadjuvante et combinée avec une chimiothérapie conventionnelle ou une radiothérapie externe, administration locale du radiopharmaceutique et approches de préciblage. De nombreux essais cliniques sont en cours et des résultats prometteurs pourraient permettre de positionner la RIT comme traitement de choix des cancers solides dans un futur proche (Bourgeois M. *et al.*, 2017 ; Bartholoma MD., 2018).

2.1.1. La radioimmunothérapie compartimentée

L'une des approche envisagée pour améliorer l'efficacité de la RIT des tumeurs solides est la radioimmunothérapie compartimentée ou cRIT. L'objectif est de favoriser l'accès des anticorps radioactifs aux cellules cancéreuses avec une concentration satisfaisante dans un espace confiné, avec pour conséquence la délivrance d'une dose plus grande en comparaison avec ce qui est observé lors d'injection systémique.

Notamment, pour le traitement des cancers du système nerveux central ou les métastases cérébrales d'autres cancers, une administration intraventriculaire ou par voie intrathécale permet de délivrer une dose dix fois supérieure par rapport à une injection intraveineuse (Larson SM. *et al.*, 2015). Plusieurs radiopharmaceutiques ont fait et font encore l'objet d'études cliniques chez des patients atteints de cancers du système nerveux central à haut risque métastatique, de médulloblastomes et de neuroblastomes. Les résultats sont encourageants et le radioimmunoconjugué ¹³¹I-8H9 (burtomab), développé par le Memorial Sloan Kettering Cancer Center (Y-mAbs Therapeutics,

Inc.) et indiqué pour le traitement des patients pédiatriques atteints de neuroblastomes métastatiques en rechute ou réfractaire au traitement, a reçu le prix Breakthrough Therapy Designation remis par la FDA en juin 2017 (Kramer K. *et al.*, 2018). Egalement, une étude clinique de faisabilité de RIT alpha compartimentée a été menée chez des patients atteints de cancer du système nerveux central (14 glioblastomes multiformes ou GBM, 3 oligodendrogliomes anaplasiques et 1 astrocytome anaplasique). Après résection chirurgicale des masses tumorales, un anticorps monoclonal murin antitenascine (glycoprotéine de la matrice extracellulaire surexprimée dans les gliomes de haut grade et absente du tissu nerveux sain) radiomarqué à l'astate-211 a été injecté dans la cavité opératoire. Les résultats montrent qu'il est possible de réaliser une RIT alpha compartimentée dans des conditions acceptables pour les patients et pour laquelle le bénéfice thérapeutique attendu est prometteur : la médiane de survie des patients atteint de GBM est de 57 semaines (23 semaines pour les patients traités de manière conventionnelle) et le taux de survie à 1 an est de 61% (Zalutsky MR. *et al.*, 2007).

Une autre application de la cRIT est le traitement des carcinomatoses péritonéales. Il y a une vingtaine d'années, des études cliniques impliquant des patients atteints de cancers gastriques ou ovariens avaient été menées, avec des résultats variables. Des études plus récentes ont abouti à des résultats mitigés du fait d'une forte toxicité hématologique, expliquée par une instabilité du radiopharmaceutique et son absorption dans le système vasculaire. Une étude de phase I a également été menée chez des patients atteints de cancers intrapéritonéaux surexprimant HER-2 avec du trastuzumab radiomarqué au plomb-212 (NCT01384253). Les 18 patients (2 cancers du colon et 16 cancers de l'ovaire) ont été traité avec 6 niveaux d'activité et suivis pendant un an. Les toxicités observées (hématologiques, gastro-intestinales, biochimiques) ont été classées en grade 1 et ont été transitoires. Tous les patients ont montré une progression dans les 8 mois suivant le traitement (Meredith RF. et al., 2018). Enfin une étude de phase I a été réalisée en injectant par voie intrapéritonéale un anticorps radiomarqué à l'astate-211 chez des patientes atteintes de carcinome ovarien. Cette étude de faisabilité a confirmé la possibilité d'administrer, avec une injection intrapéritonéale, un anticorps radiomarqué avec un émetteur alpha en espérant atteindre des doses thérapeutiques reçues par les tumeurs sans toxicité majeure (Andersson H. et al., 2009). Ainsi, la cRIT administrée par voie intrapéritonéale est associée à des résultats variables dans le traitement des tumeurs solides et n'est envisageable que chez les patients présentant une faible masse tumorale, des cancers radiosensibles et/ou après une résection chirurgicale.

Des recherches ont également été menées pour évaluer l'efficacité de la RIT intralésionnelle. C'est le cas de l'étude de phase I réalisée chez des patients atteints de mélanomes métastatiques cutanés avec un anticorps radiomarqué au bismuth-213, un émetteur alpha. L'activité injectée variait de 1,85 à 16,65 GBq. Les résultats tendent vers la délivrance d'une forte dose aux tumeurs sans toxicité associée, avec une efficacité anti-tumorale observée dès le palier 7,4 GBq (Allen BJ. *et al.*, 2005).

2.1.2. Radiosensibilisation des cellules cancéreuses en association avec la RIT

Combiner la RIT avec une autre option thérapeutique est une deuxième approche permettant d'augmenter l'efficacité de la RIT des tumeurs solides, en intervenant sur différentes cibles par exemple, pour augmenter l'index thérapeutique global.

L'équipe de Wong a déterminé, dans une étude de phase I, quelle était la dose maximale tolérée (DMT) de gemcitabine en association avec une RIT anti-ACE (antigène carcino-embryonnaire) à l'yttrium-90 chez des patients atteints de cancers colorectaux. Bien qu'il s'agisse d'une étude centrée sur la DMT de la gemcitabine combinée avec la RIT anti-ACE (activité injectée fixe, environ 615 MBq/cm²), un patient a montré une réponse partielle et quatre patients ont montré une diminution de plus de 50% de leur taux de ACE circulant. Cependant, l'étude a du être stoppée chez 12 des 35 patients du fait de la mise en évidence de réponse anti-anticorps chimériques de souris (Shibata S. et al., 2009). Une étude de phase I/II plus récente de la même équipe, associant en supplément de la fluorodeoxyuridine, a été menée chez des patients atteints de cancers colorectaux métastasés au foie et après résection chirurgicale. Parmi les 16 patients inclus, des lésions tumorales étaient toujours visibles à l'imagerie après le traitement chez 6 d'entre eux (2 réponses complètes, 1 réponse partielle, 2 maladies stables et 1 maladie en progression), les 10 autres patients ne présentant plus aucune lésions et ce jusqu'à la fin de l'essai. Cette étude a permis de démontrer que la RIT, accompagnée d'une chimiothérapie systémique (gemcitabine) et locale au niveau hépatique (fluorodeoxyuridine), pouvait être avantageuse en particulier chez les patients présentant une faible masse tumorale, tout en étant associée à une toxicité équivalente à celle observée lors de RIT seule (Cahan B. et al., 2017).

Une étude de phase I a été menée chez des patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules afin de déterminer la DMT d'une RIT avec un anticorps anti-CEA radiomarqué à l'yttrium-90 après une radiothérapie externe seule ou couplée à une polychimiothérapie (paclitaxel/carboplatine ou cisplatine/etoposide). Les résultats ne sont pas encore connus, le dernier des 10 patients inclus ayant intégré l'étude en février 2018 (NCT00738452).

Deux études cliniques de phase I sont en cours afin d'évaluer l'efficacité d'une RIT combinée à l'administration de paclitaxel et de ciclosporine chez des patients atteints de cancers prostatiques non hormono-dépendants et de cancers du sein récidivants ou réfractaires au traitement (NCT00009750, NCT00009763). La ciclosporine est ici administrée en vue de réduire la réponse immunitaire des patients dirigés contre le radiopharmaceutique, une IgG₁ monoclonale d'origine murine ciblant MUC-1 (mucine épithéliale surexprimée par un grand nombre de cellules carcinomateuses) et radiomarquée à l'yttrium-90 : administration pendant les 3 jours qui précèdent et les 25 jours qui suivent l'injection de l'anticorps murin radiomarqué à 5 mg.kg⁻¹ deux fois par jour. Peu de résultats sont actuellement disponibles pour ces études, en dehors de l'existence de toxicités hématologiques sévères incluant des neutropénies de grade 3 et 4 (Richman CL. *et al.*, 2005). De plus, la question de l'intérêt de provoquer une immunosuppression chez des patients atteints de cancer se pose.

2.1.3. Améliorer la pénétration intratumorale et limiter la toxicité : la radioimmunothérapie pré-ciblée (PRIT)

Le pré-ciblage permet de d'administrer en deux temps un anticorps ciblant les cellules tumorales, dont le temps de circulation dans le sang est long et l'accumulation dans les masses tumorales lente, ainsi qu'un radionucléide couplé à une molécule de faible poids moléculaire ayant la capacité de se fixer aux anticorps pré-localisés dans la tumeurs. Cette approche permet, dans le cas des cancers solides, d'injecter une activité plus importante en vue d'augmenter la dose délivrée aux tumeurs tout en préservant les tissus sains, notamment la moelle hématopoïétique.

Le préciblage peut se faire avec un anticorps bispécifique dont un bras reconnaît la cellule tumorale ciblée et l'autre bras un haptène radiomarqué. Les haptènes utilisés sont généralement des chélateurs de métaux, de petite taille et dont l'excédent, non fixé par les anticorps des sites tumoraux, est rapidement éliminé de la circulation sanguine par voie urinaire. Le premier haptène développé et utilisé dans les essais cliniques à visée diagnostique était le DTPA radiomarqué à l'indium-111 (Divgi R. et al., 1991 ; Stickney DR. et al., 1991 ; Collier BD. et al., 1992). Cependant, cet haptène n'est que peu utilisable en thérapie car il n'est pas un bon chélateur de l'yttrium-90 ni du lutetium-177. L'équipe du Professeur Kraeber-Bodéré, membre de l'unité de recherche dans laquelle nous effectuons notre thèse, a mené plusieurs études de phase I (Kraeber-Bodéré F. et al., 1999; Kraeber-Bodéré F. et al., 2006; Chatal JF. et al., 2006) et une étude multicentrique de phase II (NCT00467506) chez des patients atteints de carcinomes médullaires thyroïdiens (CMT) en utilisant un anticorps chimérique bispécifique anti-CEA et anti-DTPA en association avec un haptène bivalent di-DTPA radiomarqué à l'iode-131. Dans cette dernière étude, les patients recevaient une injection de ¹³¹I-di-DTPA entre 4 et 6 jours après l'injection de l'anticorps bispécifique. Les résultats obtenus chez 42 patients atteints de CMT agressifs ou métastatiques ont montré qu'un tel traitement avait un effet anti-tumoral intéressant (survie globale de 43,9 mois et survie sans progression de 13,6 mois) associée à une toxicité hématologique raisonnable (Salaun PY. et al., 2012), le taux historique de survie globale à 5 ans étant de 25% (Schlumberger M. et al., 2012).

L'équipe de Sharkey a développé un système plus flexible en utilisant des anticorps bispécifiques reconnaissant un dérivé de l'histamine, l'histamine-succinyl-glycine (HSG), raccordé à une molécule de DOTA (Sharkey RM. *et al.*, 2003(b)). Ce travail d'optimisation a abouti à l'élaboration d'un anticorps bispécifique trivalent appelé TF2, composé de deux bras reconnaissant l'ACE et d'un troisième reconnaissant un composé radiomarqué nommé IMP-288 (DOTA-di-HSG) (McBride WJ. *et al.*, 2006). Ce couple TF2/IMP-288 a été évalué dans plusieurs essais cliniques et dans plusieurs types de cancers solides.

Une étude de phase I (NCT00860860) menée chez des patients atteints de cancers du colon a permis de déterminer les quantités optimales du couple TF2/IMP-288 devant être administrées ainsi que l'intervalle de temps de 1 jour à respecter entre les deux injections. Dans ces conditions, l'haptène

radiomarqué au lutetium-177 s'accumule dans le tissu tumoral dans l'heure qui suit son administration et les toxicités hématologiques (thrombocytopénies) de grades 3 et 4 surviennent chez moins de 10% des patients, pour des activités injectées variant entre 2,5 et 7,4 GBq (Schoffelen R. *et al.*, 2013). Dans cette étude, une étape d'imagerie quantitative était également réalisée avant la pRIT avec l'haptène ¹¹¹In-IMP-288. Il a été montré que de fortes activités de ¹⁷⁷Lu-IMP-288 pouvaient être administrées après évaluation du risque toxique individuellement pour chaque patient, en se basant sur des études de dosimétrie prédictives ciblant les reins et la moelle osseuse hématopoïétique (Schoffelen R. *et al.*, 2014). Une étude de phase I/II (RITCOLON, NCT02300922) a complété ce travail en remplaçant le ¹⁷⁷Lu- IMP-288 par du ⁹⁰Y-IMP-288 : l'objectif était de déterminer la DMT de l'haptène radiomarqué utilisé. Les résultats ne sont pas encore publiés.

Une étude clinique de phase I similaire (NCT01221675) a également été réalisée chez des patients atteints de cancers des poumons surexprimant l'ACE. Il a été montré chez ces patients que le délai optimal séparant les deux injections était de 24 h (l'autre délai évalué étant 48 h) et qu'une augmentation du ratio TF2/⁹⁰Y-IMP-288 est associée à une augmentation des doses aux tumeurs sans que les doses reçues par les organes sains ne soient modifiées. Une deuxième phase est prévue pour cette étude, avec pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée de ⁹⁰Y-IMP-288. Cela nécessite d'obtenir des valeurs d'activité spécifique élevées pour l'haptène, afin de conserver un ratio TF2/⁹⁰Y-IMP-288 optimal (Bodet-Milin C. *et al.*, 2015).

2.1.4. La RIT fractionnée

L'un des facteurs limitants de la RIT des cancers solides étant l'administration d'une activité suffisante pour garantir des doses efficaces reçues par les sites tumoraux sans effet délétère sur les organes sains, la RIT fractionnée est une alternative intéressante. Cette approche se base sur les capacités des cellules saines, notamment celles de la moelle osseuse hématopoïétique, à se régénérer plus rapidement que les cellules tumorales après une exposition à des rayonnements ionisants. Ce phénomène de cinétique de réparation différente entre les tissus sains et les tumeurs est bien connu et est pris en compte dans les protocoles de radiothérapie externe appliqués en routine clinique (DeNardo GL. *et al.*, 2002).

Un protocole de RIT fractionnée a été étudié dans une étude de phase I (NCT00538668) chez des patients atteints de cancers prostatiques non hormonaux dépendants et métastatiques. Deux injections d'un anticorps monoclonal humanisé anti-PSMA, l'anticorps J591, radiomarqué au lutetium-177 (740 MBq/m²) ont été administrées à 2 semaines d'intervalle. Les résultats révèlent que la RIT fractionnée est bien tolérée avec une myélotoxicité prévisible et réversible. Une diminution du taux de PSA et du nombre de cellules tumorales circulantes est observée. De plus, la DMT totale est 14 à 28% supérieure à celle déterminée dans un protocole d'injection unique, sans toxicité aiguë supplémentaire (Tagawa ST. *et al.*, 2016).

2.1.5. Utilisation de vecteur de plus petite taille, les peptides

L'accès des radiopharmaceutiques à leurs cibles est souvent limité dans les cas de cancers solides, du fait de la taille des tumeurs, d'un défaut de drainage lymphatique et du fait d'une vascularisation anarchique. Plus les vecteurs sont des molécules de petite taille, plus ils auront la possibilité de diffuser au sein des masses cancéreuses. Ainsi, l'utilisation de vecteurs peptidiques est une approche de la RIT des cancers solides en plein développement.

Ainsi que mentionné dans le paragraphe 1.2.3., une spécialité pharmaceutique a été autorisée pour une utilisation en routine clinique pour le traitements des tumeurs neuroendocrines (TNE). Il s'agit du LUTATHERA®, un analogue de la somatostatine, l'octréotate, couplé au DOTA et radiomarqué au lutetium-177. Les patients atteints de tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques (TNE-GEP) non résécables ou métastatiques bénéficient alors de 4 injections de 7,4 GBq de LUTATHERA® espacées de 8 semaines chacune. La délivrance de l'AMM a fait suite à la publication des résultats de l'étude clinique de phase III NETTER-1 dans laquelle 231 patients ont été randomisés en deux groupes : le premier groupe recevait 4 injections de LUTATHERA en combinaison avec de l'octréotide et le deuxième groupe ne recevait que de l'octréotide. Les études de survies ont montré que la médiane de survie n'était pas encore atteinte (24 juillet 2015) pour le groupe LUTATHERA® tandis qu'elle était de 8,5 mois pour le deuxième groupe : l'administration de LUTATHERA® réduit de 82% le risque de progression ou de décès par rapport à l'octréotide seul. Des neutropénies, thrombocytopénies et lymphopénies de grade 3 ou 4 ont été observées chez 1%, 2% et 9% respectivement des patients du groupe LUTATHERA, sans toxicité rénale rapportée (Strosberg J. *et al.*, 2017).

Une étude de phase III multicentrique est actuellement en cours pour évaluer l'efficacité de la RIT utilisant un autre analogue de la somatostatine, le ¹⁷⁷Lu-DOTA-édotréotide ou ¹⁷⁷Lu-DOTATOC. Cette étude porte le nom de COMPETE (NCT03049189) et compare deux groupes de patients atteints de TNE-GEP : les patients du premier groupe reçoivent 4 injections de ¹⁷⁷Lu-DOTATOC espacées de 4 semaines chacune tandis que les patients du deuxième groupe reçoivent 10 mg d'everolimus (AFINITOR®, inhibiteur du système mTOR) quotidiennement jusqu'à la progression. En attendant les résultats de cette étude, le ¹⁷⁷Lu-DOTATOC a reçu la qualification ODD (orphan drug designation) pour les patients atteints de TNE-GEP (Baum RP. *et al.*, 2016). Une autorisation de mise sur le marché est attendue à l'issue de cette étude. D'autres études cliniques sont en cours, comme l'étude randomisée de phase II OCCLURANDOM (NCT02230176) comparant la RIT avec un troisième analogue de la somatostatine, le ¹⁷⁷Lu-DOTA0-Tyr3-octreotate, à un inhibiteur de récepteurs tyrosine kinase le

sunitinib (SUTENT^{®)}, chez des patients atteints de TNE pancréatiques non opérables (Nicolas GP. *et al.*, 2018).

Un radiopharmaceutique « longue action » a également été évalué dans une étude de phase I chez 8 patients atteints de TNE à un stade métastatique. Le ¹⁷⁷Lu-DOTA-EB-TATE est un agoniste de la somatostatine ayant la capacité de se fixer sur l'albumine, ce qui a pour conséquence de prolonger sa rétention dans le compartiment sanguin et d'augmenter jusqu'à 7,9 fois la dose déposée à la tumeur. Toutefois, sa supériorité sur le LUTATHERA est discutable, car les doses reçues par les reins et la moelle osseuse sont également fortement augmentées (Zhang J. *et al.*, 2018).

Un intérêt grandissant est aussi porté aux antagonistes de la somatostatine qui semblent s'accumuler dans les tumeurs avec une plus grande efficacité en comparaison avec les agonistes. Cette observation peut s'expliquer par une plus forte affinité de l'antagoniste pour sa cible ou une stabilité plus grande du complexe antagoniste-récepteur, et par un temps de résidence plus long au sein de la tumeur (Wild D. *et al.*, 2014 ; Dalm SU. *et al.*, 2016 ; Nicolas GP. *et al.*, 2017). Par exemple, le ¹⁷⁷Lu-OPS201 est actuellement évalué dans une étude clinique multicentrique de phase I/II (NCT02592707) et dans une étude monocentrique à visée théranostique (NCT02609737), chez des patients atteints de TNE non opérables.

L'utilisation d'analogues radiomarqués de la gastrine est une option envisagée pour le traitement des cancers médullaires de la thyroïde (CMT) métastatiques ou en rechute. En effet, 90% des CMT expriment le récepteur-2 à la cholecystokinine dont le ligand endogène est la gastrine. Par exemple, le radiopharmaceutique ¹⁷⁷Lu-PP-F11N (LUMED, NCT02088645) est évaluée dans une étude clinique pilote en vue de déterminer sa DMT mais également sa biodistribution et les doses déposées aux organes et aux tumeurs qui en découlent. Un autre radioconjugué, le ¹⁷⁷Lu/⁹⁰Y-CP04, fait l'objet d'une étude clinique randomisée de phase I (GRAN-T-MCT, NCT03246659) intégrant une étape d'imagerie avec l'¹¹¹In-CP04 (Nicolas GP. *et al.*, 2018). Les objectifs sont similaires.

Des analogues de la substance P sont également évalués pour une utilisation thérapeutique chez les patients atteints de gliomes. Ces analogues se fixent sur le récepteur à la neurokinine-1, surexprimé dans les gliomes de grade III et IV selon la classification de la WHO (world health organization). Ces radiopharmaceutiques sont administrés par voie locorégionale, à l'aide d'un cathéter relié à une chambre implantable sous-cutanée. Dans une étude de phase I, 16 patients ont reçu des injections intratumorales répétées de ⁹⁰Y-DOTAGA-substance P avant l'exérèse chirurgicale de la tumeur. Ce traitement néoadjuvant a facilité l'intervention chirurgicale en modifiant l'aspect macroscopique des tumeurs, visuellement encapsulées. De plus, la qualité de vie de 15 de ces patients a été amélioré en diminuant les signes neurologiques (Cordier D. *et al.*, 2010).

2.1.6. La RIT alpha

L'intérêt de la RIT alpha réside dans l'énergie libérée par les particules alpha. En effet, ces dernières sont plus énergétiques que les particules bêta : même si leur parcours dans le tissu cible est très limité, les effets cytotoxiques sont supérieurs. Cette caractéristique devrait permettre d'obtenir des réponses thérapeutiques intéressantes dans la RIT des tumeurs solides.

L'efficacité de la RIT alpha a été évaluée chez des patients atteints de mélanomes métastatiques avec l'anticorps 9.2.27, ciblant un antigène de surface exprimé par les mélanocytes de l'Homme et surexprimé dans 90% des cas de mélanomes, couplé à une molécule de DTPA et radiomarqué au bismuth-213. Au total, 22 patients ont reçu une activité de 55 à 947 MBq. Les résultats sont les suivants : 50 % de maladie stable et 14 % de réponse partielle. Aucune toxicité n'a été mise en évidence (Allen BJ. *et al.*, 2011).

Les analogues de la somatostatine peuvent également être radiomarqué avec des émetteurs alpha. Le ²¹³Bi-DOTATOC a été évalué dans une étude clinique pilote chez des patients atteints de NET métastasées au foie et réfractaires au ⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu-DOTATOC : 7 patients ont été traités par injection intraartérielle hépatique, le huitième patient ayant reçu une injection intraveineuse du fait de l'existence d'un très fort envahissement médullaire. Tous les patients ont montré une bonne réponse thérapeutique dans le temps quel que soit le volume tumoral initial, avec des toxicités rénale et hématologique modérées (Kratochwil C. *et al.*, 2014). Le ²²⁵Ac-DOTATOC (DOTATOC radiomarqué à l'actinium-225) a également été évalué chez 40 patients et la DMT a été établie à 40 MBq en une seule injection ou deux fois 25 MBq espacées de 4 mois (Kratochwil C. *et al.*, 2015).

Dans les études les plus récentes portant sur les analogues de la substance P, les radioconjugués utilisés sont radiomarqués avec des émetteurs alpha, comme le ²¹³Bi-DOTA-SP. Ce composé a été administré par voie locale à 50 patients présentant un gliome de grade III ou IV. Dans un sous-groupe de 9 patients ayant développé secondairement un glioblastome multiforme (GBM) de grade IV, la médiane de survie après le premier diagnostic est de 52,3 mois et est de 16,4 mois après le second diagnostic. Dans un sous-groupe de 20 patients présentant une rechute de GBM, la médiane de survie après le premier diagnostic cest de 23,6 mois contre 14,6 mois lors de la mise en place d'une thérapie standard, et de 10,9 mois après le diagnostic de récidive (Krolicki L. *et al.*, 2018). Une étude de phase I menée chez 20 patients présentant un gliome ayant pour objectif de déterminer la DMT du radiopharmaceutique ²²⁵Ac-DOTAGA-SP est actuellement en cours (Krolicki L. *et al.*, 2017).

2.1.7. Le ciblage d'antigène intracellulaire

L'identification d'antigène de surface pour une indication de RIT semble être la règle, les antigènes intracellulaires étant considérés comme inaccessibles aux radiopharmaceutiques. Toutefois, dans des conditions de renouvellement cellulaire intense, il a été envisagé que des antigènes tumoraux présents en grande quantité au sein des cellules tumorales soient relargués dans le microenvironnement tumoral, les mettant alors à la portée d'immunoglobulines radiomarquées. L'équipe de Dadachova a mis au point un anticorps monoclonal murin appelé 6D2. Ce travail a abouti à une étude de phase I chez des patients atteints de mélanomes non résécables ou métastatiques. Une RIT alpha avec le radiopharmaceutique ¹⁸⁸Re-6D2 a été associée à une accumulation de ce dernier dans les sites tumoraux tout en préservant les tissus sains. La médiane de survie dans cette étude est de 13 mois, contre 8,5 mois avec un traitement standard (Norain A. *et al.*, 2016).

Une autre approche permettant de cibler des antigènes intracellulaires est d'utiliser comme vecteur de petits peptides lipophiles capables de traverser la membrane cellulaire. C'est le cas des dérivés du benzamide, dont l'affinité pour la mélanine est très élevée. En 2014, un essai clinique de phase I a validé l'intérêt d'une RIT avec le composé BA52, appartenant à la famille des benzamides. 26 individus présentant un mélanome métastatique ont reçu une injection unique de ¹²³I-BA52. L'étude de pharmacocinétique et de dosimétrie a permis de sélectionner 9 patients pour la phase thérapeutique avec injection de ¹³¹I-BA52. Aucune toxicité n'a été observée et des effets anti-tumoraux mesurables ont été rapportés (Mier W. *et al.*, 2014).

2.2. RIT des tumeurs hématologiques

L'intégration de la RIT pour le traitement des cancers hématologiques est une approche efficace. En effet, de nombreux types de cancers hématologiques surexpriment des antigènes tumoraux non retrouvés dans les tissus sains tandis que de nombreux anticorps ont été développés pour cibler ces antigènes. De plus, les leucémies et les lymphomes sont très sensibles aux rayonnements ionisants, les antigènes tumoraux ciblés sont facilement accessibles et la nature disséminée de ces cancers rendent les autres approches thérapeutiques comparativement moins efficaces. De plus, l'existence de techniques de transplantation de cellules souches hématopoïétiques permet d'injecter des activités de radiopharmaceutique élevées et de repeupler la moelle osseuse des patients a posteriori (Gudkov SV. *et al.*, 2015). Enfin, le faible taux d'immunisation des patients contre les anticorps utilisés autorise la mise en place de protocoles à injections multiples (Bodet-Milin C. *et al.*, 2016).

2.2.1. Myélome multiple

De nombreuses études précliniques de radioimmunothérapie sont menées sur des modèles murins de myélome multiple. En effet, le traitement standard actuellement prescrit aux patients est une chimiothérapie à haute dose (myélosuppressive) avec du melphalan combinée à une transplantation autologue de cellules souches. Un grand nombre de malades expérimente une rémission, mais les rechutes sont systématiques. Dans ce contexte de maladie disséminée, la radiothérapie externe n'est indiquée que pour le traitement des atteintes osseuses douloureuses ou lorsque des fractures sont susceptibles de survenir. La radioimmunothérapie se positionne comme une méthode de choix pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints et tendre vers un traitement curatif (Mesguich C. *et al.*, 2016).

Une étude de phase I a déterminé la DMT du ZEVALIN[®], anticorps monoclonal murin anti-CD20 radiomarqué à l'yttrium-90, combiné à une chimiothérapie myélosuppressive au melphalan et une greffe autologue de cellules souches chez 30 patients atteints de myélome multiple. La toxicité limitante est hépatique et la DMT se situe dans l'intervalle 4,6 – 6,7 GBq (médiane de 6,2 GBq) : la dose maximale reçue par le foie doit être de 18 Gy. Soixante-treize pour cent des patients ont montré une réponse avec 50% de réponses partielles et 24% de réponses complètes (Dispenzieri A. *et al.*, 2017).

Une étude pilote a également été menée chez 4 patients afin d'évaluer la faisabilité d'une RIT anti-CD138 avec un anticorps murin monoclonal radiomarqué à l'iode-131, le ¹³¹I-B-B4. Le CD138, aussi connu sous le nom de syndecan-1, est un protéoglycane membranaire surexprimé par les cellules myélomateuses et absent de la surface des cellules sains de la moelle osseuse. Il est impliqué dans l'initiation et la progression de certains cancers, comme le myélome multiple. Les patients ont reçu une première injection de ¹³¹I-B-B4 afin de réaliser une étude de dosimétrie (370 MBq, acquisitions TEMP-CT à J0, J1, J2, J3 et J7), suivie d'une seconde injection à visée thérapeutique deux semaines plus tard (étude d'escalade de dose, de 555 MBq/m² à 1,295 GBq/m²). L'étude de dosimétrie a montré qu'une RIT anti-CD138 pourrait être profitable aux patients atteints de myélomes multiples, bien qu'aucune réponse thérapeutique n'ait été mise en évidence dans cet essai. Plusieurs facteurs d'améliorations sont envisagés, notamment le recrutement de patients avec des stades de cancers moins avancés (Rousseau C. *et al.*, 2012).

Des radiopharmaceutiques dont le vecteur est un peptide sont également évalués. C'est le cas des analogues radiomarqués du ligand CXCL12 dont la cible est CXCR4, un récepteur membranaire couplé à une protéine G impliqué dans l'adhésion, la survie et la prolifération cellulaire, ainsi que dans la régulation des phénomènes de transcription. Dans les cellules cancéreuses, ce récepteur joue un rôle dans la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Une étude pilote portant sur 8 patients atteints de myélome multiples traités par radiothérapie cavitaire avec du ⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu-pentixather a montré une activité anti-tumorale très encourageante (Lapa C. *et al.*, 2017). La mise au point de pentixather radiomarqué avec des émetteurs alpha, tels le bismuth-213 ou l'actinium-225, est d'actualité. En effet, le myélome multiple étant une maladie disséminée, la RIT bêta n'est pas l'approche de choix (Nicolas GP. *et al.*, 2018).

2.2.2. Leucémies

Les leucémies sont connues pour être des cancers très radiosensibles et les techniques d'irradiation corps entier ont été utilisées comme traitement de conditionnement pré-greffe de moelle osseuse. La RIT représente une autre option thérapeutique prometteuse pour la prise en charge de ces maladies disséminées et est indiquée dans plusieurs situations : recherche d'une réponse complète chez les patients en rechute ou réfractaire au traitement standard, consolidation après l'obtention d'une rémission clinique, traitement de maintenance et conditionnement en prévision d'une greffe de moelle en diminuant la masse tumorale ou en potentialisant les effets d'une chimiothérapie myélosuppressive. Les premiers essais cliniques ont concerné les émetteurs bêta. Actuellement ce sont principalement des essais de RIT alpha qui sont menés.

Le premier essai clinique de RIT alpha a été initié en 1997 chez des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë avec un anticorps radiomarqué au bismuth-213 (²¹³Bi-lintuzumab) et ciblant le CD33, une glycoprotéine de surface surexprimée par la majorité des leucémies myéloïdes et absente des cellules souches non cancéreuses. Chez 93% des patients présentant des blastes circulant avant traitement, une réduction de la quantité de ces derniers de plus de 99% a été objectivée en l'absence de toxicité extramédullaire. 4 des 18 patients étudiés ont montré une éradication des cellules cancéreuses périphériques, associée à une diminution de la quantité de blastes tumoraux dans la moelle osseuse pour 3 d'entre eux (Jurcic JG. *et al.*, 2002). Une seconde étude a été menée afin de déterminer la DMT du ²¹³Bi-lintuzumab après cytoréduction partielle par chimiothérapie (cytarabine). 31 patients ont intégré cet essai de phase I/II et la DMT est de 37 MBq/kg. L'effet anti-tumoral s'est traduit par une diminution des blastes médullaires chez 76% des patients et par la mise en évidence de réponses cliniques chez 24% des patients ayant reçu une activité supérieure ou égale à la DMT : 4 réponses complètes dont 2 avec thrombopénie persistante et 2 réponses partielles. De plus, 5/6 de ces patients étaient naïfs de tout traitement, ce qui souligne l'importance d'intervenir précocement en RIT alpha après une diminution de la masse tumorale par la cytarabine (Rosenblat TL. *et al.*, 2010).

Toutefois, le principal écueil à l'utilisation du bismuth-213 comme émetteur de particules alpha est sa très courte demi-vie (45,6 minutes). L'utilisation d'un nano-générateur atomique *in vivo* du type ²²⁵Ac-²¹³Bi a été évaluée pour la première fois dans une étude clinique portant chez 18 patients atteints de leucémie myéloïde aiguë. L'actinium-225, dont la demi-vie est de 10 jours, libère trois particules alpha avant de donner le bismuth-213, qui lui-même émet une particule alpha. La DMT ainsi déterminée est de 110 kBq/kg. Les blastes circulants ont été éliminés chez 63% des patients traités avec une activité supérieure ou égale à 37 kBq/kg, tandis que la quantité de blastes médullaires a diminué chez 67% de ces mêmes patients (Jurcic JG. *et al.*, 2011). Une étude de phase I/II est actuellement en cours avec pour objectif de déterminer la DMT de l'administration fractionnée de

²²⁵Ac-lintuzumab en association avec de faibles doses de cytarabine chez des patients âgés atteints de leucémie myéloïde aiguë (NCT01756677).

D'autres antigènes surexprimés par les cellules leucémiques sont également ciblés et ont fait ou font l'objet d'études cliniques de RIT bêta, les développements de RIT alpha n'ayant pas encore passé le cap de la recherche préclinique.

L'ACE a été ciblé à l'aide d'un anticorps monoclonal radiomarqué à l'yttrium-90 (Schulz AS. *et al.*, 2011) et radiomarqué au rhénium-188 (Lauter A. *et al.*, 2010 ; Bunjes D. *et al.*, 2001) chez des patients atteints de leucémies et de syndromes myélodysplasiques. Si les résultats sont encourageants, il semblerait toutefois que le ciblage de l'ACE ne soit pas une technique de choix pour la RIT des leucémies : l'ACE n'est pas directement surexprimé par les cellules cancéreuses mais est exprimé par les granulocytes et les cellules épithéliales. La destruction des cellules cancéreuses repose sur l'effet de « feu croisé » associé aux émetteurs bêta (Bodet-Milin C. et al., 2016).

L'antigène CD45, marqueur pan-leucocytaire exprimé notamment par les précurseurs hématopoïétiques des lignées lymphoïde et myéloïde ainsi que par les lymphocytes matures localisés dans les nœuds lymphatiques, est surexprimé dans 85 à 95% des lymphomes et des leucémies à cellules B. Le CD45 a été ciblé à l'aide d'un anticorps monoclonal radiomarqué à l'iode-131 dans plusieurs études en association avec des protocoles de chimiothérapie en amont de greffes de moelle osseuse chez des patients atteints de leucémies myéloïdes (Pagel JM. *et al.*, 2006 ; Pagel JM. *et al.*, 2009 ; Mawad R. *et al.*, 2014). Pour des raisons de radioprotection, l'iode-131 a été abandonné au profit de l'yttrium-90, du bismuth-213 et de l'astate-211, les derniers radionucléides mentionnés étant des émetteurs alpha. Les résultats des études précliniques sont prometteurs (Bodet-Milin C. *et al.*, 2016).

Enfin, le CD22, très fortement surexprimé dans les cas de leucémies lymphoïdes aiguës à cellules B, a été ciblé avec un anticorps monoclonal radiomarqué à l'yttrium-90, le ⁹⁰Y-epratuzumab. Une étude de phase I a été menée chez 17 patients atteints d'une leucémie lymphoïde aiguë de type B et positive pour le marqueur CD22. Quatre paliers d'activité ont été explorés mais la DMT n'a pas été atteinte. Une réponse complète a été documentée chez 4 patients, avec des survies sans progression de 7 à 12 mois (Chevallier P. *et al.*, 2015). Une étude est actuellement en cours afin d'évaluer l'efficacité d'une RIT fractionnée anti-CD22 combinée à un protocole de chimiothérapie en préparation d'une greffe autologue de cellules souches (NCT02577094).

2.2.3. Lymphome non hodgkinien

2.2.3.1. RIT anti-CD20

L'ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN®, Biogen Idec) est le premier anticorps monoclonal radiomarqué a avoir été approuvé par la US-FDA (United States Federal Drug Administration) en février 2002 et par l'EMA (European Medicines Agency) en 2004. Le ZEVALIN® est une IgG1 monoclonale d'origine murine dirigée contre le CD20, appelée ibritumomab tiuxetan, et radiomarquée avec de l'yttrium-90 à l'aide d'une molécule chélatrice acyclique de DTPA. Il est indiqué pour le traitement des lymphomes non-hodgkiniens de bas grade de type folliculaire en rechute ou résistants au rituximab. Les études de phase I/II ont démontré une efficacité anti-tumorale en l'absence de toxicité majeure chez des patients atteints de lymphomes B en rechute. La toxicité dose-limitante est de nature hématologique avec des thrombopénies et des neutropénies (Witzig TE. *et al.*, 2002). Les modalités d'administration sont les suivantes : deux injections de rituximab à 250 mg/m2 à J-7 et J0 suivies d'une injection de 11 à 15 MBq/kg (selon la numération plaquettaire du patient) de ZEVALIN® à J0 dans les 4 h suivant l'administration de rituximab.

Une deuxième spécialité de radiopharmaceutique a été approuvée en 2003 par la US-FDA pour le traitement des lymphomes non-hodgkiniens. Il s'agit du BEXXAR®, une IgG2 monoclonale murine appelée tositumomab, ciblant le CD20 et radiomarquée par méthode directe avec de l'iode-131. Cette spécialité, indiquée pour le traitement des lymphomes folliculaires réfractaires au rituximab ou en rechute après une première chimiothérapie, a été retirée du marché en 2013 malgré les résultats cliniques obtenus pour des raisons économiques (Bartholoma MD, 2018). L'administration du BEXXAR® était également précédée de l'administration d'une grande quantité d'anticorps froid ciblant le CD20 (Vose JM. *et al.*, 2000).

Les études cliniques ont montré que l'administration en amont d'un anticorps monoclonal froid ciblant le même antigène ne réduisait pas l'efficacité du ZEVALIN® et qu'au contraire, la biodistribution de l'anticorps radiomarqué était améliorée : diminution de l'excrétion urinaire et de la fixation splénique (fixation non spécifique de l'anticorps par leur fragment Fc) accompagnée d'une augmentation de la fixation intratumorale (Knox SJ. *et al.*, 1996 ; Illidge TM. *et al.*, 2009). Plus récemment, une étude réalisée chez 5 patients a corrélé l'existence de lymphocytes exprimant le CD20 présents dans le sang périphérique et l'intérêt d'administrer un anticorps froid en amont de l'injection d'un radiopharmaceutique (⁸⁹Zr-rituximab) afin de limiter la fixation splénique non spécifique de ce dernier. Chez les patients déplétés en lymphocytes B circulants (ayant expérimenté deux lignes ou plus de traitement), l'administration d'une grande quantité d'anticorps froids n'influence pas la dose reçue par l'organisme. Cependant, l'administration d'un anticorps froid compétitif augmente la demi-vie du radioimmunoconjugué (Muylle K. *et al.*, 2015). Soulignons également que l'administration de rituximab préalablement à un radioimmunoconjugué ciblant le CD20 n'augmente pas la toxicité du traitement (Friedberg JW. *et al.*, 2014).

L'AMM du ZEVALIN[®] a été modifiée en 2009 pour une utilisation possible en consolidation après induction d'une rémission (réponse complète ou partielle) chez les patients atteints d'un
lymphome folliculaire non traités antérieurement. L'étude de phase III a porté sur une population recevant une consolidation avec du ZEVALIN® et une population témoin ne recevant aucun traitement après la chimiothérapie. Sur une durée médiane de suivi de 2,9 ans, la durée médiane de survie sans progression est passée de 13,5 mois (témoins) à 37 mois (ZEVALIN®) : 6,3 mois versus 29,7 mois pour les patients ayant expérimenté une réponse partielle et 29,9 mois versus 54,6 mois pour les patients ayant expérimenté une réponse complète. De plus, 77% des patients en réponse partielle après la chimiothérapie sont passés dans le groupe des réponses complètes avec la consolidation au ZEVALIN® (Morschhauser F. *et al.*, 2008).

Ainsi, le positionnement de la RIT dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de lymphome B est une question d'actualité. L'absence de connaissance des principes de la RIT et de ses conditions de mise en oeuvre semble être une barrière, de nombreux patients n'étant orientés vers cette prise en charge thérapeutique qu'en seconde (42,9%) ou troisième (35,6%) intention (Schaefer NG. *et al.*, 2011). Toutefois, de nombreuses études cliniques étudient l'avantage d'une RIT précoce dans la prise en charge des patients.

Une étude de phase II a montré que le ZEVALIN®, administré en première ligne sans chimiothérapie d'induction chez des patients atteints de lymphomes folliculaires, est associé à un taux de réponse globale de 87% et une médiane de survie sans progression de 26 mois (Scholz CW. *et al.*, 2013). Une étude de phase III a été menée chez des patients atteints de lymphomes folliculaires à un stade avancé. Elle a montré que le pourcentage de patients toujours en rémission 8 ans après l'administration de ZEVALIN® en première ligne en consolidation est de 44 % contre 22% chez les patients n'ayant pas bénéficié de consolidation. La médiane de la survie sans progression est de 4,4 ans dans le groupe ZEVALIN® contre 1,1 ans dans le groupe témoin et l'intervalle entre le traitement de première ligne et le suivant est augmenté de 5,1 ans avec la RIT (Morschhauser F. et *al.*, 2013). De plus, le pourcentage de patients expérimentant une conversion de leur réponse partielle en réponse complète grâce à un traitement de consolidation est supérieur lorsqu'il s'agit d'une consolidation par RIT, en comparaison avec les autres alternatives, y compris les transplantations de cellules souches autologues. Cette observation est indépendante du protocole de chimiothérapie d'induction (Eskian M. *et al.*, 2018).

Les patients atteints de lymphome folliculaire ne sont pas les seuls concernés. En effet, une étude rétrospective menée sur une cohorte de 215 patients atteints de lymphome non hodgkiniens agressifs a montré que le taux de réponses complètes est de 76,4% lorsque la RIT correspond à un traitement de consolidation après une chimiothérapie de première ligne, contre 44,3 % lorsque les patients expérimentent un traitement de deuxième ligne ou plus. La moyenne de la survie globale est de 32,7 mois lorsque la RIT intervient en première ligne contre 14 mois pour les autres patients (Hohloch K. *et al.*, 2014). De nombreuses études sont également menées dans des cohortes de patients atteints de lymphome B diffus à grandes cellules. Les résultats seront présentés dans la section 2.3.3.1. ci-après.

Néanmoins, l'efficacité de la RIT observée en première ligne de traitement n'est pas retrouvée lorsque qu'elle intervient en deuxième ligne ou troisième ligne : un nombre élevé de chimiothérapies antérieures à la RIT est associé à un plus faible taux de réponse et à une durée de survie sans progression plus courte. De plus, les patients ne répondant pas ou très transitoirement à la RIT ne répondent pas non plus aux autres alternatives thérapeutiques (Uike N. *et al.*, 2014 ; Eskian M. *et al.*, 2018). Cependant, cette observation n'est pas valable pour les patients non traités au préalable : les patients n'expérimentant pas de réponse (partielle ou complète) à la RIT en première ligne peuvent répondre totalement à une autre option thérapeutique.

Il a toutefois été démontré qu'une maintenance avec du rituximab après une RIT anti-CD20 de consolidation dans le contexte d'un traitement de première ligne était associée à un bénéfice clinique pour les patients. En effet, une étude menée chez des patients atteints de lymphomes folliculaires indolents de mauvais pronostic a montré que la maintenance au rituximab permettait d'atteindre un taux de réponse complète de 79% contre 38,8% sans rituximab (Karmali R. *et al.*, 2011). Dans une autre étude réalisée dans une population de patients atteints de lymphome folliculaire agressif, la maintenance au rituximab a permis de faire évoluer la totalité des individus ayant présenté une réponse partielle après la RIT vers une réponse complète (Rajguru S. *et al.*, 2014).

Malgré toutes ces études en faveur d'une RIT précoce, il n'existe pas de consensus sur le positionnement de la RIT dans la prise en charge des patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens. Il semble également difficile de prédire la réponse à la RIT, l'objectif étant de ségréger la population des patients entre ceux qui répondront de manière efficace et ceux qui pourraient tirer bénéfice d'un traitement plus agressif (par exemple : activité injectée plus élevée, renouvellement de la RIT dans un délai court). Certains paramètres cliniques ont une valeur prédictive pour la réponse à la RIT des patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens : nombre de sites extra-ganglionnaires envahis, stade de la maladie, index IPI (International Pronostic Index), masse tumorale, nombre de ganglions envahis, type histologique du lymphome, ainsi que les taux sériques de la lactate déshydrogénase (LDH) et de la $\beta 2m$ (Tableau 7). D'autres paramètres n'ont pas démontré de valeur prédictive, comme par exemple la taille de la rate ou l'administration antérieure de rituximab. Enfin, des études supplémentaires seraient nécessaires pour statuer sur l'intérêt à porter à certaines informations, comme par exemple le nombre de traitements déjà expérimentés par les patients (Eskian M. *et al.*, 2016).

En vue d'améliorer les réponses thérapeutiques des patients à la RIT, le fractionnement de l'activité totale injectée a été évalué dans une étude portant sur une population de patients atteints de lymphomes folliculaires à un stade avancé naïfs de tout traitement. Le ZEVALIN® a été administré selon les recommandations de l'AMM : deux injections préalables de rituximab à 250 mg/m² à 7 jours d'intervalle, la seconde injection étant réalisée juste avant la première administration du radiopharmaceutique. Les deux injections de ZEVALIN® ont été réalisées à 8 semaines d'intervalle (délai étendu à 12 semaines lors de toxicité hématologique) : 11,1 MBq/kg chacune. Parmi les 76

patients recrutés, 17 patients n'ont reçu qu'une seule injection de ZEVALIN® (8 d'entre-eux ont présenté une toxicité hématologique de grade 3 ou 4 et 4 patients ont développé des anticorps antisouris) et 55 patients ont reçu le protocole complet. Les résultats obtenus dans cette population à haut risque sont encourageants : la durée de survie sans progression est de 40,2 mois, le taux de réponse globale est de 94,4% avec un rapport CR/CRu de 58,3% (rapport réponse complète / réponse complète non-confirmée) et un taux de réponse partielle de 36,1%. La toxicité associée est principalement hématologique, transitoire et gérable médicalement. Pour un grand nombre de patients, il pourrait être envisagé une troisième injection de ZEVALIN® (Illidge TM. *et al.*, 2014).

Valeur prédictive démontrée	Absence de valeur prédictive	Valeur prédictive controversée, incohérente ou associée à des effectifs limités	
Stade de la maladie, nombre de ganglions atteints, nombre de sites	Biodistribution du radiopharmaceutique (TEMP à	Nombre de traitements antérieurs, radiothérapie antérieure, greffe de moelle osseuse préalable	
extra-ganglionnaires atteints, envahissement médullaire Index IPI	Réponse aux traitements antérieurs	Paramètres déterminés à la ¹⁸ F- FDG-TEP (SUV _{max} , SUV _{mean} , LVol, TGL)	
Masse tumorale	Administration antérieure de rituximab	Âge des patients, existence de comorbidités	
Taux sérique de LDH	Fixation tumorale (TEMP à	Index FLIPI, critère GELF	
Taux sérique de β2m	Splénomégalie	Taux d'hémoglobine	

<u>Tableau 7 :</u> Résumé des facteurs prédictifs de l'efficacité anti-tumorale de la RIT chez les patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens.

Abbréviations : TEMP (tomographie par émission monophotonique), 18F-FDG-TEP (tomographie par émission de positons à l'aide de fluorodéoxyglucose radiomarqué au fluor-18), SUV (standardized uptake value), LVol (lesion volume), TGL (total lesion glycolysis), IPI (international pronostic index), LDH (lactate déshydrogénase), β 2m (bêta-2 microglobuline), FLIPI (follicular lymphoma international pronostic index), GELF (groupe d'étude des lymphomes folliculaires). D'après Eskian M. *et al.*, 2016.

2.2.3.2. RIT anti-CD22

L'antigène CD22 est également une cible explorée pour la RIT des lymphomes nonhodgkiniens. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire exprimée par les cellules matures de la lignée B et, dans une moindre mesure, par les cellules de certains stades immatures. Cette protéine, lorsqu'elle est liée au BCR (B-cell antigen Receptor), régule l'activité du BCR par déphosphorylation de ce dernier et par blocage de la cascade de réactions médiée par l'activation du BCR. Il en résulte une modulation de l'activité des cellules B, avec en supplément une induction d'apoptose pour les cellules aux stades immatures (Sullivan-Chang L. *et al.*, 2013). Les premières études cliniques de RIT anti-CD22 ont débuté dans la fin des années 90, avec un anticorps monoclonal murin appelé LL2 radiomarqué avec de l'iode-131 et ont été menées par l'équipe de Goldenberg (Juweid ME. *et al.*, 1995). Les études de biodistribution, de dosimétrie et la surveillance de l'apparition d'anticorps anti-souris ont rapidement fait privilégier la version humanisée de cet anticorps, appelé hLL2 ou epratuzumab. Cet anticorps étant fortement internalisé après fixation sur sa cible, le radiomarquage avec de l'yttrium-90 a également supplanté celui à l'iode-131 : les doses délivrées aux masses tumorales sont plus importantes avec l'yttrium-90 qu'avec l'iode-131 du fait de la séquestration de l'yttrium-90 dans le cytoplasme contrairement à l'iode-131 (Juweid ME. *et al.*, 1999). Enfin, une étude de biodistribution *in vivo* dans des modèles murins xénogreffés de trois radioconjugés ne différant que par la nature de leur agent chélateur de métaux a démontré la supériorité du DOTA-epratuzumab (Griffiths GL. *et al.*, 2003).

La première étude clinique de phase I avec escalade de dose portant sur la RIT anti-CD22 chez des patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens réfractaires ou en rechute a été menée avec le radioconjugué ⁹⁰Y-DOTA-epratuzumab. Après une phase pré-thérapeutique d'imagerie quantitative avec le radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-epratuzumab (222 à 370 MBq), 23 patients ont reçu une injection unique de ⁹⁰Y-DOTA-epratuzumab : premier palier fixé à 370 MBq/m² pour les 13 patients n'ayant jamais expérimenté de greffe de cellules souches et premier palier fixé à 185 MBq/m² pour les 10 patients ayant bénéficié d'une greffe autologue de cellules souches. Chaque injection d'épratuzumab radiomarqué s'accompagne d'une co-infusion d'epratuzumab froid pour une quantité finale de 0,75 mg/kg d'anticorps. Les résultats ne mettent pas en avant de corrélation entre la réponse thérapeutique et la positivité des masses tumorales à l'agent d'imagerie ni la dose absorbée. De plus, la dose maximale tolérée n'a pas été atteinte, mais une injection de 740 MBq/m2 est bien toléré chez les patients n'ayant pas bénéficié de greffe de cellules souches (Sharkey RM. *et al.*, 2003(a)).

Dans une étude de RIT fractionnée, 16 patients ont reçu 2 à 4 injections de 185 MBq/m² de ⁹⁰Y-DOTA-epratuzumab, en co-infusion avec de l'épratuzumab non radioconjugué, pour une dose totale en anticorps de 1,5 mg.kg⁻¹. Le taux de réponse dans cet essai clinique est de 62% : 75% pour les sous-types de lymphomes indolents et 50% pour les sous-types agressifs. Les résultats ont montré que les meilleures réponses sont obtenues chez les patients dont les masses tumorales surexpriment fortement le CD22 et que trois injections hebdomadaires (activité injectée totale de 555 MBq/m²) sont associées à une toxicité minime (Lindén O. *et al.*, 2005). Dans une deuxième étude menée chez 64 patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens en rechute ou réfractaires au traitement (dont 17 ayant déjà expérimenté une greffe autologue de cellules souches et 16 ne répondant plus aux traitements comprenant un anticorps anti-CD20), une RIT fractionnée a été réalisée avec 2 ou 3 injections hebdomadaires de ⁹⁰Y-DOTA-epratuzumab. Le taux de réponse global est de 62% et la médiane de la durée de survie sans progression de 9,5 mois : 41% de réponse chez les patients ayant déjà expérimenté une greffe autologue de cellules souches et 73% chez les patients ne répondant plus aux anticorps anti-CD20. Les meilleurs résultats sont obtenus chez les patients atteints de lymphomes

folliculaires avec un taux de réponse complète de 92% et une durée de survie sans progression de 24,6 mois aux paliers d'activité injectée les plus élevés (activité totale injectée > 1.110 MBq/m2) (Morschhauser F. *et al.*, 2010).

La RIT anti-CD22 a également été évaluée en combinaison avec un anticorps monoclonal nu ciblant le CD20 et appelé veltuzumab. La première étude de phase I/II (NCT01101581) a concerné des patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens agressifs réfractaires ou en rechute et n'ayant jamais fait l'objet d'une greffe autologue de cellules souches. Ces patients ont reçu quatre injections de veltuzumab à 200 mg/m² à une semaine d'intervalle et deux injections de ⁹⁰Y-DOTA-epratuzumab, à J8 et J15 (palier de départ à 555 MBq/m²). Des toxicités hématologiques limitantes ont été observées dès le premier palier et la DMT a été établie à 222 MBq/m². Neuf des 17 patients étudiés ont montré une réponse, dont 3 une réponse complète. La médiane de survie sans progression est de 6,2 mois (Witzig TE. *et al.*, 2014). La seconde étude de phase I/II (NCT01147393) a débuté à la même période que la précédente mais a été interrompue après le recrutement du quatrième individu du fait de l'arrêt de la production de l'epratuzumab. Elle concernait des patients atteints de lymphomes folliculaires réfractaires ou en rechute. Ces derniers recevaient quatre injections de veltuzumab (200 mg/m²) puis deux injections de ⁹⁰Y-DOTA-epratuzumab (555, 740 ou 925 MBq/m²), chacune des injections étant espacée d'une semaine. Depuis, la RIT anti-CD22 n'est plus investiguée cliniquement pour les LNH B en général.

2.3. RIT du DLBCL

2.3.1. Généralités sur le DLBCL humain

Le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) est le sous-type histologique de lymphome non-hodgkinien (LNH) le plus souvent rencontré chez l'Homme : 30 à 40% des LNH sont des DLBCL (Bai M. *et al.*, 2005). Le DLBCL se reconnaît à l'envahissement diffus des organes concernés (majoritairement les organes lymphoïdes) par des cellules cancéreuses de grande taille qui sont des cellules lymphoïdes matures de phénotype B et dont le noyau est au moins deux fois plus grand que celui d'un lymphocyte normal ou plus grand que celui d'un macrophage (Caimi PF. *et al.*, 2016).

2.3.1.1. Histologie et classification des DLBCL

Quatre morphotypes majoritaires sont décrits dans le sous-type DLBCL et se distinguent les uns des autres de par la morphologie des cellules composant la population de cellules cancéreuses (Molina TJ., 2009) :

- le morphotype centroblastique : population cellulaire majoritairement composée d'éléments de taille moyenne à grande, dotés d'un noyau arrondi ou ovoïde, à chromatine claire, porteur de deux à quatre nucléoles, et dont le cytoplasme discrètement basophile est peu abondant
- le morphotype immunoblastique : population cellulaire composée à plus de 90% par des immunoblastes, qui sont des cellules de grande taille au cytoplasme abondant et basophile, et dont le noyau volumineux et clair présente un nucléole central
- le morphotype anaplasique : population cellulaire composée de cellules de grande taille parfois cohésives en amas, avec un cytoplasme abondant et faiblement basophile contenant un noyau bien nucléolé parfois polylobé
- le morphotype riche en cellules T ou histiocytes : population cellulaire composée à plus de 90% de petits lymphocytes T ou d'histiocytes, et de près de 10% de cellules B de morphologie variable.

Les patients atteints de DLBCL ont une moyenne d'âge de 64 ans (Shah HJ. *et al.*, 2017) avec plus de 60% d'entre eux se situant au-delà de 60 ans, et environ deux tiers présentent une atteinte ganglionnaire (la rate étant considérée comme un site ganglionnaire) (Castillo JJ. *et al.*, 2014). Bien qu'il puisse être parfois difficile de distinguer la forme ganglionnaire avec extension à un site extranodal de la forme non ganglionnaire avec extension nodale, la forme ganglionnaire est plus fortement associée à des masses tumorales volumineuses, un envahissement de la moelle osseuse et une activité élevée de la lactate déshydrogénase (LDH) (Lopez-Guillermo A. *et al.*, 2005).

Le sous-type DLBCL regroupe plusieurs entités dont le pronostic n'est pas corrélé aux morphotypes précédemment cités, ce qui se traduit par des taux de réponse à la chimiothérapie et des durées de survie très variables (Rosenwald A. *et al.*, 2002). Cette hétérogénéité a été mise en évidence par une étude de profils d'expression génique. Les DLBCL ont ainsi été partagés selon le degré de différenciation des cellules B en deux principaux sous-groupes de pronostic différent. Le meilleur pronostic est associé au sous-groupe dit « à cellules B de type centro-germinatif » (GC), tandis que le sous-groupe non centro-germinatif (non-GC), encore appelé DLBCL à cellules B activées (ABC pour Activated B-like Cell) est de plus mauvais pronostic (Alizadeh AA. *et al.*, 2000).

Ces résultats ont été confirmés par une étude menée sur une plus grande cohorte de patients (Rosenwald A. *et al.*, 2002). Cette étude a également montré qu'une survie plus longue est observée dans le sous-groupe GC : 60% de survie à 5 ans après une chimiothérapie à base d'antracyclines, contre 35% pour le sous-groupe à cellules B activées. Les courbes de survie sont illustrées dans la <u>Figure 11</u>.



Figure 11 : Courbe de survie (kaplan-Meier) des sous-groupes de DLBCL définis par détermination de profils d'expression génique.

a) Survie globale des patients atteints de DLBCL selon le sous-groupe ; b) Survie globale des patients atteints de DLBCL selon l'IPI ; c) Survie globale des patients atteints de DLBCL avec un IPI faible (0-2) selon le sous-groupe (Alizadeh AA. *et al.*, 2000).

Cette classification basée sur l'étude des profils d'expression génique a été transposée pour une utilisation en immunohistochimie, technique diagnostique utilisée sur des coupes de masses tumorales après inclusion en paraffine dans les laboratoires d'anatomopathologie : plusieurs algorithmes ont été décrits, dont les deux principaux sont ceux de Hans (Hans CP. *et al.*, 2004) et de Choi (Choi WWL. *et al.*, 2009). Leurs caractéristiques sont présentées dans le <u>Tableau 8</u>. D'après Hans, 45% des DLBCL de l'Homme appartiennent au sous-groupe GC et 55% au sous-groupe non-GC.

DLBCL subtypes by GEP	New algorithm $(n = 84)$		Hans' algorithm (<i>n</i> = 84)		
	GCB (<i>n</i> = 47)	ABC (<i>n</i> = 37)	GCB (<i>n</i> = 47)	ABC (n = 37)	
Sensitivity (%)	96	89	81	92	
Specificity (%)	89	96	92	81	
Positive predictive value (%)	92	94	93	79	
Negative predictive value (%)	94	92	79	93	
Concordant cases (n)	45	33	38	34	
Concordance rate (%)	93		dance rate (%) 93 86		36

Tableau 8 : Classification de 84 cas de DLBCL selon l'algorithme de Hans et l'algorithme de Choi (new algorithm) : comparaison avec la classification par analyse des profils d'expression génique. Choi WWL. *et al.*, 2009.

Ces algorithmes ne permettent de réaliser qu'une simple dichotomie entre les DLBCL GC de ceux non-GC, tandis que les profils d'expression génique permettent de déterminer avec plus de précision l'origine des cellules cancéreuses. La corrélation entre les résultats de ces algorithmes (<u>Figure 12</u>) et des études de profils d'expression génique ne sont pas toujours concordants : 86% de concordance pour l'algorithme de Hans et 87% pour l'algorithme de Choi (Meyer PN. *et al.*, 2011). Des algorithmes modifiés ont été mis au point afin de s'absoudre du marqueur BCL-6 en raison d'une reproductibilité variable d'un laboratoire à un autre, et la concordance des résultats avec les études de profils d'expression génique reste inchangée.



Figure 12 : Algorithmes immunohistochimiques : A) algorithme de Choi initial ; B) algorithme de Choi modifié ; C) algorithme de Hans ; D) algorithme de Hans modifié. Meyer PN. *et al.*, 2011.

En pratique, les prélèvements tumoraux (biopsies ou pièce d'exérèse) sont analysés en immunohistochimie pour les marqueurs suivants :

- CD10, BCL-6 et MUM1 sont utilisés pour dichotomiser les DLBCL GC des DLBCL non-GC
- GCET, FOXP1 et LMO2 sont utilisés pour déterminer l'origine des cellules selon les deux sous-types décrits ci-dessus (Caimi PF. *et al.*, 2016).

2.3.1.2. Pronostic des DLBCL

Le pronostic des patients atteints de DLBCL dépend du sous-type d'expression génique ainsi que de plusieurs facteurs. Les facteurs pronostiques cliniques comprennent l'âge du patient, son état général évalué par la mesure du « *performance status* » (<u>Tableau 9</u>) qui permet d'appréhender la tolérance du patient aux différentes modalités de traitement (Oken MM. *et al.*, 1982 ; Cuenca X ; *et al.*, 2009), ainsi que le stade de la maladie défini par la classification d'Ann Arbor modifiée, illustrée dans le <u>Tableau 10</u> (Rosenberg SA., 1977 ; Cuenca X. *et al.*, 2009).

0	Activité normale
1	Présence de symptômes mais poursuite d'une activité ambulatoire
2	Incapacité à travailler, alitement dans la journée de moins de 50% du temps
3	Alitement de plus de 50% du temps
4	Alitement permanent, nécessité d'une aide permanente

Tableau 9 : Echelle d'activité (performance status) selon l'échelle ECOG. D'après Oken MM. *et al.*, 1982 ; Cuenca X. *et al.*, 2009.

Stade I	ade I Atteinte d'une seule région ganglionnaire ou d'une seule structure lymphoïde : rat				
	thymus,				
Stade II	Atteinte de deux régions ganglionnaires ou plus avec indication du nombre atteint				
	en indice, d'un seul coté du diaphragme				
Stade III	Atteinte de deux, ou plus, régions ganglionnaires ou structures lymphoïdes de part				
	et d'autre du diaphragme				
Stade III 1	Atteinte des ganglions du hile splénique, cœliaque ou portal				
Stade III 2	Atteinte des ganglions latéro-aortiques, iliaques ou mésentériques				
Stade IV	Atteinte viscérale en dehors d'une atteinte par contiguïté				
	Eléments complémentaires de la classification				
Α	Absence de signes généraux				
	Présence d'au moins un des symptômes suivants :				
	- Perte de poids inexpliquée de plus de 10% du poids corporel au cours des 6				
P	mois précédant l'examen				
D	 Fièvre supérieure à 38°C, persistante pendant plus d'une semaine et non 				
	expliquée par une autre affection au cours du dernier mois				
	 Sueurs nocturnes profuses et récurrentes au cours du dernier mois 				
Е	Atteinte par contiguïté d'un viscère				
v	Masse ganglionnaire supérieure ou égale à 10 cm dans son diamètre maximal				
Λ	(critère de moins en moins utilisé pour les DLBCL)				

Tableau 10 : Classification de Ann Arbor modifiée.

D'après Rosenberg SA., 1977 ; Cuenca X. et al., 2009.

D'un point de vue biologique, l'activité de la LDH est corrélée au pronostic des patients. En effet, l'activité de cette enzyme est augmentée lors de prolifération tumorale et est donc reliée à la masse tumorale du patient. Une augmentation de l'activité de la LDH traduit une mortalité importante des cellules lymphomateuses (marqueur de prolifération rapide) et est associée à une moins bonne réponse aux traitements et à une survie plus courte (Tomita N. *et al.*, 2006). Il a également été démontré que le taux sérique de β 2-microglobuline (β 2m) est un facteur pronostique à prendre en compte, qu'il s'agisse d'une forme ganglionnaire ou non.

Dans le contexte d'une évaluation globale, le pronostic peut également être relié à l'index pronostique international (IPI) qui prend en compte l'âge des patients (plus ou moins de 60 ans), le stade Ann Arbor (localisé I/II *versus* disséminé III/IV), l'activité sérique des LDH (inférieure *versus* supérieure à la valeur usuelle), l'index d'activité selon l'échelle ECOG (0-1 *versus* 2-4) ainsi que le nombre de sites extra-ganglionnaires (0-1 *versus* 2 et plus). Il existe des différences significatives en terme de réponse complète au traitement, de survie globale et de survie sans récidive à cinq ans en fonction de l'IPI d'après une étude ayant portée sur 2031 patients atteints de lymphome nonhodgkinien (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993).

Un index pronostique international ajusté à l'âge (aa-IPI) a été construit car dans l'étude initiale, les patients âgés de plus et de moins de 60 ans présentaient des survies différentes. Lorsque l'analyse est restreinte aux sujets âgés de moins de 60 ans, seuls trois paramètres conservent leur valeur prédictive : le stade Ann Arbor, le *performance status* et l'activité de LDH. Quatre nouveaux groupes sont ainsi identifiés pour les malades de moins de 60 ans : risque bas, risque intermédiaire

bas, risque intermédiaire haut, risque haut (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993).

Pour les patients atteints de DLBCL, l'IPI reste pronostique mais ne permet pas de distinguer quatre groupes de risque significativement différents. Un nouvel indice a été construit : le r-IPI (revised international prognostic index). Il ségrége les patients atteints de DLBCL et traités par un protocole R-CHOP en trois groupes distincts pour lesquels la survie globale et la survie sans progression diffèrent, ainsi qu'illustré dans la <u>Figure 13</u> (Sehn LH. *et al.*, 2007).



Figure 13 : Survie selon le r-IPI chez 365 patients atteints de DLBCL et traités par R-CHOP. D'après Sehn LH. *et al.*, 2007.

Le pronostic des patients dépend également d'éventuelles translocations de gènes comme MYC (proto-oncogène impliqué notamment dans la prolifération cellulaire), BCL-2 (gène anti-apoptotique) et BCL-6 (facteur inhibiteur de transcription retardant l'activation et la différenciation des cellules B centro-germinatives et favorisant la réparation des cassures de l'ADN). Historiquement, ces réarrangements ont été décrits pour la première fois pour MYC dans le lymphome de Burkitt : MYC est transfecté sur le locus d'un gène d'immunoglobuline. Lorsque la translocation concerne MYC et BCL-2 (plus rarement BLC-6), le lymphome est qualifié de double-hit (DH), tandis que lorsque la translocation concerne les 3 gènes, il s'agit d'un lymphome triple-hit (TH). Ces translocations peuvent être mises en évidence par FISH (fluorescence in situ hybridization) sur pièce d'exérèse incluse en paraffine. Les lymphomes DH et TH représentent 5 à 10% des DLBCL, parmi lesquels 85% sont des DLBCL-DH MYC/BCL-2. Les DLBCL-DH/TH sont associés à un index de prolifération Ki67 de 80 à 90%, et appartiennent le plus souvent au sous-groupe GC (Abramson JS., 2016 ; Caimi PF. *et al.*, 2016). La double translocation de MYC et BCL-2 (ou BCL-6) est associée à des réponses thérapeutiques bien

inférieures à celles des cas non transloqués. Actuellement, il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre la translocation de BCL-6 et une altération du pronostic (Abramson JS., 2016).

A coté des DLBCL-DH/TH ; certains lymphomes sans translocation présentent, par analyse immunohistochimique, des taux d'expression de MYC et BCL-2 élevés. Dans ce cas, le terme utilisé pour les qualifier est DLBCL-DE (double-expression), et les seuils de positivité utilisés, exprimés en % de cellules tumorales, sont de 40% pour MYC et entre 50 et 70% pour BCL-2. Il est alors possible d'établir un score double-hit : 0 si MYC et BCL-2 ne sont pas surexprimés (23% des cas), 1 si MYC ou BCL-2 est surexprimé (48% des cas) et 2 si MYC et BCL-2 sont surexprimés (29% des cas). Dans la majorité des cas, les DLBCL-DE appartiennent au sous-groupe des DLBCL non-GC (Green TM. *et al.*, 2012). Un pronostic plus sombre est associé aux DLBCL-DE ayant un score double-hit égal à 2, indépendamment du sous-groupe et de l'IPI : la survie globale à 5 ans est de 33,3% contre 67,7% chez les patients ayant un score double-hit de 0 ou 1 (Clark Schneider KM. *et al.*, 2016). Une expression élevée de MYC ou de BCL-2 seule n'a pas été corrélée à une altération du pronostic (Green TM. *et al.*, 2012).

La recherche de translocation par FISH n'est conseillée que pour les cas de DLBCL-DE appartenant au sous-groupe GC et présentant un Ki67 élevé (Abramson JS., 2016).

2.3.2. Prise en charge thérapeutique du DLBCL

Les DLBCL étant sensibles à la fois à la chimiothérapie et à la radiothérapie, les malades peuvent espérer une guérison grâce aux thérapies disponibles quelque soit leur stade clinique au diagnostic (Abramson JS., 2016). Cependant, seuls environ 50% des patients sont guéris avec les traitements actuels : les DLBCL ayant été caractérisés comme étant « à haut risque » d'après les analyses moléculaires (DLBCL non-GC, DLBCL double ou triple hit) sont plus enclins à rechuter. Les modalités thérapeutiques sélectionnées pour un patient donné dépendent aujourd'hui du stade clinique de la maladie ainsi que du sous-type moléculaire auquel est rattaché le DLBCL. L'arbre décisionnel correspondant est présenté dans la <u>Figure 14</u> (Caimi PF. *et al.*, 2016).



Figure 14 : Approche thérapeutique des DLBCL. Caimi PF. *et al.*, 2016.

Actuellement, le choix thérapeutique repose principalement sur la distinction stade précoce / stade disséminé. Le terme « stade précoce » désigne le stade I quelle que soit la taille de la masse tumorale et le stade II non volumineux (masses ganglionnaires inférieures à 10 cm de diamètre) de la classification de Ann Arbor.

Avant l'ère du rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20), Miller et al. ont montré des taux de survie sans progression et de survie globale supérieurs lorsque les patients étaient traités par 3 cycles CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisolone) associés à une radiothérapie, par rapport à 8 cycles CHOP : 77% *versus* 64% et 82% *versus* 72% respectivement (Miller TP. *et al.*, 1998). Ces résultats ont été révisés dernièrement et la supériorité de l'une de ces deux options thérapeutiques n'est pas démontrée après 10 ans de suivi (Stephens DM. *et al.*, 2016). Les patients présentant un DLBCL de stade précoce sont traités aujourd'hui par trois cycles R-CHOP (rituximab,

cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisolone) suivis d'une radiothérapie. Lorsque la radiothérapie n'est pas envisageable, trois cycles R-CHOP supplémentaires sont réalisés (Caimi PF. *et al.*, 2016).

Le terme « stade disséminé » désigne tous les autres stades de la classification de Ann Arbor, ainsi que les stades I et II pour lesquels il existe plus d'un facteur en lien avec un plus mauvais pronostic d'après l'IPI modifié pour l'âge (Stephens DM. *et al.*, 2016). Le traitement standard pour ces patients repose sur 8 cycles R-CHOP espacés de 21 jours, aussi appelé R-CHOP-21. Pour les patients âgés de plus de 60 ans, la survie globale à 5 ans est de 58%, la survie sans progression et la survie globale à 10 ans sont de 36,5% et 43,5% respectivement, avec une médiane de survie égale à 8,4 ans (Coiffier B. *et al.*, 2002). Chez les patients âgés de moins de 60 ans et ne présentant aucun ou un seul facteur de risque d'après l'aa-IPI et traités par 6 cycles R-CHOP-21, la survie sans progression à 6 ans est de 75,4% (Pfreundschuh M. *et al.*, 2011). Quel que soit l'âge, la survie globale à 10 ans est de 43,5% (Coiffier B. *et al.*, 2010). Une étude récente a étudié le devenir des patients traités par un traitement de type R-CHOP-21 n'ayant pas montré de progression deux ans après la fin de leur chimiothérapie : la survie globale de ces patients ne diffère pas de celle d'une population contrôle (Maurer MJ. *et al.*, 2016).

Pour les patients dont le DLBCL a été identifié par FISH comme étant « double ou triple hit », pour ceux à risque élevé selon l'IPI et pour ceux présentant d'emblée un envahissement de la moelle osseuse, le traitement par chimiothérapie est plus intensif et s'accompagne d'une prophylaxie au niveau du système nerveux central. Le protocole standard est le R-DA-EPOCH (R-dose adjusted-ECHOP) qui adjoint au protocole R-CHOP déjà décrit des injections intrathécales d'étoposide, afin de limiter les rechutes au niveau du système nerveux central. Dans ce protocole, les doses d'étoposide, de cyclophosphamide et de doxorubicine sont ajustées (augmentées, diminuées ou inchangées) en fonction de la numération formule sanguine au nadir (Dunleavy K. *et al.*, 2015; Abramson JS., 2016; Burotto M. *et al.*, 2016). Chez des patients à risque élevé (aa-IPI égal à 2 ou plus), la survie globale à 10 ans est estimée à 63,6%, avec une toxicité acceptable (Purroy N. *et al.*, 2015). En ce qui concerne les DLBCL-DE, le traitement de référence reste le protocole R-CHOP : la survie globale à 4 ans est de 55% (Johnson NA. *et al.*, 2009).

En cas de rechute (seuls 60% des patients sont guéris après le premier traitement) (Cheson BD et Kostakoglu L., 2017), il peut être proposé aux patients une chimiothérapie de deuxième ligne, de type R-ICE (rituximab, ifosfamide, carboplatine, etoposide) ou R-DHAP (rituximab, dexamethasone, cytarabine à dose élevée, cisplatine). Si à l'issue de trois cycles une réponse complète ou partielle est observée, une transplantation autologue de cellules souches peut être envisagée. Un essai clinique randomisé et contrôlé a été mené chez 400 patients présentant un DLBCL en rechute. Cette étude a montré que ces deux protocoles ont des effets thérapeutiques équivalents : une réponse complète a été observée dans 63,5% et 62,8% des cas respectivement, avec toutefois une plus grande toxicité du protocole R-DHAP (insuffisance rénale et thrombocytopénie) (Gisselbrecht C. *et al.*, 2010). Une deuxième étude en prolongement de la première a également montré l'absence d'intérêt de continuer l'administration de rituximab chez les patients ayant bénéficié d'une greffe autologue de cellules souches (Gisselbrecht C. *et al.*, 2012).

Il a également été démontré qu'un protocole ne nécessitant pas l'hospitalisation des patients aboutit à d'aussi bons résultats que le protocole R-DHAP. Il s'agit du protocole R-GDP (rituximab, gemcitabine, dexamethazone, cisplatine) : les taux de réponse étaient de 44% pour le bras R-DHAP et de 45% pour le bras R-GDP. De plus, les patients traités avec le protocole R-GDP ont subi moins de toxicités de grades 3 et 4. Cette dernière option thérapeutique est une alternative intéressante pour le malade qui supporte mieux son traitement tout en diminuant le coût de ce dernier (Cheung MC. *et al.*, 2015).

De nombreuses autres options thérapeutiques peuvent être proposées aux patients, en première ligne ou en cas de non-réponse ou de rechute. Le choix repose sur les antécédents du patients, ses éventuelles affections concomitantes, l'atteinte ou non du système nerveux central, la localisation du DLBCL, etc... (Caimi PF. *et al.*, 2016).

2.3.3. RIT du DLBCL

2.3.3.1. RIT anti-CD20

L'utilisation du ZEVALIN[®] a été testée chez des patients atteints de DLBCL, dans un premier temps dans des études cliniques s'intéressant aux lymphomes non-hodgkiniens agressifs puis plus spécifiquement dans des études cliniques portant sur des populations de patients atteints de DLBCL uniquement. Le <u>Tableau 11</u> recense les résultats de RIT en première ligne des études réalisées chez des patients atteints de DLBCL. Le radioimmunoconjugué le plus fréquemment utilisé est le ⁹⁰Yibritumomab tiuxetan : les traitements de consolidation sont les plus évalués après un protocole de polychimiothérapie de type CHOP ou R-CHOP (Beygi S. *et al.*, 2018).

Ref.	Nb patients	Âge moyen	Contexte thérapeutique	Médiane de suivi	Résultats	
1	79	65 ans	ZEVALIN®	1 an	Probabilité d'absence de progression après 2 ans : 71%	
2	55	≥ 60 ans	ZEVALIN [®] en consolidation après RCHOP	7 ans	Survie sans progression : 36,1%	
3	20	68 ans	ZEVALIN [®] en consolidation après CHOP	1,25 ans	Survie sans progression à 2 ans:75%	
4	12	61 ans	ZEVALIN [®] en consolidation après chimiothérapie	5 ans	Survie sans progression à 5 ans:62%	
5	19	≥ 65 ans	ZEVALIN®	3,8 ans	Survie sans progression : 5,4 ans	
6	53	62 ans	ZEVALIN [®] en consolidation après RCHOP	5,9 ans	Survie sans progression à 5 ans:78%	
7	48	70 ans	ZEVALIN [®] en consolidation après RCHOP	1,5 ans	Survie sans progression à 2 ans : 85%	
8	84	64 ans	BEXXAR [®] en consolidation après RCHOP	3,9 ans	Survie sans progression à 2 ans : 69%	
9	16	60 ans	ZEVALIN [®] en consolidation après RCHOP-14	7,5 ans	ns Survie sans progression à 7,5 ans : 75%	
10	44	75 ans	ZEVALIN [®] en consolidation après RCHOP	3,5 ans	Survie sans progression à 3,5 ans : 74,5%	
11	16	55 ans	¹³¹ I-rituximab en consolidation après RCHOP	6 ans	Survie sans progression à 2 ans : 88% Survie sans progression à 5 ans : 81%	

<u>Tableau 11 :</u> Résumé des études cliniques de RIT anti-CD20 en première ligne de traitement chez des patients atteints de DLBCL.

CHOP: cyclophosphamide, hydroxydoxorubicine, vincristine, prednisolone; RCHOP: rituximab, cyclophosphamide, hydroxydoxorubicine, vincristine, prednisolone. 1) Hohloch K. *et al.*, 2014; 2) Stefoni V. *et al.*, 2016; 3) Zinzani PL. *et al.*, 2007; 4) Jurczak W. *et al.*, 2015; 5) Andrade-Campos MM. *et al.*, 2015; 6) Witzig TE. *et al.*, 2015; 7) Zinzani PL. *et al.*, 2010; 8) Friedberg JW. *et al.*, 2014; 9) Karmali R. *et al.*, 2017; 10) Hamlin PA. *et al.*, 2010; 11) Shin DY. *et al.*, 2016.

Les meilleurs résultats ont été obtenus par l'équipe de Lim en 2016. 16 patients atteints de DLBCL ont bénéficié, après 6 ou 8 cycles R-CHOP, d'un traitement de consolidation par injection de 7,4 GBq de ¹³¹I-rituximab (30 mg de radioimmunoconjugué précédés de 70 mg de rituximab froid). La médiane de la durée de suivi est de 73 mois. Seulement 4 patients ont rechuté. Le taux de survie sans progression à 5 ans est estimé à 81% (Shin DY. *et al.*, 2016).

2.3.3.2. RIT anti-CD22

L'efficacité de la RIT anti-CD22 avec le radiopharmaceutique ⁹⁰Y-epratuzumab a également été évaluée chez des patients atteints de DLBCL. Une seule étude de phase II a été menée chez des patients âgés naïfs de tout traitement afin d'évaluer l'intérêt d'une RIT fractionnée. Les individus inclus ont bénéficié de 6 cycles R-CHOP espacés de deux semaines et suivis deux mois plus tard d'un traitement de consolidation par deux injections de 555 MBq.m⁻² de ⁹⁰Y-epratuzumab (ajout d'anticorps nu pour une dose totale en anticorps de 1,5 mg.kg⁻¹) à sept jours d'intervalle. Seuls les patients ayant démontré une réponse partielle ou complète à la polychimiothérapie étaient éligibles à la RIT. 56 des 71 patients recrutés ont bénéficié du protocole complet de RIT anti-CD22. A l'issue de la polychimiothérapie, 40 patients étaient en réponse complète et 16 en réponse partielle. Parmi les 16 patients en réponse partielle, 8 ont évolué en réponse complète. Au global, 48 patients ont expérimenté une réponse complète et le taux de survie globale à 2 ans est de 89% (Kraeber-Bodéré F. *et al.*, 2017).

3. INTERET DU MODELE SPONTANE CANIN DE DLBCL

3.1. Modèles animaux expérimentaux de DLBCL

La majorité des études précliniques sont actuellement réalisées dans des modèles murins xénogreffés avec des lignées cellulaires établies et commercialisées. Les souris utilisées sont de type BALB/C nude ou NMRI nude : mutation autosomale récessive du gène FoxN1 (Forkhead box N1), situé sur le chromosome 11, provoquant une aplasie du thymus (totale ou partielle) responsable d'un déficit du système immunitaire se traduisant par une absence de lymphocytes T (la mutation est également responsable d'un défaut de kératinisation du follicule pileux et de l'épiderme se traduisant par une absence presque totale de pelage). Certains modèles murins reposent sur des souris déficitaires en lymphocytes B et T ainsi qu'une diminution de l'activité des cellules présentatrices d'antigènes, des cellules natural killer et des cellules myéloïdes : ce sont les souris NOD-SCID notamment. La croissance d'une masse tumorale de DLBCL humain à partir des cellules injectées est ainsi permise par le caractère immunodéficient des souris hôtes (Wang Y. *et al.*, 2016). Les caractéristiques des différents modèles murins figurent dans le <u>Tableau 12</u>.

Souche	Déficience	Durée de vie en semaines (médiane)	Avantages	Inconvénients
Nude	Lymphocytes T	ND	Très bien caractérisée	Lymphocytes B et cellules NK fonctionnels
SCID	Lymphocytes B et T	ND	Meilleure prise de greffe que pour la souche Nude	Cellules NK fonctionnelles Développement de lymphomes spontanés
NOD-SCID	Lymphocytes B et T non fonctionnels, cellules NK affaiblies	36	Activité NK réduite, possibilité de greffer des lignées de cancers hématopoïétiques	Forte incidence de lymphomes spontanés, Radiosensibilité
NSG	Lymphocytes B et T, cellules NK	> 89	Très bonne prise de greffe, étude possible des cellules souches cancéreuses et des processus métastatiques	Peu caractérisée

<u>Tableau 12 :</u> Résumé des avantages et inconvénients des différentes souches de souris disponibles pour réaliser des xénogreffes de lignées cellulaires cancéreuses.

SCID : severely compromised immune deficient ; NOD : nonobese diabetic ; NSG : NOD-SCID avec IL- $2R\gamma^{null}$; ND : non-déterminé ; NK : natural killer. D'après Jung J. *et al.*, 2018.

Depuis quelques années, afin de pallier l'absence d'hétérogénéité des modèles xénogéniques établis à partir d'un nombre limité de lignées de DLBCL humain, des modèles xénogéniques sont mis au point par greffe sous cutanée de fragments de tumeurs provenant de patients chez des souris immunodéficientes. Il s'agit des modèles murins de PDX pour Patient-Derived Xenograft. A la différence des lignées cellulaires obtenues par culture de fragments de masse tumorales *in vitro* jusqu'à obtention d'un clone immortel, ces modèles permettent d'assurer la survie et le développement, *in vivo*, de cellules cancéreuses en conservant la morphologie et l'hétérogénéité cellulaire de la masse tumorale dont elles sont issues. Des fragments de tumeur de 1 à 3 mm de côté sont ainsi greffés dans une localisation hétérotopique (le plus souvent en région sous-cutanée) ou dans l'organe orthotopique. La greffe prend en 2 à 4 mois selon le type tumoral, la localisation d'implantation et la souche de souris utilisée. Lorsque la xénogreffe atteint une taille suffisante (1-2 cm), elle est recoupée en plusieurs fragments dont une partie peut être congelée et l'autre partie greffée dans une nouvelle génération d'hôtes. La conservation des caractéristiques génétiques et histologiques de la PDX est vérifiée à chaque étape (Jung J. *et al.*, 2018).

L'équipe de Shipp a ainsi établi un modèle de PDX à partir de patients atteints de lymphomes B diffus à grandes cellules, dont l'objectif est de refléter l'hétérogénéité génétique (diversité des mutations identifiées) et fonctionnelle (diversité des voies de signalisation activées) rencontrée dans les DLBCL de l'Homme. A partir des tumeurs prélevées chez 28 patients, 9 modèles ont ainsi pu être perpétrés sur au moins 5 générations de souris (greffes hétérotopiques sous la capsule rénale). Après analyses immunohistochimique, transcriptomique, génétique et fonctionnelle, 8 de ces modèles reflètent les caractéristiques de la tumeur primitive (Chapuy B. *et al.*, 2016).

De tels modèles devraient permettre un meilleur screening des drogues anticancéreuses au stade préclinique du fait de leur meilleure prédiction de la réponse thérapeutique par rapport aux modèles murins développés à partir de lignées cellulaires. Ils devraient également permettre d'identifier des biomarqueurs afin de pouvoir sélectionner les patients sensibles à la thérapie mise en œuvre (Jung J. *et al.*, 2018). Toutefois, ces modèles élaborés dans des organismes immunodéficients et génétiquement identiques, ne reflètent pas la réalité de la diversité rencontrée chez les patients ni les interactions pouvant intervenir entre le médicament utilisé et le système immunitaire de ces derniers. Le micro-environnement tumoral vasculaire est en outre chimérique (Homme/souris) et à terme, devient entièrement murin.

3.2. Modèles spontanés canins en oncologie

Les approches d'oncologie comparée entre l'Homme et le chien se développent depuis quelques années. En effet, il a été établi qu'un certain nombre d'anomalies génétiques liées à l'évolution de maladies se retrouvaient chez le chien comme chez l'Homme (Ostrander EA., 2012), plus particulièrement en ce qui concerne les cancers (Paoloni M. et Khanna C., 2008 ; Ranieri G. *et al.*, 2013 ; Paoloni M. *et al.*, 2014). A la différence des modèles murins (tumeurs induites ou greffes), les chiens de compagnie développent des tumeurs spontanées dont la diversité et les caractéristiques histopathologiques sont comparables à celles des cancers de l'Homme. De plus, il est possible de suivre, chez le chien, toutes les étapes de la cancérogénèse, des lésions pré-tumorales aux tumeurs primitives et à l'apparition de métastases.

3.2.1. Proximité phylogénétique et environnementale

La domestication du chien (*Canis lupus familiaris*) a eu lieu avant le développement de l'agriculture dans l'histoire de l'Homme (aux environs de 15.000 à 12.000 ans avant J-C) et tous les chiens actuels descendent d'un canidé ancestral qu'ils ont en commun avec le loup actuel, ancêtre aujourd'hui disparu. Ainsi les chiens tels que nous les connaissons aujourd'hui sont le résultat de milliers d'années d'élevage et de sélection : il existe environ 500 races canines, dont la plupart ont moins de 200 ans (Ostrander EA. *et al.*, 2018). Ces croisements dirigés ont produit, sur le plan anatomique, une variété que n'offre aucune autre espèce mammifère, sans oublier les diversités comportementales. Malheureusement, cette sélection fondée sur des caractères phénotypiques ou comportementaux s'est accompagnée d'une co-sélection d'allèles morbides responsables à l'état homozygote de nombreuses maladies génétiques. Ainsi, de nombreuses races de chien présentent une 90

susceptibilité exagérée à des maladies génétiques complexes, comme par exemples les maladies autoimmunes ou les cancers (Galibert F. et André C., 2006).

Le génome canin a été séquencé dans sa totalité pour la première fois en 2005 : il s'agit de celui d'une chienne appartenant à la race Boxer (Lindblad-Toh K. *et al.*, 2005). L'étude du polymorphisme génétique canine a montré que le déséquilibre de liaison, mesurable par l'analyse de la distribution des micro-satellites ou des SNP (single nucleotide polymorphism), peut s'étendre sur des distances beaucoup plus grandes que dans le génome humain. L'hétérogénéité génétique de l'espèce canine étant identique à celle observée chez l'Homme, la grande homogénéité intra-race rend plus abordable l'analyse des fréquences de distribution des SNP dans des cohortes de chiens choisis en fonction des problématiques soulevées, en comparaison avec ce qui pourrait être fait chez l'Homme (Dalibert F. et André C., 2006; Ostrander EA., 2012). Ainsi, les mutations génétiques responsables de cystadénocarcinomes rénaux et de la dermatofibrose nodulaire ont été identifiées dans un premier temps dans l'espèce canine (race berger-allemand) puis retrouvées chez les patients atteints de cette même maladie. C'est également le cas de la narcolepsie (doberman pinscher), de la toxicose hépatique cuprique (bedlington terrier), des céroïdes lipofuscinoses neuronales (american staffordshire terrier) et de l'ichtyose (golden retriever) (Ostrander EA., 2012).

Par ailleurs, les chiens de compagnie partagent également nos modes de vie et notre milieu de vie. Ils sont soumis aux mêmes polluants que les humains dont ils partagent le quotidien : pesticides organochlorés, dioxines issues des fumées d'incinération et des moteurs diesel, polychlorobisphényles (PCB) produits dans les trasnformateurs électriques, retardateurs de flamme bromés (RFB) et contaminants perfluorés (CPF) présents dans une large gamme de revêtements d'intérieur et de produits de consommation (mousses de garnissage, tapis, textiles, peintures, plastiques, polystyrènes, shampoings...). Tous ces polluants sont toxiques et/ou qualifiés de perturbateurs endocriniens : les hommes et les chiens sont soumis à la même contamination environnementale, qu'elle soit incriminée ou non dans le développement de certains types tumoraux (Sévère S. *et al.*, 2015).

3.2.2. Modèles de cancers spontanés canins

Les propriétaires de chiens de compagnie dépensent de plus en plus d'argent pour soigner leurs animaux, allongeant leur espérance de vie. En parallèle, les avancées réalisées dans les connaissances scientifiques vétérinaires mettent à la disposition des chercheurs une grande quantité de données épidémiologiques et histopathologiques à propos des cancers développés par nos amis canidés. Certains modèles de cancers spontanés sont aujourd'hui reconnus par la communauté scientifique. Les animaux de compagnie atteints de maladies spontanées pourraient donc être le « chaînon manquant » dans les essais cliniques entre les rongeurs et les humains pour l'évaluation de nouvelles stratégies de traitements, avec un double bénéfice pour la médecine vétérinaire et humaine. Nous allons citer, pour illustrer ce propos, quatre cancers bien étudiés chez le chien et dont la valeur préclinique pour l'Homme a été attestée par quelques études.

3.2.2.1. Cas de l'ostéosarcome canin

L'ostéosarcome est un sarcome défini par l'OMS (organisation mondiale de la santé) comme étant une tumeur primitive maligne de l'os au sein de laquelle les cellules cancéreuses produisent du tissu osseux. L'aspect macroscopique des ostéosarcomes canins et humains varie, certains étant caractérisés par des lésions lytiques, d'autres par des lésions prolifératives ou d'autre encore par un mélange des deux. L'aspect microscopique des ostéosarcomes canins et humains est similaire, les mêmes sous-types ayant été décrits (Jo VY. et Fletcher CDM., 2014 ; Al-Khan AA. *et al.*, 2017). Les diaphyses des os longs sont les sites les plus souvent atteints : les membres thoraciques (radius distal et humerus proximal) sont deux fois plus touchés que les membres pelviens (fémur proximal et tibia distal) chez le chien, tandis que 50% des cas d'ostéosarcomes chez l'Homme concernent le genoux (fémur distal > tibia proximal) et 25% des cas concernent l'humérus proximal (Morello E. *et al.*, 2011).

Bien que rare, l'ostéosarcome est le cancer des os le plus fréquent chez l'enfant et dans l'espèce canine. Le taux de mortalité lié au développement d'ostéosarcome n'a pas régressé depuis près de 20 ans. Le taux de survie à 5 ans est de 70% pour les individus sans métastase au diagnostic et chute drastiquement à 27,4% pour les individus diagnostiqués à un stade métastatique (Simpson S. *et al.*, 2017). En effet, les traitements actuellement utilisés ont fortement amélioré la survie des individus atteints, tant chez l'Homme que chez le chien, mais de nouvelles approches thérapeutiques doivent être développées afin d'obtenir de meilleurs résultats chez les malades, plus particulièrement pour ceux présentant des métastases. Ainsi, un tiers des jeunes patients initialement pris en charge pour un ostéosarcome en l'absence d'envahissement d'organes à distance développe par la suite des métastases (Khanna C. *et al.*, 2014).

Chez le chien, l'incidence des ostéosarcomes varie de 0,2 à 8,9 % selon les races, les individus de grande race étant plus souvent atteints : cette incidence est la plus forte dans les races rottweiler, greyhound, deerhound et irish wolfhound. Bien que peu élevée, cette incidence est 27 fois supérieure à celle observée dans l'espèce humaine. Le taux de survie à 1 an est de 45% pour les individus traités, avec une médiane de survie de 76 jours pour les individus présentant des métastases. Les facteurs de mauvais pronostic sont connus : poids corporel élevé, atteinte de l'humérus proximal, augmentation de l'activité des phosphatases alcalines. Des anomalies génétiques (34 loci) ont été identifiées dans l'espèce canine et associées à un risque plus élevé de développer des ostéosarcomes, mais ces observations n'ont pas été validées d'un point de vue mécanistique (Simpson S. *et al.*, 2017). Egalement, des expressions variables de gènes impliqués dans la croissance tumorale et la capacité à métastaser ont été mises en évidence en comparant des prélèvements d'ostéosarcomes avec des

92

prélèvements de tissu osseux sain : certaines de ces expressions différentielles ont des valeurs pronostiques se traduisant par des durées de survie variables (Selvarajah GT. *et al.*, 2009 ; Millanta F. *et al.*, 2012).

Par exemple, le modèle spontané canin d'ostéosarcome a aidé à lever le voile sur le rôle tenu par la protéine appelée ezrin, dans la capacité à métastaser que possèdent certaines cellules cancéreuses. Cette protéine, faisant le lien entre la membrane plasmique et le cytosquelette et intervenant dans la fixation et la survie des cellules cancéreuses circulantes dans le tissu pulmonaires, est fortement exprimée dans 83% des cas d'ostéosarcomes canins (92% des cas d'ostéosarcomes chez l'enfant) et sa présence est associée à une durée de rémission diminuée (médiane de 188 jours chez le chien et 438 jours chez l'enfant) ainsi qu'à un risque de rechute de 80% dans les cas de cancers pédiatriques. Toutes ces données en font une cible thérapeutique prometteuse : l'efficacité de drogues anti-métastatiques pourra être évaluée dans le modèle spontané canin d'ostéosarcome (Khanna C. *et al.*, 2004).

3.2.2.2. Cas du carcinome mammaire triple négatif canin

Les cancers du sein Triple-Négatifs (TN) (récepteurs à la progestérone (PR) et aux oestrogènes (ER) absents, récepteur du facteur de croissance épidermique de type 2 (HER2/neu) non surexprimé) représentent 15% des cancers invasifs du sein de la femme. Au diagnostic, l'âge médian est plus jeune dans cette population et la proportion des stades avancés est plus forte que dans les autres cancers du sein non-TN. Il s'agit de cancers agressifs, de mauvais pronostic avec un risque important de rechute et de décès dans les 5 premières années après le diagnostic initial (Haffty BG. *et al.*, 2006 ; Rakha EA. *et al.*, 2007).

La chimiothérapie est le seul traitement systémique actuellement validé dans les cancers du sein TN. Etant donné leur index mitotique élevé, ces tumeurs sont plus chimiosensibles que les autres sous-groupes en particulier en situation néoadjuvante. De plus, il n'existe pas actuellement de thérapeutique ciblée disponible pour les carcinomes mammaires TN. Malgré les nouveaux schémas de chimiothérapie, le pronostic reste sombre (Reis-Filho JS. et Tutt ANJ., 2007).

Des études récentes indiquent que les carcinomes mammaires spontanées canins (CMC) ressemblent aux cancers du sein humains par leurs aspects anatomo-pathologiques, génétiques et leur physiopathologie (Kim NH. *et al.*, 2013). Les sous-groupes phénotypiques décrits dans le cancer du sein ont également été individualisés dans les carcinomes mammaires canins : ER +, HER2 + et ER-/ HER2- (Gama A. *et al.*, 2008). Des similitudes ont également été établies au niveau de l'ARN entre les carcinomes mammaires humains et canins, avec des signatures partagées entre les deux espèces (Uva P. *et al.*, 2009 ; Lee KH. *et al.* 2019). Une étude a également montré des similitudes dans l'expression génique au niveau de stroma tumoral dans les deux espèces (Ettlin J. *et al.*, 2017).

Dans une étude menées à Oniris chez 350 chiennes atteintes de carcinomes mammaires invasifs, il a été montré que 76,3 % des cas appartiennent au sous-type triple négatif, également associé à un mauvais pronostic. De plus, les facteurs pronostiques identifiés sont comparables à ceux des femmes atteintes de cancers du sein : taille de la masse tumorale primitive, statut métastatique du nœud lymphatique drainant, envahissement lymphovasculaire, grade histologique et positivité à PR (Nguyen F. *et al.*, 2018). Parmi les 267 chiennes atteintes de carcinomes mammaires TN, deux phénotypes ont été identifiés en utilisant les mêmes marqueurs immunohistochimiques que ceux utilisés en médecine humaine : le phénotype TN basal-like (76,8%) et le phénotypes n'ont pas de valeur pronostique, ce point étant actuellement sujet à controverse en médecine humaine. Chez le chien, seuls le stade, la valeur de l'index Ki-67 et la présence d'inflammation péri-tumorale sont des paramètres pronostiques indépendants (Abadie J. *et al.*, 2018).

3.2.2.3. Cas du mélanome malin canin

Chez l'Homme, les mélanomes malins, majoritairement retrouvés au niveau de l'épiderme, sont des cancers agressifs de mauvais pronostic, notamment lorsqu'ils évoluent vers le stade métastatique. De nombreux sous-types de mélanomes existent et diffèrent par leur localisation, leur aspect histologique et les facteurs favorisant, qu'ils soient génétiques et/ou environnementaux (Whiteman DC. *et al.*, 2011).

Chez le chien, les mélanomes sont le plus souvent diagnostiqués dans les races suivantes : scottish terrier, caniche, golden retriever, cocker spaniel, chow-chow, setter gordon, teckel et berger d'Anatolie. Dans la majorité des cas, il s'agit de mélanomes muqueux localisés dans la cavité buccale ou en région acrale (coussinets et doigts) (Goldschmidt MH. et Hendrick MJ., 2002). Comme chez l'Homme, les métastases loco-régionales se situent au niveau des nœuds-lymphatiques drainants et les métastases à distance intéressent préférentiellement les viscères (poumons). Comme chez l'Homme, le pronostic est également très sombre, les mélanomes muqueux étant résistants à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Bergman PJ. et Wolchok JD, 2008). Une étude portant sur 1652 cas de mélanomes canins a révélé que 62% des mélanomes malins canins étaient localisés dans la cavité buccale. La médiane de survie des animaux présentant un mélanome muqueux est de 200 jours, la médiane de survie sans progression étant de 104 jours (données obtenues à partir de 153 cas disposant d'un suivi de 4 ans). Chez les caniches, 98% des mélanomes appartiennent au sous-groupe des mélanomes muqueux et ont une localisation intra-orale. De plus, ce sont principalement des chiens avec des pelages foncés qui développent des mélanomes, en comparaison avec les animaux à pelage clair ou absent : ces observations permettent de dire que les rayons ultraviolets (UV) ne jouent pas de rôle prépondérant dans le développement de mélanomes dans l'espèce canine (Gillard M. et al., 2014).

En plus des caractères épidémiologiques et cliniques partagés par les mélanomes muqueux de l'Homme et du chien, il a été montré que ces derniers partageaient également des caractéristiques histopathologiques ainsi que certaines mutations génétiques incriminées dans leur pathogénie (Simpson RM. et al., 2014). En effet, malgré leur localisation préférentiellement dermique, les mélanomes canins ont pu être classifiés selon les 4 sous-types décrits chez l'Homme : sous-type congénital (72%), sous-type animal (16,5%), sous-type composé (4,5%) et sous-type superficiel (1/153). Chez 4 animaux, des mutations ont été identifiées dans le gène NRAS (Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene Homolog) associées à une activation constitutive de la protéine correspondante, ainsi que sur le gène PTEN (phosphatase and tensin homolog mutated in multiple advanced cancers 1) corrélées à une absence d'expression de la protéine correspondante et localisées sur les mêmes hotspots que ceux identifiés dans les mélanomes de l'Homme. Aucune mutation n'a été mise en évidence dans le gène BRAF (murine sarcoma viral oncogene homolog B) (Gillard M. et al., 2014). Une analyse génomique a été menée en parallèle sur des mélanomes muqueux provenant de patients (46), de chiens (65) et de chevaux (28). Les résultats montrent qu'il existe bien des similitudes avec des mutations retrouvées dans les trois espèces pour les gènes NRAS, PTEN et TP53 (tumor protein 53, facteur de transcription) entre autres, avec toutefois des différences d'une espèce à l'autre (Wong K. et al., 2019).

L'ensemble de ces données permet de conclure que les mélanomes canins sont des « mélanomes dermiques non-UV dépendants ». Ce modèle spontané animal devrait permettre d'identifier de nouveaux facteurs intervenant dans le développement des mélanomes de l'Homme, afin d'améliorer la prise en charge des sous-types les plus agressifs (absence de mutations *BRAF*, *N/H/K-RAS* et neurofibromin 1 tumor suppressor *NF1*), sur-représentés chez le chien (Hernandez B. *et al.*, 2018) : une étude clinique pilote a été menée récemment chez des chiens atteints de mélanomes buccaux afin d'évaluer l'efficacité d'une anticorps monoclonal chimérique anti-PD-L1 : une réponse thérapeutique a été objectivée chez 1/7 chiens (Maekawa N. *et al.*, 2017). Des essais cliniques vétérinaires à visée préclinique ont également été menés pour évaluer l'efficacité de vaccins d'ADN xénogéniques (Grosenbaugh DA. *et al.*, 2011 ; Yuan J. *et al.*, 2013).

3.2.2.4. Cas du sarcome histiocytaire disséminé canin

Le sarcome histiocytaire (SH) chez l'Homme est un cancer hématopoïétique rare représentant moins de 1% des hémopathies malignes mais extrêmement agressif avec une forte mortalité (Takahashi E. *et al.*, 2013). Ce cancer est une prolifération maligne d'histiocytes, terme désignant les cellules des lignées monocytaires-macrophagiques et les cellules dendritiques. Ce cancer se localise le plus souvent aux nœuds lymphatiques mais de nombreux autres sites extra-ganglionnaires sont rencontrés (intestins, poumon, foie, rate, peau, moelle osseuse...) (Pileri SA. *et al.*, 2002 ; Takahashi E. *et al.*, 2013). La majorité des patients sont malheureusement diagnostiqués à un stade avancé avec une

espérance de vie inférieure à 2 ans (Liu Q. *et al*, 2016). Aujourd'hui, il n'y a pas de consensus sur les facteurs pronostiques ni de traitement standard (Takahashi E. *et al.*, 2013). Du fait de la rareté des sarcomes histiocytaires humains, il est également difficile d'identifier les altérations génétiques associées au développement de ce cancer. Or cette étape est nécessaire pour développer des thérapies ciblées. Des publications récentes ont mis en évidence le rôle crucial de la voie MAPK avec des mutations de *BRAF*, rendant ces cancers éligibles à un traitement par des inhibiteurs de BRAF (Liu Q. *et al*, 2013 ; Go H. *et al*, 2014 ; Kordes M. *et al*, 2016). Les options thérapeutiques restent toutefois très limitées pour les sarcomes histiocytaires non mutés pour *BRAF*.

Le chien développe spontanément lui aussi des sarcomes histiocytaires (SH), cancers très rares dans la population canine mais fréquents dans quelques races prédisposées (~ 15 à 25% chez le Bouvier Bernois, ~ 20% chez le flat coat retriever) (Abadie J. *et al*, 2009 ; Kennedy K. *et al*, 2016). Du fait de leur similitude avec les SHs humains à la fois sur leur présentation clinique et histologique (Abadie J. *et al*, 2009 ; Shearin AL. *et al*, 2012 ; Hédan B. *et al*, 2011 ; Takahashi E. *et al.*, 2013), le SH canin est un modèle unique en oncologie comparée. Comme chez l'homme, c'est une tumeur impliquant des histiocytes, extrêmement agressive et sans traitement efficace disponible à ce jour. La médiane de survie chez le Bouvier Bernois après le diagnostic est de 49 jours (Abadie J. *et al*, 2009). La forte prévalence de ce cancer dans certaines races souligne l'implication de facteurs génétiques dont certains ont été identifiés (Shearin AL. *et al*, 2009). Récemment, il a été montré que la voie de signalisation MAPK est activée, avec identification de deux mutations également retrouvées chez l'homme : mutation des gènes PTPN11 et KRAS. De plus, les données précliniques associées sont en faveur d'une réponse thérapeutique aux inhibiteurs de MEK (Takada M. *et al.*, 2018).

En conclusion, il semblerait que la majorité (> 60%) des SH canins présentent des altérations dans la voie MAPK tout en étant *BRAF* non muté et constituent un modèle préclinique pertinent pour les SHs de l'Homme *BRAF* non muté.

3.3. DLBCL canin

3.3.1. Classification des DLBCL canins et score de hit

Comme chez l'Homme, les lymphomes canins sont classés selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé, validée par plusieurs études et plus particulièrement par celle de Valli, 2011. Presque tous les lymphomes canins sont des lymphomes non-hodgkiniens, avec 72,7% à 80% de lymphomes d'immunophénotype B (Vezzali E. *et al.*, 2010, Sueiro FA. *et al.*, 2004 ; Ponce F. *et al.*, 2010). De plus, le DLBCL est le lymphome le plus fréquemment rencontré chez le chien, avec une 96

proportion variant de 33% à 56,3% des lymphomes (Sueiro FA. *et al.*, 2004 ; Vezzali E. *et al.*, 2010). Dans une étude rétrospective effectuée à Oniris et portant sur 105 cas de LNH de type B, 51 % étaient des DLBCL (Fourel J., 2013).

La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé permet également de distinguer les différents morphotypes des DLBCL canins en prenant en compte des critères anatomiques, histologiques et phénotypiques. Les morphotypes de DLBCL canin majoritairement rencontrés sont le centroblastique (76,5% à 85,2%) et l'immunoblastique (11,1% à 23,5%) (Valli VE. *et al.*, 2011 ; Fourel J., 2013). Les autres morphotypes sont rares chez le chien (Ponce F. *et al.*, 2010 ; Valli VE. *et al.*, 2011).

En se basant sur le travail réalisé chez l'Homme de distinction des DLBCL GC et non-GC, de pronostic différent, à l'aide de l'immunohistochimie, l'équipe d'Oniris a transposé l'algorithme de Hans aux DLBCL canins (Fourel J., 2013 ; Nguyen F. *et al.*, 2013). Sur 51 chiens testés, 43 appartiennent au sous-groupe non-GC (84%) et 8 appartiennent au groupe GC (16%). Une étude sur une cohorte plus large a permis de démontrer que le DLBCL non-GC du chien est associé à un plus mauvais pronostic (Nguyen F. *et al.*, 2015).

Le score de hit réalisé en médecine humaine a été transposé aux DLBCL canins en adaptant les taux de positivité à 80% pour c-MYC et à 10% pour Bcl-2. Les DLBCL canins « double-expression» représentent 27% des cas de DLBCL et se comportent de la même manière que leur pendant humain en étant associés à un plus mauvais pronostic (Nguyen F. *et al.*, 2013). Cette corrélation entre le statut double-expression (DE) de certains DLBCL canins et le pronostic des animaux n'a pas pu être retrouvée dans une étude menée sur une plus petite cohorte de 43 chiens traités par polychimiothérapie. Dans cette étude, il a aussi été observé qu'une large proportion de DLBCL canins sont des DLBCL-DE, ce qui suggère potentiellement une plus grande homogénéité des DLBCL chez le chien en comparaison de ce qui est observé chez l'Homme (Curran KM. *et al.*, 2017).

En s'intéressant aux études portant sur la génétique des DLBCL canins, il ressort que de nombreuses anomalies génétiques somatiques décrites chez l'Homme sont également observées dans l'espèce canine. C'est notamment le cas de l'amplification du gène MYC qui est plus souvent rencontrée chez les chiens résistants à la chimiothérapie. Cependant, les recherches doivent se poursuivre en utilisant des cohortes avec de plus grands effectifs (Arico A. *et al.*, 2014).

3.3.2. Présentation clinique et stade des DLBCL canins

La moyenne d'âge des chiens atteints de DLBCL est de 8,7 ans (3 à 20,75 ans). Aucune prédisposition sexuelle n'est observée. En revanche, certaines races semblent prédisposées : le Berger

Allemand (73% de leurs lymphomes sont de type B), le Golden Retriever (80% de leurs lymphomes sont de type B) et le Labrador Retriever (67% de leurs lymphomes sont de type B) (Fourel J., 2013).

La forme clinique multicentrique représente 73,2% à 84% de tous les lymphomes canins et est caractérisée par une adénomégalie superficielle (Sueiro FA. *et al.*, 2004 ; Vezzali E. *et al.*, 2010). Concernant les DLBCL, la majorité des chiens sont présentés en consultation avec un ou plusieurs nœuds lymphatiques atteints. Les nœuds lymphatiques intra-abdominaux sont envahis dans 15 à 20% des cas et la peau dans 10% des cas (Valli VE. *et al.*, 2011).

Le stade et le sous-stade cliniques sont déterminés selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé établie en 1980 et transcrite dans le <u>Tableau 13</u> (Withrow SJ. *et al.*, 2012). Au diagnostic, plus de 80% des cas de DLBCL appartiennent à un stade disséminé (III et plus). De plus, 65% des animaux présentent des signes systémiques, ceux les plus fréquemment rencontrés étant une apathie et un amaigrissement (Fourel J., 2013).

Site anatomique				
А	Généralisé			
В	Tube digestif			
С	Thymus			
D	Peau			
E	Leucémie			
F	Autre (y compris atteinte rénale unique)			
	Stade clinique			
I	Atteinte limitée à un seul nœud lymphatique ou à du tissu lymphoïde situé dans un seul organe			
	(à l'exception de la moelle osseuse)			
=	Atteinte régionale de plusieurs nœuds lymphatiques d'un même coté du diaphragme			
111	Atteinte généralisée des nœuds lymphatiques			
IV	Atteinte du foie et/ou de la rate, avec ou sans les stades I à III			
V	Atteinte du sang, de la moelle osseuse et/ou d'autres organes (avec ou sans les signes des stades			
	I à IV)			
Sous stade (existence de signes généraux)				
а	Absence de signe clinique			
b	Présence de signes cliniques			

<u>Tableau 13</u>: Classification des lymphomes canins en stades et sous-stades cliniques d'après la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé.

D'après Withrow SJ. et al., 2012.

La fréquence élevée des lymphomes B diffus à grandes cellules dans l'espèce canine, la possibilité de les classer selon la classification utilisée en médecine humaine en se basant sur l'expression de CD10, Bcl-6, MUM-1, Bcl-2 et c-MYC en immunohistochimie, positionne le DLBCL canin comme étant un très bon modèle du DLBCL de l'Homme, plus particulièrement pour le sous-groupe non-GC (Aresu L., 2016).

3.3.3. Thérapie

En France, le traitement des patients canins atteints de DLBCL repose sur une polychimiothérapie inspirée du protocole CHOP utilisée en médecine humaine. Il s'agit du protocole COPLA (L-asparaginase, cyclophosphamide, vincristine, prednisone, doxorubicine), pour lequel il existe plusieurs variantes et dont la principale est présentée dans le <u>Tableau 14</u>. Dans le cas des LNH du chien dans leur ensemble, les protocoles de types COPLA permettent en moyenne une rémission complète dans 60 à 90% des cas (Withrow SJ. *et al.*, 2012) avec des médianes de survie globale de 389 jours pour les LNH d'immunophénotype B (Vail DM. et Thamm DH., 2005). Il existe peu de données dans la littérature pour le DLBCL canin. Toutefois, le DLBCL canin est chimiosensible avec 91,6% de réponse (complète ou partielle) pour les 12 chiens traités dans l'étude de Fourel, 2013, avec une médiane de rémission de 197 jours (Fourel J., 2013).

Semaine	L-asparaginase 10 000 UI/m2 IM	Vincristine 0,75mg/m2 IV	Cyclophosphamide 250 mg/m2 PO	Doxorubicine 30 mg/m2 IV lente	Prednisone PO		
	INDUCTION						
S1	•						
S2		•	•		0,5 à 1		
S 3		•			mg/kg/j PO		
S4		•					
MAINTENANCE (maximum 6 cycles)							
S1 (=S10)				•	Dose		
S4		•	•		minimale		
S 7		•	•		efficace		

Tableau 14 : Protocole COPLA majoritairement utilisé en médecine vétérinaire en France. D'après Lanore D. et Delprat C., 2002.

En cas de rechute, il est possible de prescrire le même protocole de chimiothérapie et en cas d'échappement, les protocoles proposés incluent le plus souvent de la lomustine (Withrow SJ. *et al.*, 2012).

3.4. Oncologie et médecine nucléaire chez l'animal de compagnie

En médecine vétérinaire, les méthodes d'imagerie à disposition des cliniciens sont moins nombreuses et le bilan d'extension des lymphomes canins repose principalement sur la radiographie thoracique, l'échographie abdominale et plus rarement la tomodensitométrie ou l'imagerie par résonnance magnétique. Les autres techniques d'imagerie utilisées en médecine humaine, telle la tomographie par émission de positon couplée à la tomodensitométrie, commencent à être utilisées chez l'animal : leur place dans la prise en charge thérapeutique des animaux est actuellement en cours d'investigation.

3.4.1. La TEMP au gallium-67

Le gallium-67 est un émetteur gamma et sa demi-vie est de 78 h (3,25 jours) : il se désintègre en zinc-67 par capture électronique. Ce radiopharmaceutique se présente sous forme d'une solution injectable de citrate de gallium. Après injection, le gallium-67 se concentre dans les tissus tumoraux et inflammatoires, du fait de son comportement similaire à celui du fer. Une faible portion est éliminée par voie rénale dans les 24 h qui suivent l'administration, le reste étant éliminé par voie digestive plus lentement. A 48 h post-injection, la rétention corporelle est de 75%. L'acquisition des images se fait 6 à 72 h après l'injection en utilisant une gamma-caméra équipée d'un collimateur moyenne ou haute énergie.

En médecine vétérinaire, la TEMP au gallium-67 n'est pas une technique d'imagerie utilisée en routine. Une étude réalisée en 1980 a permis d'expliciter le devenir du gallium-67 après son injection par voie intraveineuse chez un chien atteint d'une tumeur et le rôle joué par la transferrine dans la captation du radioisotope par les cellules tumorales (Wong H. *et al.*, 1980). Toutefois, dans une étude parue précédemment, il avait été décrit que le gallium-67 ne se concentrait pas dans les foyers tumoraux de chiens atteints de lymphome (Straw JA. *et al.*, 1975).

3.4.2. La TEP/TDM au fluorodésoxyglucose radiomarqué au fluor-18 (¹⁸F-FDG)

En médecine vétérinaire, peu de données sont disponibles concernant cette technique d'imagerie chez le chien. Il a été montré que la TEP/TDM au ¹⁸F-FDG était réalisable chez l'animal et que les lymphomes canins non-hodgkiniens fixent intensément ce radiopharmaceutique. Si la TEP/TDM au ¹⁸F-FDG permet de mettre en évidence l'ensemble des nœuds lymphatiques envahis, elle ne permet pas toujours de déterminer avec précision si la rate et le foie sont infiltrés. Elle semble également être sensible pour statuer sur l'envahissement de la moelle osseuse (Randall EK., 2016). Toutefois, les séries de cas étudiées ne contiennent pas suffisamment de sujets atteints d'une même affection pour pouvoir évaluer la pertinence de cette technique dans l'évaluation du stade clinique et de la réponse au traitement, ainsi que de corréler ces résultats au pronostic des animaux malades (LeBlanc AK. *et al.*, 2009 ; Seiler SMF. *et al.*, 2015).

Une étude a été réalisée en injectant du ¹⁸F-FDG par voie intraveineuse à 7 chiens sains, afin d'en évaluer la biodistribution. Ces données ont permis d'établir des valeurs de référence pour la SUV moyenne et maximale des organes suivants : yeux, muscle, os, rate, surrénale, estomac, langue, vésicule biliaire et poumons. Ces informations pourraient permettre d'identifier des envahissements diffus en lien avec le développement d'un DLBCL, comme la rate par exemple (Lee MS. *et al.*, 2010 ; Hansen AE. *et al.*, 2011).

3.4.3. La TEP/TDM à la fluorothymidine radiomarquée au fluor-18 (¹⁸F-FLT)

La TEP/TDM au ¹⁸F-FDG est caractérisée par une très bonne valeur prédictive négative (80%) et par une valeur prédictive positive variable (25 à 70%). Afin d'améliorer ce dernier paramètre, une étude a évalué la valeur prédictive positive d'une imagerie TEP/TDM après injection de ¹⁸F-fluorothymidine. Ce radiopharmaceutique présente un intérêt pour évaluer la prolifération cellulaire des tumeurs solides, et semble être un marqueur plus spécifique des tissus tumoraux que le ¹⁸F-FDG. La valeur prédictive positive d'une telle imagerie atteint 94%, associée à une valeur prédictive au moins aussi bonne que la TEP/TDM au ¹⁸F-FDG (Shields AF. *et al.*, 1984 ; Minamimoto R. *et al.*, 2016).

En médecine vétérinaire, une étude prospective menée sur 9 chiens atteints de lymphomes non-hodgkiniens et traités par un protocole de type CHOP a montré que des imageries de type TEP/TDM à la ¹⁸F-FLT à différents temps (diagnostic initial, 5 jours après l'initiation du traitement, après le troisième cycle de traitement et 3 semaines après la fin du traitement) présentent un intérêt pour évaluer le stade clinique, la réponse au traitement ainsi que pour prédire la rechute en amont de sa mise en évidence clinique (Lawrence J. *et al.*, 2009).

3.5. Positionnement du modèle spontané canin de DLBCL

L'un des avantages le plus évidents des modèles canins comparés aux modèles murins repose sur le développement spontané de tumeurs présentant les mêmes caractéristiques anatomiques et physiologiques que les néoplasmes humains. De plus, chez l'Homme comme chez le chien, les cancers se développent sur de longues périodes en présence d'un microenvironnement et notamment d'un système immunitaire intact pouvant interagir avec les cellules cancéreuses. Les cancers canins sont comparables aux néoplasmes humains en termes de taille et de développement d'apparition de récidives et de métastases aux mêmes sites que ceux observés chez l'Homme, imitant mieux que tout autre modèle préclinique la progression par étapes des tumeurs humaines. De plus, l'inclusion de patients canins de différentes races dans les essais cliniques fournit un fond de diversité génétique 101 similaire à celui observé chez les populations humaines, tout en permettant, grâce aux isolats génétiques que constituent les races canines, d'aborder de manière plus efficace les liens existant entre génétique et cancer.

Le modèle canin peut permettre de cribler ou repositionner des médicaments plus rapidement que les essais cliniques de phase I/II menés directement chez l'Homme, principalement réalisés chez des patients ne répondant plus aux traitements habituels, induisant un biais en sélectionnant les formes les plus résistantes de la maladie. En clinique vétérinaire, il n'existe pas de traitement gold standard imposant une prise en charge thérapeutique bien codifiée pour une affection donnée à l'image des pratiques médicales chez l'Homme. Il est ainsi plus facile d'inclure dans des études cliniques des individus naïfs de tout traitement dans l'espèce canine et d'évaluer des traitements en première ligne chez les chiens plutôt que chez des patients en rechute après plusieurs lignes de traitement. Cela permet de tester avec plus d'objectivité l'efficacité thérapeutique d'un traitement.

L'avantage de l'espèce canine repose également sur la possibilité unique de travailler dans un contexte clinique. La taille des chiens, qui permet de travailler avec des dispositifs utilisés chez l'homme, facilite le transfert de méthodologie entre les deux espèces. Enfin, la durée de vie des chiens (plus courte que celle de l'Homme) tout comme la progression relativement rapide de la majorité des cancers, permet d'obtenir des données sur le devenir des animaux plus efficacement que dans les essais cliniques chez l'Homme.

Afin de mieux évaluer l'efficacité de la RIT et de faciliter le transfert à la clinique, il nous a semblé pertinent d'adresser certaines questions à un modèle animal intermédiaire entre la souris et l'Homme, plus représentatif des phénomènes observés en clinique humaine. **CHAPITRE 2. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE**

Dans le chapitre précédent, nous avons présentés les applications de la RIT en oncologie chez l'Homme ainsi que les différentes pistes d'optimisation de la RIT explorées en recherche. Malgré une recherche préclinique et clinique active dédiée à cette approche thérapeutique présentant des résultats prometteurs, très peu de patients bénéficient aujourd'hui d'un tel traitement. En effet, seules deux spécialités radiopharmaceutiques sont commercialisées dans le monde. Cet écart entre la réalité clinique et le nombre des travaux de recherche peut s'expliquer en partie par la difficulté rencontrée pour mener des études cliniques chez des patients alors que d'autres traitements ont déjà fait leur preuve : la grande majorité des études cliniques de phase I et de phase II concernent des patients ayant bénéficié de plusieurs lignes de traitement, chez qui la RIT pourrait être moins efficace.

Le modèle spontané canin de DLBCL offre donc l'opportunité d'explorer des questions encore sans réponse à propos de la radioimmunothérapie des DLBCLs de l'Homme, notamment concernant la RIT anti-CD22.

Ce travail de thèse a pour objectif général de fournir au modèle spontané canin de DLBCL un anticorps anti-CD22 canin ayant les mêmes propriétés que l'epratuzumab (anticorps monoclonal humanisé anti-CD22) en vue d'une utilisation en médecine nucléaire pour l'imagerie phénotypique et la radioimmunothérapie. Ce travail doit pouvoir aboutir à la mise en œuvre d'essais cliniques chez l'animal spontanément malade en vue d'optimiser la RIT anti-CD22 chez l'Homme.

L'objectif de la première partie est de sélectionner un anticorps anti-CD22 canin dont les propriétés biologiques et fonctionnelles sont à l'image de celles de l'epratuzumab. Cette sélection s'effectue parmi un panel de 7 anticorps monoclonaux produits par le laboratoire d'accueil par la technique des hybridomes. L'anticorps choisi doit pouvoir être couplé au DOTA et radiomarqué à l'indium-111 sans que ses capacités de fixation sur le CD22 canin ne soient altérées.

L'objectif de la deuxième partie est de mettre au point un protocole d'essai clinique de RIT anti-CD22 chez des chiens spontanément atteints de DLBCL en vue de déterminer la dose maximale tolérée de l'anticorps sélectionné radiomarqué à l'yttrium-90. Nous présenterons un état des lieux de la médecine nucléaire en médecine vétérinaire et nous expliquerons quelles sont les techniques (recherche d'anticorps anti-souris chez le chien, par exemple) et les méthodologies (radiomarquage automatisé de l'anticorps anti-CD22 canin, par exemple) qui ont été développées afin de s'aligner sur les pratiques de la recherche clinique chez l'Homme. Par ailleurs, cet essai clinique sera couplé à une étude de pharmacocinétique de population afin de proposer une personnalisation de la RIT chez l'Homme en fonction des résultats des études de dosimétrie réalisées chez chaque patient par imagerie quantitative.

La troisième partie de ce chapitre est consacrée à la validation des méthodologies choisies et appliquées pour l'exploitation des imageries quantitatives, tant pour l'étude de biodistribution que pour l'étude de dosimétrie. Cette section a pour objectif de légitimer les résultats qui seront présentés dans les parties suivantes.

Dans la quatrième partie de ce travail, nous étudions la biodistribution et la pharmacocinétique de l'anticorps sélectionné et radiomarqué à l'indium-111 *in vivo* chez des chiens d'expérimentation sains. Une étude de dosimétrie par imagerie quantitative a été réalisée chez ces animaux sains : la dose déposée aux organes liée à la circulation du radiopharmaceutique dans le compartiment vasculaire est distinguée de la dose liée à la présence du radioconjugué dans le parenchyme de l'organe (fixation spécifique et non spécifique).

Enfin, dans la cinquième partie de ce travail, nous utilisons le modèle spontané canin pour aborder des questions d'actualité non résolue chez l'Homme. Un article récent a, en effet, soulevé le problème de l'intérêt d'une co-injection d'anticorps froid conjointement à l'anticorps radiomarqué dans les protocoles de RIT chez les patients atteints de lymphome. Il ressort de cette étude que l'ajout d'anticorps froid peut dans certains cas limiter les doses déposées aux sites tumoraux. Les quantités d'anticorps froid co-injectées avec l'anticorps radiomarqué n'ont pas fait chez l'Homme l'objet d'études systématiques. Le modèle de tumeur spontané canin ainsi que l'accès à des chiens d'expérimentation sains permettent, avec les techniques d'imagerie phénotypique réalisées avec le même anticorps que pour la RIT, d'analyser dans le détail la pharmacocinétique et la biodistribution du radioconjugué. En se basant sur des critères objectifs, tel que le nombre de cellules circulantes exprimant l'antigène ciblé, il devrait être possible de déterminer la quantité d'anticorps froid devant être co-injectée avec l'anticorps radiomarqué

L'objectif de cette dernière partie est de varier l'activité spécifique injectée *in vivo* chez des chiens sains d'expérimentation et d'étudier l'effet de cette variation sur la biodistribution et la pharmacocinétique du radiopharmaceutique. La variation de l'activité spécifique est obtenue en coinjectant des quantités variables d'anticorps froid avec le radiopharmaceutique.

Le ciblage tumoral *in vivo* chez des chiens spontanément malades a également été validé pour chaque valeur d'activité spécifique du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6.

Il nous semble également important de rappeler au lecteur que l'activité vétérinaire de médecine nucléaire à Oniris était peu développée au début de ce travail et se limitait à la réalisation de quelques scintigraphies au technetium-99m au cours de l'année (prise en charge de chiens, chats et chevaux présentés au CHUV).

Le plateau de médecine nucléaire était équipé de deux hottes plombées, d'un activimètre, d'une scintigraphie équine, d'une TEMP/TDM, d'une µTEP/TDM, d'un compteur gamma et d'une animalerie radioprotégée (rongeurs et grands animaux). En dehors du personnel du Service Transversal d'Imagerie du CHUV d'Oniris (STIM), ce plateau était également mis à disposition d'équipes de recherche en interne ou extérieures à l'établissement, chacune se débrouillant pour satisfaire ses besoins (consommables et personnels).

Une grosse partie du travail effectué n'est pas valorisé dans le Chapitre RESULTATS mais a consisté à réunir différents acteurs autour de ce projet d'imagerie phénotypique et de radioimmunothérapie chez le chien spontanément malade, ainsi qu'à organiser et articuler leurs interventions : vétérinaires cliniciens, imageurs, anesthésistes, médecins oncologues, chirurgiens et anatomopathologistes vétérinaires, ainsi qu'un physicien médical, un médecin nucléaire, un biologiste et des radiopharmaciens.
CHAPITRE 3. MATERIELS ET METHODES

1. ANTICORPS

Avant l'initiation de ce travail, plusieurs réactifs avaient été synthétisés au laboratoire d'accueil de l'équipe 13 du CRCINA.

Sept hybridomes produisant des anticorps monoclonaux spécifiques du cCD22 avaient été isolés. Ces hybridomes ont été obtenus en immunisant une souris Balb/c à l'aide d'une protéine de fusion soluble cCD22-β2m produite au laboratoire par transfection de cellules CHO (ECACC, ref 94060607, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK). Après fusion des splénocytes de l'animal avec une lignée de myélome SP2/O-Ag14 (Sigma), les hybridomes ont été criblés en cytométrie en flux pour leur capacité à reconnaître une lignée CHO transfectée avec le CD22 canin : cette lignée a été produite au laboratoire et exprime la forme membranaire du cCD22 fusionnée à la GFP dans sa partie intra-cellulaire. Les sept hybridomes retenus ont été clonés et après une étape de purification sur protéine G, leur taux de production a été évalué. Les anticorps recueillis ont été isotypés à l'aide d'un kit commercial (Isostrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit, ROCHE) et leur affinité relative calculée par une étude de cytométrie en flux sur la lignée CLBL-1 de lymphome canin cCD22 positive. Ces affinités sont de l'ordre du nanomolaire et sont compatibles avec une utilisation en médecine nucléaire. Une petite quantité de ces mêmes anticorps a été biotinylée (EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation Kit, Thermo Scientific). Les résultats sont présentés dans le <u>Tableau 15</u>.

ANTICORPS anti-cCD22	Production (mg/mL)	Isotype	Affinité de l'anticorps nu (cytométrie) : K _D (M)	Ecart-type du K _D (M)
2D1	25	$IgG_{2b,\kappa}$	1,05.10 ⁻⁹	7,54.10 ⁻¹¹
5A3	15	$IgG_{1,\kappa}$	2,65.10-8	1,79.10 ⁻⁹
6B7	22	IgG _{1,ĸ}	3,73.10-10	6,26.10-11
1E3	19	IgG _{1,ĸ}	1,14.10 ⁻⁹	1,04.10-10
10C6	19	IgG _{1,ĸ}	2,54.10-10	4,01.10-11
5C2	10	IgG _{1,ĸ}	6,4.10-10	1,11.10-10
5F8	9	IgG _{1,ĸ}	5,71.10 ⁻⁹	1,87.10-10

<u>Tableau 15 :</u> Taux de production, isotypes et affinités relatives des sept anticorps anti-cCD22 nus produits dans le laboratoire d'accueil.

Tous les anticorps anti-cCD22 produits avaient également été testés (Frédérique Nguyen, unité AMaROC, Oniris) pour une application en immunohistochimie : les immunomarquages ont été réalisés

sur des coupes histologiques de nœuds lymphatiques sains de chien, ainsi que sur des biopsies de nœuds lymphatiques canins sièges de l'évolution d'un DLBCL, à l'aide d'un automate Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems). Les anticorps anti-cCD22 10C6 (15 µg.mL⁻¹), 5F8 (10 µg.mL⁻¹), 1E3 (10 µg.mL⁻¹) et 5A3 (15 µg.mL⁻¹) sont de bons candidats pour les marquages immunohistochimiques, tant sur les nœuds lymphatiques de chien sains que sur ceux atteints de DLBCL, comme l'illustre la <u>Figure 15</u>. Le signal spécifique est membranaire et concerne exclusivement les lymphocytes B.

CD22c	10C6	5F8	1E3	5A3	6B7	2D1	5C2
Nœud lymphatique normal, Chien							
DLBCL, Chien							
KD (M)	2,54.10-10	5,71.10-09	1,14.10-09	2,65.10 ⁻⁰⁸	3,73.10-10	1,05.10-09	6,40.10-10

<u>Figure 15</u>: Marquages immunohistochimiques à l'aide des anticorps anti-cCD22 sur des coupes histologiques de nœuds lymphatiques de chiens sains et lymphomateux (DLBCL).

2. LIGNEES CELLULAIRES EXPRIMANT LE CD22

2.1. Lignée cellulaire Daudi exprimant le CD22 humain (hCD22)

La lignée cellulaire Daudi est issue d'un lymphome de Burkitt positive pour le hCD22 : il s'agit d'une lignée cellulaire non adhérente. L'entretien de cette lignée est réalisé dans un incubateur (HeraCell 150) : 37°C, pCO₂ de 5%, 100% d'humidité. Les cellules sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Sigma), supplémenté de 10% de SVF (Hyclone, Thermo Scientific), de 2 mM de glutamine (Gibco), de streptomycine (1 mg.mL⁻¹, Gibco) et de pénicilline (1.000 UI.mL⁻¹, Gibco). Les cellules sont ensemencées toutes les 48 h à 200.000 cellules.mL⁻¹ (flasques Nunc). Plusieurs aliquots de ces cellules (5.10⁶ cellules) sont conservés dans des cuves d'azote liquide (-180°C) : le DMSO (diméthylsulfoxyde RPE, Carlo Erba) est utilisé comme cryoprotecteur à 10% dans du SVF.

2.2. Lignée cellulaire CLBL-1 exprimant le CD22 canin (cCD22)

La lignée cellulaire (non adhérente) de lymphome B canin CLBL-1 provient d'un don de l'université de Vienne (Rütgen B. *et al.*, 2010) : elle a été mise en place à partir d'un prélèvement tissulaire de nœud lymphatique d'un chien atteint de lymphome B diffus de stade IV. L'entretien de cette lignée est réalisé dans un incubateur (HeraCell 150) : 37°C, pCO₂ de 5%, 100% d'humidité. Les cellules sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Sigma), supplémenté de 10% de SVF (Hyclone, Thermo Scientific), de 2 mM de glutamine (Gibco), de streptomycine (1 mg.mL⁻¹, Gibco) et de pénicilline (1.000 UI.mL⁻¹, Gibco). Les cellules sont ensemencées toutes les 48 h à 200.000 cellules.mL⁻¹ (flasques Nunc).

Plusieurs aliquots de ces cellules (5.10⁶ cellules) sont conservés dans des cuves d'azote liquide : le DMSO (diméthylsulfoxyde RPE, Carlo Erba) est utilisé comme cryoprotecteur à 10%.

3. TEST DE CROSS-REACTIVITE PAR METHODE ELISA SANDWICH : CARTOGRAPHIE EPITOPIQUE

Le principe de cette technique ELISA est illustré dans la Figure 16. Une étape de coating d'une plaque 96 puits ImmunoSORP est réalisée avec 50 µL par puits (à 5 µg.mL-1) d'anticorps 6H4 anti- β 2m (Diab M. *et al.*, 2017). La plaque est incubée à 4°C sur la nuit. Le lendemain, une première étape de lavage est réalisée en PBS-BSA 0,5% (150 µL par puits ; PBS produit en interne, BSA de chez Sigma), suivie par l'étape de saturation en PBS-BSA 0,5% (150 µL par puits) : l'incubation se fait pendant 1h30 minimum à température ambiante. Toutes les incubations qui suivent sont identiques à celle-ci sauf précision. Après deux étapes de lavage en PBS-BSA 0,1% (150 µL par puits), 50 µL par puits de cCD22- β 2m (à 5 µg.mL-1) sont ajoutés. L'étape d'incubation est suivie de trois lavages en PBS-BSA 0,1% (150 µL par puits). Le mélange d'anticorps (dilution dans du PBS-BSA 0,1%) est ajouté : 50 µL par puits. Ce mélange se compose d'un anticorps biotinylé à son K_{Db} et de l'un des sept anticorps nus à des concentrations correspondant à 100/10/1/0,1/0,01/0 fois le K_D de l'anticorps biotinylé, les sept anticorps étant testés un à un. L'incubation est suivie de deux lavages en PBS-BSA 0,1% (150 µL par puits).

L'étape de révélation est réalisée par l'incubation de 50 μ L de streptavidine couplée à la HRP (HorseRadish Peroxydase) diluée au 1/200^{ème} (kit Substrate Reagent Pack ; R&D Systems) dans du PBS-BSA 0,1%. L'étape d'incubation est également suivie par deux étapes de lavage en PBS-BSA 0,1% (150 μ L par puits) et un dernier lavage en PBS pur (150 μ L par puits). Le substrat de la peroxydase (provenant du même kit) est préparé extemporanément : 50 μ L sont ajoutés à chaque puits. L'incubation est maintenue jusqu'à l'obtention d'une coloration bleutée, au maximum 20 minutes. L'arrêt de cette réaction colorimétrique se fait par ajout de H₂SO₄, 2N (50 μ L par puits, Sigma). Trois témoins négatifs sont réalisés par omission soit de l'anticorps à tester, soit de la streptavidine couplée à la HRP, ou soit des deux. La lecture des résultats se fait dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction par lecture de la densité optique (DO) à 450 nm et 570 nm (spectrophotomètre Multiskan EX, Thermo). La lecture à 570 nm permet d'éliminer l'absorbance du plastique : les résultats sont obtenus par soustraction de la DO_{570nm} à la DO_{450nm}.



Principe du test ELISA sandwich

<u>Figure 16 :</u> Exemple de l'étude de compétition en ELISA sandwich pour l'anticorps biotinylé anti-cCD22 1E3.

4. CYTOMETRIE EN FLUX

4.1. Détermination de l'affinité relative (K_D) de l'anticorps hLL2 dirigé contre le CD22 humain

Les puits d'une plaque 96 puits sont ensemencés avec 300.000 cellules de la lignée cellulaire Daudi contenues dans 25 µL de PBS-BSA 0,1%. L'anticorps monoclonal murin humanisé hLL2 (épratuzumab, IMMUNOMEDICS) est ajouté (25 μ L par puits) selon une gamme de douze concentrations (dilutions en cascade au 1/5^{ème} dans du PBS-BSA 0,1%, première concentration à 5.10⁻⁷ mol.L⁻¹). La plaque est incubée 1 heure à 4°C. Après 2 lavages au PBS-BSA 0,1% (200 μ L par puits), les cellules sont reprises dans 25 μ L d'une solution d'anticorps secondaires (fragment F(ab')₂ de chèvre anti-IgG humain, Jackson ImmunoResearch) couplé au PE et dilué au 1/100^{ème}. L'incubation des plaques se fait pendant 1 heure à 4°C à l'obscurité. Deux lavages en PBS pur (200 μ L par puits) et une reprise des cellules dans 200 μ L de PBS pur précèdent la lecture de la fluorescence au FACSCalibur (BD Bioscience) : le laser d'excitation sélectionné émet à 585 nm.

4.2. Etude de l'internalisation des complexes antigènes-anticorps

300.000 cellules de la lignée CLBL-1 sont déposées dans 25 μ L de PBS-BSA 0,1% (PBS produit en interne, BSA de chez Sigma) dans chacun des puits de deux plaques 96 puits (Nunc). La moitié des puits de chaque plaque subit un traitement au PFA 4% (préparation extemporanée à partir de PFA 32%, Electron Microscopy Sciences) assurant la fixation des cellules : ajout de 50 μ L par puits et incubation 10 minutes à 4°C. Après deux lavages au PBS-BSA 0,1% (150 μ L par puits), les cellules sont reprises dans 25 μ L de PBS-BSA 0,1%. 25 μ L de l'anticorps anti-cCD22 testé sont ajoutés dans chacun des puits, selon une cinétique, de manière à obtenir les temps d'incubation suivants : 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 et 240 minutes. 4 concentrations (dilution dans du PBS-BSA 0,1%) sont utilisées pour l'anticorps : 20, 10, 2 et 0,2 K_D (pour des dilutions finales dans les puits de 10, 5, 1 et 0,1 K_D). Pendant cette cinétique (durée totale de 4 h), la première plaque est maintenue à 4°C et la deuxième à 37°C.

Après 2 lavages au PBS-BSA 0,1%, les cellules sont reprises dans 50 μ L d'une solution d'anticorps secondaires (fragment F(ab')₂ de chèvre anti-IgG de souris) couplé au PE et dilué au 1/200^{ème} (Jackson ImmunoResearch). L'incubation des plaques se fait pendant 1 heure à 4°C à l'obscurité. Deux lavages en PBS pur à 4°C et une reprise des cellules dans 200 μ L de PBS pur à 4°C précèdent la lecture de la fluorescence au FACSCalibur (BD Bioscience), les cellules étant placées sur de la glace : le laser d'excitation sélectionné émet à 585 nm.

Le même protocole est appliqué à des cellules de la lignée Daudi afin d'évaluer le comportement internalisant de l'anticorps dirigé contre le CD22 humain, appelé hLL2 ou épratuzumab. La solution d'anticorps secondaires est différente et contient des fragments $F(ab')_2$ de chèvre anti-IgG humain (Jackson ImmunoResearch) couplés au PE et dilué au 1/100^{ème}. L'incubation des plaques se fait pendant 1 heure à 4°C à l'obscurité.

4.3. Evaluation de la positivité de nœuds lymphatiques canins tumoraux vis-à-vis du cCD22

L'animal est sédaté et une analgésie est réalisée localement et par voie systémique. Après incision du plan cutané avec une lame de bistouri, le tissu tumoral est prélevé à l'aide d'un pistolet à biopsie de 12 gauges BARD® MONOPTY® Disposable Core Biopsy Instrument (prélèvement tissulaire de 17 mm de long et de 2 mm de diamètre). Les prélèvements tissulaires sont conservés 24 h maximum à 4°C dans 5 mL de milieu MACS® Tissue Storage Solution (Miltenyi Biotec) supplémenté de pénicilline (200 UI.mL⁻¹, Gibco), de streptomycine (200 UI.mL⁻¹, Gibco) et d'amphotéricine B (25 ng.mL⁻¹, Sigma). Les prélèvements tissulaires sont dissociés mécaniquement dans une cupule en présence de PBS (produit en interne) : la préparation obtenue est filtrée sur un tamis cellulaire (Cell Stainer Nylon stérile, Dutscher) afin d'en éliminer tout les résidus solides restants. Après deux lavages au PBS-BSA 0,1 % (BSA de chez Sigma), les cellules sont reprises dans du milieu RPMI 1640 (Sigma), supplémenté de 10% de SVF (Hyclone, Thermo Scientific), de glutamine (2 mM), de streptomycine (1 mg.mL⁻¹) et de pénicilline (1.000 UI.mL⁻¹).

Les réactifs (anticorps, marqueur de viabilité et agent fixateur) utilisés dans la suite de l'expérience sont décrits dans le <u>Tableau 16</u> : le milieu de dilution ainsi que leur concentration d'utilisation y figurent.

Réactif	Référence	Concentration d'utilisation	Milieu de dilution	Désignation dans le texte
IgG _{1,κ} murin anti-CD22 canin 10C6	Produit par le laboratoire de l'équipe 13, CRCINA	5 Kd	PBS-BSA 0,1%- SVF 10%	10C6
IgG de rat anti-IgG1 de souris couplé PE/Cy7	BioLegend 0,2 mg.mL ⁻¹ , 100 μg	1/50	PBS-BSA 0,1%- SVF 10%	α-IgGm-PE/Cy7
IgG1 murin anti-CD21 canin couplé Alexa Fluor 647	Biorad 0,05 mg.mL ⁻¹ , 50 μg	1/200	PBS-BSA 0,1%- SVF 10%	αCD21-AF647
IgG1 murin anti-CD3 canin couplé FITC	Biorad 0,1 mg.mL ⁻¹ , 100 μg	1/20	PBS-BSA 0,1%- SVF 10%	αCD3-FITC
IgG _{2b} de rat anti-CD45 canin couplé PE	Biorad 100 tests	1/20	PBS-BSA 0,1%- SVF 10%	αCD45-PE
Isotype contrôle : IgG _{1,κ} de rat couplé PE/Cy7	Thermo Fisher Scientific 0,2 mg.mL ⁻¹ , 50 μg	1/200	PBS-BSA 0,1%- SVF 10%	IC-AF647
Zombie NIR fixable viability kit	Biolegend	1/100	PBS	Zombie NIR
Paraformaldéhyde	Electron Microscopy Sciences préparation extemporanée à partir de PFA 32%	4%	PBS-BSA 0,1%	PFA

<u>Tableau 16 :</u> Evaluation de la positivité de nœuds lymphatiques canins tumoraux vis-à-vis du cCD22 : références des réactifs utilisés ainsi que leur concentration d'utilisation.

400.000 cellules sont déposées dans 20 μ L dans chacun des puits d'une colonne d'une plaque 96 puits (Nunc). Plusieurs traitements leur sont appliqués, ainsi qu'expliqué dans le <u>Tableau 17</u> cidessous. Pour chaque étape, les cellules sont reprises dans 40 μ L d'anticorps ou du mélange d'anticorps indiqué et sont incubées pendant 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. La fixation intermédiaire des puits A, B et C se fait avec du PFA 1% dans un volume final de 100 μ L (25 μ L de PFA 116 4% et 75 μL de PBS-BSA 0,1%) pendant 15 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière. Enfin, l'exposition au Zombie NIR, marqueur de viabilité, dure également 15 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière.

Référence du puits	10C6	α-IgGm- PE/Cy7	PFA	αCD21- AF647	αCD3- FITC	αCD45- PE	IC- AF647	Zombie NIR
A	Х	Х	Х	Mélan	ge des 3 ant	ticorps		Х
В		Х	Х	Mélan	ge des 3 ant	ticorps		Х
С			Х		Mélan	ige des 3 ant	icorps	Х
D				Х				Х
Ε					Х			Х
F						Х		Х
G	Cellules seules							

<u>Tableau 17 :</u> Evaluation de la positivité de nœuds lymphatiques canins tumoraux vis-à-vis du cCD22 : incubations successives réalisées sur les cellules des différents puits.

Tous les puits subissent une dernière étape de fixation avec du PFA 1% (15 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière).

Deux lavages en PBS pur et une reprise des cellules dans 200 µL de PBS pur précèdent la lecture de la fluorescence au FACSAria (BD Bioscience) : les lasers d'excitation sélectionnés émettent à 488 et 633 nm.

5. ADAPTATION DES ANTICORPS ANTI-cCD22 POUR LA MEDECINE NUCLEAIRE

5.1. Marquage à l'iode-125

Le marquage est réalisé sur tube eppendorf (1,5 mL) coaté en Iodo-Gen (1-3-4-6-tétrachloro-3a-6a-diphénylglycouril, Pie, Sigma) en présence d'iode-125 et de la protéine à marquer (Fraker PJ. *et* Speck JC., 1978) : 10 minutes d'agitation à température ambiante sont nécessaires. Son rendement est estimé par chromatographie sur couche mince iTLC-SG (Agilent Technology). 1 µL de la solution de marquage est déposé à environ 1 cm du bas d'une plaque iTLC-SG d'environ 9 cm : la migration est réalisée en plaçant le bas de la plaque dans 3 mL d'acide trichloroacétique (TCA) 10% (Prolabo). L'iode libre non fixé à l'anticorps migre avec le solvant et sera retrouvé sur la partie haute de la plaque, alors que l'anticorps radiomarqué reste dans le bas de la bandelette. Cette dernière est coupée en deux parties égales à la fin de la migration, de façon à les compter au compteur gamma (1480 Automatic Gamma Counter Wallac, PerkinElmer). L'anticorps marqué est ensuite purifié sur une colonne Sephadex PD10 (Amerscham Pharmacia Biotech) où l'élution est effectuée par fractions de 300 µL de PBS. La radioactivité contenue dans les fractions est évaluée au compteur gamma et celles contenant l'anticorps sont regroupées.

Les anticorps marqués à l'iode-125 sont : 10C6, 1E3, 6B7 et 5C2.

5.2. Marquage des anticorps à des radioéléments métalliques

5.2.1. Couplage des vecteurs à un agent chélatant, le DOTA

5.2.1.1. Couplage au DOTA

Ce couplage nécessite de travailler avec des solutions exemptes de métaux : on utilise, à chaque étape décrite ci-dessous, des billes ayant la propriété d'adsorber les métaux (CHELEX 100, Sigma).

Le couplage de l'anticorps anti-cCD22 (conservé en PBS) commence par une étape d'incubation en tampon acétate d'ammonium-EDTA (acétate d'ammonium 0,1 M et pH=4,5, Sigma ; EDTA, Sigma Trace Select) afin de complexer d'éventuelles traces de métaux. Puis l'anticorps subit une étape de concentration de la protéine entre 1 et 5 mg.mL⁻¹. La solution d'acétate d'ammonium-EDTA est progressivement remplacée par un tampon borate (0,2 M, pH entre 8,5 et 9, Sigma Trace Select) à l'aide d'un filtre à ultrafiltration (Amicon Ultra 15, 30K, Merck) : le volume final récupéré atteint 1,5 mL et la quantité d'anticorps présente est calculée par spectrophotométrie (Nanodrop 1000, Thermo Scientific). Le volume nécessaire d'un mélange de DOTA-DMSO est ajouté à la préparation d'anticorps de manière à avoir 20 équivalents DOTA (p-SCN-Bn-DOTA (B-205), Macrocyclics) : l'incubation dure une nuit à l'obscurité à température ambiante. Le DOTA libre est éliminé par ultrafiltration (Amicon Ultra 15, 30K, Merck) et l'anticorps-DOTA est dilué dans une solution tamponnée d'acétate d'ammonium 0,2 M, pH=6.

5.2.1.2. Détermination du nombre de ligands par anticorps

Quatre solutions de l'anticorps-DOTA évalué sont préparées en mélangeant 50 pmol d'anticorps couplé au DOTA et respectivement 1, 2, 4 et 8 équivalents d'indium froid. A chacune de ces quatre solutions est ajouté 1 μ L d'indium-111 (solution d'indium-111 diluée de manière à obtenir 1,5.10⁶ cpm/ μ L). Ces quatre préparations sont complétées avec un tampon acétate (0,5 M, pH=5) jusqu'à un volume final de 30 µL. Les tubes sont incubés 1 heure à 42°C. Le rendement de marquage à l'indium-111 est estimé par chromatographie sur couche mince iTLC-SG (Cyclone® Plus, PerkinElmer; logiciel Optiquant®). Le nombre de cycles DOTA fixés sur l'anticorps anti-cCD22 est déterminé graphiquement sur le graphe représentant le « rendement multiplié par le nombre d'équivalents » en fonction du « nombre d'équivalents ».

5.2.2. Marquage au cuivre-64

Le marquage au cuivre-64 des anticorps anti-cCD22-DOTA est réalisé par la société ARRONAX (Mickael Bourgeois, Saint-Herblain, 44). 50 MBq sont ajoutés à 200 µg d'anticorps anti-cCD22-DOTA : après purification, les anticorps anti-cCD22-DOTA couplés au cuivre-64 sont transportés chez Oniris, lieu de la réalisation de l'imagerie immuno-TEP/TDM.

5.2.3. Marquage à l'indium-111

Le marquage à l'indium-111 des anticorps anti-cCD22-DOTA est réalisé par la société ARRONAX (Mickael Bourgeois et Aurélien Vidal, Saint-Herblain, 44).



<u>Figure 17 :</u> Photographie de l'automate Modular Lab Standard d'ARRONAX.

La synthèse du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 est réalisée sur un système automatisé Modular Lab Standard de Eckert and Ziegler Eurotope GmbH (Berlin, Allemagne) conforme aux normes GMP (<u>Figure 17</u>). Le four Peltier permet un contrôle de la température de – 40 °C à + 150 °C et est équipé d'un agitateur magnétique, de détecteurs de températures, de pression et de radioactivité ainsi que d'une caméra. La réaction se déroule dans un réacteur en verre borosilicaté de 5 mL de type V-vial. Les transferts de liquide sont réalisés par pression positive à l'aide d'azote de qualité pharmaceutique (2,0 bars). Le système complet est positionné dans une enceinte blindée Von Gahlen (100 mm Pb). Le procédé de radiomarquage entièrement automatisé est programmé à l'aide de l'interface logiciel Modular Lab de Eckert and Ziegler qui fournit des enregistrements de production de lots conformes aux normes GMP, incluant les tracés de suivi de température, de pression et de radioactivité. Ce système est adaptable à façon et la configuration utilisée pour le radiomarquage à l'indium-111 de l'anticorps DOTA-10C6 est représentée sur la <u>Figure 18</u>.



<u>Figure 18 :</u> Configuration du système automatisé Modular Lab Standard pour le radiomarquage de l'anticorps DOTA-10C6 à l'indium-111.

Le flacon contenant le chlorure d'indium-111 est rincé avec une solution tampon d'acétate de sodium et ajouté à l'anticorps DOTA-10C6 dans le réacteur. Après 30 minutes de chauffage à 40°C puis refroidissement à 25°C, le milieu réactionnel est filtré et le réacteur est rincé avec une solution tampon d'acétate de sodium.

Tous les réactifs et solvants utilisés proviennent de sources commerciales (Aldrich, Merck...). La source de chlorure d'indium-111 provient de Mallinckrodt Medical B.V. (Petten, Pays-Bas).

La radiosynthèse se déroule de la manière suivante : 1,5 mg d'anticorps DOTA-10C6 sont introduits dans le réacteur (700 μ L d'une solution à 2,2 mg/mL dans un tampon acétate d'ammonium 0,2 M, pH = 5,5). Un flacon pour le rinçage de la source d'indium-111 est rempli avec 2 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M, pH = 5,0. Un flacon de rinçage du réacteur est rempli avec 2 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M, pH = 5,0. L'activité en indium-111 est mesurée par un activimètre calibré ISOMED 2010 de MED Nuklear-Medizintechnik GmbH (Dresde, Allemagne) et le flacon de chlorure d'indium-111 (200 MBq à 8:00 CET le jour du radiomarquage, 300 μ L) est connecté à l'automate. Une fois tous les flacons remplis, le programme automatisé est initié :

- la solution de chlorure d'indium-111 est ajoutée au réacteur
- le flacon d'indium-111 est rincé avec 2 mL d'une solution de tampon acétate de sodium 0,1 M, pH = 5,0
- le milieu réactionnel est chauffé à 40°C pendant 30 minutes
- après refroidissement à 25°C le milieu réactionnel est passé sur filtre stérilisant Supor AEF (PALL, New-York, USA)
- le réacteur est rincé avec 2 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M, pH = 5,0.

Le flacon contenant le produit de radiosynthèse est récupéré : le volume final est déterminé par pesée, l'activité est mesurée à l'activimètre et la concentration d'anticorps est déterminée au spectrophotomètre SimpliNano GE Healthcare (Marlborough, MA, USA).

La pureté radiochimique est déterminée par chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) et le pourcentage d'incorporation de l'indium-111 est également contrôlé par chromatographie sur couche mince (CCM).

Le contrôle qualité par HPLC est réalisé sur une chaîne Shimadzu Prominence (CBM-20A) équipée d'une pompe binaire (LC-20AB), d'un dégazeur, d'un détecteur UV (SPD-20A) et d'un four à colonnes avec injecteur manuel (CTO-20AC). La chaîne HPLC est couplée à un détecteur de radioactivité Gabistar de Raytest GmbH (Straubenhardt, Allemagne) équipé d'une sonde NaI 2x2". Les analyses sont réalisées sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique GE Superdex 200 Increase 10/300GL à un débit de 0,75 mL.min⁻¹ avec une élution isocratique par une solution de tampon phosphate 0,1 M, pH = 7,0, le temps d'analyse étant de 45 minutes avec une détection UV à la longueur d'onde λ = 280 nm.

Les chromatographies sur couches minces sont réalisées sur des bandelettes Instant Thin-Layer Chromatography-silica gel (iTLC-sg) de Agilent (Santa Clara, CA, USA). Les plaques sont lues en utilisant un système Cyclone Plus Storage Phosphor avec des écrans Phosphor MultiSensitive (taille moyenne) de Perkin Elmer (Waltham, MA, USA). Les images sont analysées avec le logiciel OptiQuant.

5.3. Détermination de l'immunoréactivité des radiopharmaceutiques

5.3.1. Méthode de Lindmo

Ce test, appelé technique de LINDMO (Lindmo T. *et al.*, 1984), est réalisé en duplicata sur une gamme de dilution au 1/2 de la lignée cellulaire CLBL-1 mise en présence d'une seule concentration de

protéines radiomarquées. La concentration cellulaire initiale choisie afin d'obtenir un excès d'antigène est 160.10⁶ cellules.mL⁻¹. La séparation de la radioactivité liée aux cellules de celle liée aux protéines libres se fait, après deux heures d'incubation à 4°C, par centrifugation à 5000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé. Les culots sont repris dans 500 µL de PBS : les résultats sont lus au compteur gamma (Wallac) et donnés en cpm.

5.3.2. Utilisation de billes magnétiques coatées avec du cCD22

5.3.2.1. Production des billes magnétiques coatées avec du cCD22

Les billes magnétiques NHS-activated magnetic beads (Thermo Scientific, Pierce) ont la capacité de former des liaisons covalentes de type amide entre leur fonction N-hydroxysuccinimide (NHS) et les groupes amines primaires des protéines que l'on cherche à fixer (cCD22 ici). Le couplage des billes magnétiques avec la protéine cCD22- β 2m (produite dans le laboratoire d'accueil dans une lignée CHO transfectée) a été réalisé selon les indications du fournisseur : la réaction de couplage se déroule dans un tampon borate sans amine à un pH situé entre 7 et 9.

5.3.2.2. Détermination de l'immunoréactivité des anticorps marqués à l'indium-111

L'anticorps couplé DOTA et radiomarqué à l'indium ¹¹¹In-DOTA-10C6 est dilué dans du PBS pour atteindre une concentration de 50 ng.mL⁻¹. Cinq concentrations de billes métalliques coatées avec le cCD22 sont préparées par dilution en cascade au ½ dans du PBS, la concentration la plus élevée étant réalisée en doublon à raison de 20 µL.mL⁻¹ de la préparation mère de billes. 500 µL de chacune des cinq concentrations de billes métalliques sont mélangés avec 500 µL de la solution d'anticorps ¹¹¹In-DOTA-10C6. Un tube supplémentaire fait office de témoin : 500 µL d'anticorps ¹¹¹In-DOTA-10C6 et 500 µL de PBS. Les tubes sont incubés 1h30 à température ambiante puis placés sur un portoir de séparation magnétique. Une fois les billes métalliques accolées à la paroi des tubes 1,5 mL eppendorf, l'activité présente dans 500 µL de surnageant de chaque tube est évaluée : les résultats sont lus au compteur gamma (2470 automatic gamma counter Wizard2, PerkinElmer) et donnés en cpm.

6. ETUDES IN VIVO DANS UN MODELE MURIN XENOGREFFE

6.1. Modèle murin xénogreffé

Les animaux greffés sont des souris femelles (NMRI-nu, Janvier Labs) âgées de 8 semaines (Shinkai Y. *et al.*, 1992), et arrivées au laboratoire depuis 2 semaines. Elles sont hébergées dans l'animalerie UTE (SFR François Bonamy, IRS-UN, université de Nantes, numéro de license B-44-278). Les expériences animales de biodistribution réalisées dans l'espèce murine ont été validées par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale des Pays de-la-Loire (N°CEEA 2012-171).

Les cellules sont préparées dans du PBS pur à la concentration de 50.10^6 cellules.mL⁻¹. Cette suspension (100 µL) est injectée par voie sous-cutanée à chaque animal, au niveau du flanc droit. Les animaux sont suivis pendant toute la durée de la croissance tumorale : le poids, l'appétit, l'état général et la taille de la tumeur sont relevés quotidiennement (Rütgen B. *et al.*, 2012).

6.2. Etude de biodistribution des anticorps anti-cCD22 marqués à l'iode-125

Neuf souris (par anticorps étudié) ont été préalablement greffées avec des cellules de la lignée CLBL-1 comme expliqué précédemment (6.1.). Chacune de ces souris reçoit par voie intraveineuse (veine caudale ventrale) 100 μL de l'anticorps anti-cCD22 murin marqué à l'iode-125 (60 μg.mL⁻¹).

Le prélèvement des organes est réalisé 1, 4 et 16 h après les injections : deux souris sont sacrifiées pour les deux premiers points de prélèvement, et trois souris pour le dernier. La radioactivité de chaque organe ou tissu (tumeur, foie, reins, intestin grèle, poumons, muscle, rate, peau, cerveau, cœur, os plats, estomac et queue) est mesurée au compteur gamma (Wallac) et le pourcentage de la dose injectée par gramme (%ID/g) est ensuite calculé en fonction du poids de chaque organe.

Quatre anticorps anti-cCD22 sont ainsi évalués : 10C6, 1E3, 6B7 et 5C2.

6.3. Imagerie phénotypique immuno-TEP/TDM

Quatre souris ont été préalablement greffées avec des cellules de la lignée CLBL-1 comme expliqué précédemment. Deux de ces souris reçoivent par voie intraveineuse (veine caudale droite ou gauche) 10 MBq de la solution d'anticorps anti-cCD22 10C6-DOTA marqué au cuivre-64, les deux autres recevant 10 MBq de la solution d'anticorps anti-cCD22 5C2-DOTA marqué au cuivre-64.

Les images sont réalisées à 4 et 16 h après injection à l'aide d'un dispositif Inveon µPET/TDM (Siemens Preclinical Solutions) : les animaux sont anesthésiés avec 1,5% d'isoflurane (Vetflurane, Centravet) et 1 L.min⁻¹ de dioxygène. L'image TDM est réalisée par une méthode de reconstruction à faisceau conique (Siemens) après l'acquisition (80 kV, 500 µA, 320 ms). L'image immuno-TEP est réalisée dans la foulée (20 minutes d'acquisition) : la reconstruction des images se fait à l'aide de deux algorithmes (3-Dimensional Ordered-Subsets-Expectation Maximization algorithm, 18 itérations ; Maximum A Priori probability algorithm, 2 itérations) et s'accompagne d'une correction pour l'atténuation et la diffusion.

Toutes les souris sont sacrifiées à 16 h post-injection : la radioactivité de chaque organe ou tissu (tumeur, foie, reins, intestin grêle, poumons, muscle, rate, peau, cerveau, cœur, os plats, estomac et queue) est mesurée au compteur gamma (2470 automatic gamma counter Wizard², PerkinElmer) et le pourcentage de la dose injectée par gramme (%ID/g) est ensuite calculé en fonction du poids de chaque organe.

7. ETUDE IN VIVO DANS L'ESPECE CANINE

Toutes les expériences réalisées chez des chiens d'expérimentation ont fait l'objet d'une validation par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale des Pays de-la-Loire (envoi postal 20 040 190 0594 0 / 20 040 190 0593 3 ; 2016072216147123 / APAFIS 6188).

Les injections de radiopharmaceutique suivies d'imagerie phénotypiques immuno-TEMP/TDM chez les chiens développant spontanément un DLBCL font partie d'un protocole d'essai clinique validé par le Comité d'Ethique pour la Recherche clinique Vétérinaire d'Oniris (CERVO-2016-21-V).

7.1. Détermination du volume sanguin des organes

7.1.1. Marquage d'albumine humaine au technetium-99m

Après élution du générateur de technetium-99m Tekcis 2-50 GBq et détermination de l'activité volumique de l'éluat, 2,5 GBq de technetium-99m sont ajoutés dans le flacon de VASCULOCIS (IBA

Molecular) contenant 10 mg d'albumine humaine. Après homogénéisation, le flacon de ^{99m}Tc-VASCULOCIS est mis à reposer 20 minutes. Le rendement de marquage est estimé par chromatographie sur couche mince iTLC-SG (Agilent Technology) : 2 µL de la solution de marquage sont déposés à environ 1 cm du bas d'une plaque iTLC-SG d'environ 9 cm et la migration est réalisée en plaçant le bas de la plaque dans 3 mL d'acétone. Les résultats sont lus au compteur gamma (2470 automatic gamma counter Wizard², PerkinElmer) et donnés en cpm.

7.1.2. Etude de la stabilité du ^{99m}Tc-VASCULOCIS dans le sérum de chien

La stabilité dans le plasma hépariné et dans du chlorure de sodium 0,9% (B. BRAUN, Virbac) du radiopharmaceutique ^{99m}Tc-VASCULOCIS est étudiée ici. 0,3 MBq de ^{99m}Tc-VASCULOCIS sont incubés à 37°C et à température ambiante dans 1 mL de NaCl 0,9%. De même, 0,3 MBq de ^{99m}Tc-VASCULOCIS sont incubés à 37°C et à température ambiante dans 1 mL de plasma hépariné de chien. L'évaluation de la stabilité du radiopharmaceutique est permise par la réalisation de chromatographies sur couche mince iTLC-SG (Agilent Technology) successives aux temps suivants : 0, 5, 10, 15 et 30 minutes, puis 1, 2, 3 et 4 h après le début de l'incubation. Le solvant de migration utilisé est l'acétone. Les résultats sont lus au compteur gamma (2470 automatic gamma counter Wizard2, PerkinElmer) et donnés en cpm. Les chromatographies sur couche mince étant réalisées en duplicat, une analyse est également permise avec un cyclone (Cyclone® Plus, PERKIN ELMER ; logiciel Optiquant®).

7.1.3. Imagerie TEMP/TDM au ^{99m}Tc-VASCULOCIS

Trois chiennes d'expérimentation, NOR.ALI, NIA.ALI et NOU.ALI, sont anesthésiées, intubées et perfusées. Une sonde urinaire est mise en place. Une prémédication leur est administrée : 0,3 mg.kg⁻¹ de prométhazine (Phénergan 2,5%, UCB PHARMA SA) par voie sous-cutanée et 1 mg.kg⁻¹ de méthylprednisolone (Solumédrol 20, PFIZER PFE France) par voie intraveineuse. Chaque animal reçoit 140 à 225 MBq de ^{99m}Tc-VASCULOCIS par voie intraveineuse sous forme d'un bolus rapide. Immédiatement avant l'acquisition TEMP/TDM, un prélèvement sanguin est réalisé pour évaluation de l'activité présente dans 1 g de sang : les résultats sont lus au compteur gamma (2470 automatic gamma counter Wizard2, PerkinElmer) et donnés en cpm. Le même tube de sang est placé dans le lit de la TEMP/TDM (Optima 640, GE Medical Systems) aux cotés de l'animal et l'acquisition est lancée dans les 40 minutes suivant l'injection de ^{99m}Tc-VASCULOCIS.

L'acquisition TEMP est réalisée avec un collimateur Low Energy High Resolution (LEHR). Le temps d'acquisition est de 15 secondes pour chacune des 120 projections. La fenêtre d'acquisition est centrée sur le pic photoélectrique de 140,5 ± 7 keV (agrandissement de 10 %). La reconstruction

s'effectue à l'aide du logiciel Xeleris et de l'algorithme Order Subset Expected Maximisation (OSEM), 2 itérations et 10 subsets. La reconstruction est implémentée de la correction de la diffusion (scatter correction DEW) d'après l'acquisition tomodensitométrique (120 ± 6 keV, 10 mA) et de la correction de l'atténuation.

7.2. Etude de biodistribution de l'anticorps anti-cCD22 ¹¹¹In-DOTA-10C6 chez des chiens sains d'expérimentation et des chiens développant spontanément un DLBCL

7.2.1. Imagerie quantitative immuno-TEMP/TDM

7.2.1.1. Activité spécifique inférieure à 10 MBq.mg⁻¹ : en présence d'une co-infusion d'une grande quantité d'anticorps froid 10C6

Trois chiens d'expérimentation sains (BAC.ALI, NIA.ALI et NOR.ALI) et un chien spontanément malade (AMI.NIC) sont concernés par cette expérience.

Les chiens sont anesthésiés, intubés et perfusés. Une sonde urinaire est mise en place. Une prémédication leur est administrée : 0,3 mg.kg⁻¹ de prométhazine (Phénergan 2,5%, UCB PHARMA SA) par voie sous-cutanée et 1 mg.kg⁻¹ de méthylprednisolone (Solumédrol 20, PFIZER PFE France) par voie intraveineuse.

Un mélange d'anticorps radiomarqués, ¹¹¹In-DOTA-10C6, et d'anticorps nus, 10C6, est injecté aux chiens par voie intraveineuse, pour un volume total de 20 mL. La quantité finale d'anticorps injectée est de 1,5 mg.kg⁻¹, la part d'anticorps radiomarqué étant inférieure à 750 µg pour une activité injectée de 3,7 MBq.kg⁻¹. L'injection est réalisée à l'aide d'un pousse seringue (pousse seringue monovoie Perfusor Space, B.BRAUN) selon les conditions d'injections respectées en médecine humaine : 10% du volume est perfusé à un débit lent (2 mL à 1mL.kg⁻¹.h⁻¹), le reste étant administré à un débit adapté au taux d'endotoxines de la préparation d'anticorps nu (18 mL à 4,5 mL.kg⁻¹.h⁻¹). Une seringue de rinçage de 10 mL de chlorure de sodium 0,9% (B. BRAUN, Virbac) est ensuite branchée sur la tubulure ayant servi à l'injection : la vitesse de perfusion est de 4,5 mL.kg⁻¹.h⁻¹. A la fin du rinçage, le cathéter veineux ayant servi à l'injection du radiopharmaceutique est retiré et un pansement compressif est mis en place.

Des acquisitions TEMP/TDM (Optima 640, GE Medical Systems) successives sont réalisées 1, 24, 48 et 72 h après le début de l'injection du radiopharmaceutique. Le chien spontanément atteint de DLBCL, du fait de son état de santé, ne peut subir autant d'anesthésies que les chiens sains d'expérimentation : les acquisitions TEMP/TDM sont réalisées à 48 h post-injection avant la mise en place d'un traitement par chimiothérapie, puis à 1 et 24 h post-injection après un mois de traitement par chimiothérapie.

Pour chacun des animaux, quelques minutes avant l'imagerie, un prélèvement sanguin est réalisé et un tube contenant 1 g de sang est placé sur le flanc gauche de l'animal.

7.2.1.2. Activité spécifique supérieure à 50 MBq.mg⁻¹ : en l'absence de co-infusion d'une grande quantité d'anticorps froid 10C6

Deux chiennes d'expérimentation saines (DOR.ALI et DAI.ALI) et une chienne spontanément malade (FAX.FRE) ont été enrôlées dans cette expérience.

Les chiennes sont anesthésiées, intubées et perfusées. Une sonde urinaire est mise en place. Une prémédication leur est administrée : 0,3 mg.kg⁻¹ de prométhazine (Phénergan 2,5%, UCB PHARMA SA) par voie sous-cutanée et 1 mg.kg⁻¹ de méthylprednisolone (Solumédrol 20, PFIZER PFE France) par voie intraveineuse.

Un mélange d'anticorps radiomarqués, ¹¹¹In-DOTA-10C6, et d'anticorps nus, 10C6, est injecté aux chiens par voie intraveineuse, pour un volume total de 20 mL. La quantité finale d'anticorps injectée est de 750 µg, la part d'anticorps radiomarqué étant supérieure à 300 µg. L'injection est réalisée sous le contrôle d'un pousse seringue (pousse seringue monovoie Perfusor Space, B.BRAUN) selon les conditions d'injections respectées en médecine humaine : 10% du volume est perfusé à un débit lent (2 mL à 1mL.kg⁻¹.h⁻¹), le reste étant administré à un débit adapté au taux d'endotoxines de la préparation d'anticorps nu (18 mL à 4,5 mL.kg⁻¹.h⁻¹). Une seringue de rinçage de 10 mL de chlorure de sodium 0,9% (B. BRAUN, Virbac) est ensuite branchée sur la tubulure ayant servi à l'injection : la vitesse de perfusion est de 4,5 mL.kg⁻¹.h⁻¹. A la fin du rinçage, le cathéter veineux ayant servi à l'injection du radiopharmaceutique est retiré et un pansement compressif est mis en place.

Des acquisitions TEMP/TDM (Optima 640, GE Medical Systems) successives sont réalisées 1, 24, 48, 72 et 144 h après le début de l'injection du radiopharmaceutique. Le chien spontanément atteint de DLBCL n'est anesthésié qu'aux temps 1, 48 et 144 h post-injection du fait de son état de santé.

Pour chacun des animaux, un prélèvement sanguin est réalisé quelques minutes avant l'imagerie et un tube contenant 1 g de sang est placé sur le flanc gauche de l'animal.

7.2.1.3. Paramètres d'acquisition et de reconstruction des images TEMP/TDM

L'acquisition TEMP est réalisée avec un collimateur Medium Energy General Purpose (MEGP). Le temps d'acquisition est de 15 secondes pour chacune des 120 projections. Deux fenêtres d'acquisition sont sélectionnées et centrées sur les pics photoélectriques de 172 ± 8,6 keV et 247 ± 12,4 keV (agrandissement de 10 %). La reconstruction s'effectue à l'aide du logiciel Xeleris et de l'algorithme Order Subset Expected Maximisation (OSEM), 2 itérations et 10 subsets. La reconstruction est implémentée de la correction de la diffusion (scatter correction DEW) d'après l'acquisition tomodensitométrique (120 ± 6 keV, 10 mA) et de la correction de l'atténuation.

7.2.2. Pharmacocinétique sanguine

Pour chacun des chiens, un prélèvement sanguin est réalisé pour évaluation de l'activité présente dans 1 g de sang aux temps suivants : 1, 24, 48, 72 et 144 h post-injection. Les résultats sont lus au compteur gamma (2470 automatic gamma counter Wizard2, PerkinElmer) et donnés en coups (counts). Les jours où une imagerie est programmée, il s'agit du même tube de sang qui est placé dans le lit de la TEMP/TDM aux cotés de l'animal.

7.3. Quantification des imageries phénotypiques

7.3.1. Contourage des régions d'intérêt

Le contourage du corps entier, du tube de 1 g de sang, des organes d'intérêt (foie, reins, rate, poumon, vertèbres lombaires) et des masses tumorales est effectué sur les reconstructions tomodensitométriques en utilisant le logiciel « 3D Slicer ». Ce travail de contourage manuel ou automatique permet notamment de déterminer le poids et le volume des organes et des masses tumorales d'intérêt.

Le pourcentage d'activité injectée présent dans un organe ou une masse tumorale à un temps donné est ensuite calculé : les résultats sont donnés en nombre de coups que l'on rapporte au nombre de coups corps entier détectés à J0 (sans correction de la décroissance).

7.3.2. Dosimétrie

Les doses calculées dans l'étude dosimétrique correspondent à un contexte de RIT anti-CD22 : administration par voie intraveineuse du radiopharmaceutique ⁹⁰Y-DOTA-10C6.

Le pourcentage d'activité injectée par kilogramme dans un organe ou une masse tumorale à un temps donné (c'est à dire l'activité) permet, en appliquant les règles de la décroissance de l'indium-111 puis de l'yttrium-90, de déterminer le nombre de désintégrations ayant lieu par unité de temps (seconde) dans un kilogramme du volume d'intérêt à chaque temps d'acquisition des imageries phénotypiques. En intégrant entre 0 et l'infini la fonction représentant l'activité en fonction du temps après ajustement avec une fonction de type exponentielle (somme de deux exponentielles ou exponentielle simple), nous obtenons le nombre total de désintégrations pouvant avoir lieu dans un kilogramme de ce volume d'intérêt pendant toute la durée du traitement : il s'agit de l'activité cumulée de ce volume d'intérêt (aire sous la courbe de la fonction intégrée entre 0 et l'infini).

Cette valeur, multipliée par l'énergie dégagée par une désintégration de l'yttrium-90 et pondérée par la fraction absorbée de l'énergie émise dans l'organe, permet d'accéder à la dose autoabsorbée reçue par l'organe ou la tumeur d'intérêt, plus communément désignée comme la dose autoabsorbée.

La dose auto-absorbée reçue par la moelle osseuse est calculée à partir de l'activité détectée dans les vertèbres lombaires contourées manuellement, en se basant sur le fait que la totalité de cette activité provient de la présence de l'anticorps ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans la moelle osseuse. En effet, il n'a pas été montré de fixation spécifique de l'anticorps 10C6 dans le tissu osseux lors de marquages immunohistochimiques sur coupes paraffinées avec ce même anticorps (Nguyen *et al.*, AMaROC, données non publiées). De plus, il n'est pas rapporté dans la littérature de tropisme spécifique de l'indium-111 libre pour le tissu osseux (Annals of the ICRP, 1987). Il est ainsi raisonnable de considérer que l'activité détectée dans le volume de contourage des vertèbres lombaires correspond à l'activité présente dans la moelle osseuse des dits os.

7.4. Test ELISA indirect : monitoring de la réponse immunitaire anti-anticorps murins

Des prélèvements sanguins sur tube sec à la veine jugulaire des chiens sont réalisés avant l'injection du radiopharmaceutique, après 1, 2 et 3 mois post-injection, puis tous les 3 mois. Après 2 h de décantation à température ambiante, les prélèvements sanguins sont centrifugés et le sérum est aliquoté dans des cryotubes et conservé à -80°C.

De plus, afin de disposer d'un témoin positif, le premier chien a avoir reçu 1,5 mg.kg⁻¹ d'anticorps a ensuite suivi un an plus tard un protocole d'immunisation par voie sous-cutanée. Deux injections d'un mélange de 1 mg d'anticorps 10C6 et d'une dose vaccinale NOBIVAC L4 (suspension injectable pour chien utilisée pour une vaccination contre quatre souches de leptospires) sont réalisées à 4 semaines d'intervalle. Un prélèvement sanguin est réalisé à 60 et 90 jours après la première injection sous-cutanée : le sérum est aliquoté et congelé à -80°C.

Voici dans le <u>Tableau 18</u> les références des différents réactifs utilisés dans ce test ELISA indirect :

Réactif	Référence	Concentration d'utilisation	Milieu de dilution	Désignation dans le texte
IgG _{1,κ} murin anti-CD22 canin 10C6	Produit par le laboratoire de l'équipe 13, CRCINA	5 μg.mL ⁻¹	PBS	Antigène / 10C6
Anticorps anti-IgG de chien couplé HRP	IVD Technologies 10 mL	1/2	PBS	Ac secondaire
TMB (tétraméthylbenzidine)	DEMEDITEC Kit Estradiol Sensitive ELISA 25 mL	pur	-	ТМВ
Solution Stop (acide sulfurique)	DEMEDITEC Kit Estradiol Sensitive ELISA 14 mL	pur	-	Solution stop
IgG2a de souris caninisé anti-CD20 canin	InvivoGen	5 μg.mL ⁻¹	PBS	αCD20
Reagent diluent concentrade 3	R&D SYSTEMS	1/5	PBS	diluant

<u>Tableau 18 :</u> Test ELISA indirect de surveillance de la réponse immunitaire anti-anticorps murins : références des réactifs utilisés ainsi que leur concentration d'utilisation.

Les puits d'une plaque 96 puits MaxiSorp (Nunc) sont incubés une nuit à 4°C avec l'antigène, soit l'anticorps murin 10C6 (50 μ L par puits). Le lendemain, une première étape de lavage est réalisée en PBS-BSA 0,1% (150 μ L par puits), suivie par l'étape de saturation en PBS-BSA 0,5% (150 μ L par puits) : l'incubation se fait à température ambiante pendant 1h30. Après une deuxième étape de lavage en PBS-BSA 0,1% (150 μ L par puits), 50 μ L de sérum à tester dilué au 1/200^{ème} avec du diluant sont ajoutés dans les puits. L'étape d'incubation (1h30 à température ambiante) est suivie d'une étape de lavage en PBS-BSA 0,1% (150 μ L par puits), puis de l'ajout de 50 μ L par puits d'anticorps secondaire. L'étape d'incubation d'une durée de 15 minutes à température ambiante est également suivie par deux étapes de lavage en PBS-BSA 0,1% (150 μ L par puits) et d'un dernier lavage en PBS pur (150 μ L par puits). Le substrat de la peroxydase, le TMB, est ajouté : 50 μ L sont ajoutés à chaque puits. L'incubation est maintenue jusqu'à l'obtention d'une coloration bleutée, au maximum 20 minutes, à température ambiante et à l'obscurité. L'arrêt de cette réaction colorimétrique se fait par ajout de solution stop contenant de l'acide sulfurique (50 μ L par puits).

Trois témoins négatifs sont réalisés par omission soit du sérum à tester, soit de l'anticorps secondaire, soit de l'antigène. Le bruit de fond est évalué en remplissant des puits uniquement avec 50 μ L de sérum à tester, d'antigène, d'anticorps secondaire ou de solution de saturation PBS-BSA 0,5%. Deux témoins positifs sont réalisés en utilisant le sérum d'un animal immunisé contre l'anticorps murin 10C6 et en utilisant un anticorps murin caninisé dirigé contre l'antigène canin CD20 (en remplaçant le sérum testé par du PBS-BSA 0,1%).

La lecture des résultats se fait dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction par lecture de la densité optique (DO) à 450 nm (spectrophotomètre ETI-MAX 300, DIASORIN).

CHAPITRE 4. RESULTATS

Partie A. PRODUCTION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL CIBLANT LE CCD22 CANIN POUR UNE UTILISATION EN MEDECINE NUCLEAIRE

Rappelons brièvement que les 7 anticorps monoclonaux mentionnés dans les résultats présentés ci-dessous ont été produits par l'équipe 13 du CRCINA. Le <u>Tableau 19</u> récapitule leurs caractéristiques biochimiques.

ANTICORPS anti-cCD22	Production (mg/mL)	lsotype	Affinité de l'anticorps nu (cytométrie) : K _D (M)	Ecart-type du K _D (M)
2D1	25	$IgG_{2b,\kappa}$	1,05.10 ⁻⁹	7,54.10 ⁻¹¹
5A3	15	$IgG_{1,\kappa}$	2,65.10-8	1,79.10 ⁻⁹
6B7	22	$IgG_{1,\kappa}$	3,73.10-10	6,26.10-11
1E3	19	IgG _{1,ĸ}	1,14.10 ⁻⁹	1,04.10-10
10C6	19	IgG _{1,ĸ}	2,54.10-10	4,01.10-11
5C2	10	IgG _{1,ĸ}	6,4.10-10	1,11.10-10
5F8	9	IgG _{1,ĸ}	5,71.10-9	1,87.10-10

<u>Tableau 19 :</u> Rappel des taux de production, isotypes et affinités relatives des 7 anticorps anti-cCD22 nus produits dans le laboratoire d'accueil.

Les résultats présentés dans cette partie ont donné lieu à la rédaction d'un article soumis au journal « Frontiers » et que vous trouverez en <u>Annexe 7</u> de ce document.

1. CARTOGRAPHIE EPITOPIQUE DU cCD22

Les sept anticorps anti-cCD22 étudiés sont dirigés contre un même antigène et peuvent reconnaître des épitopes identiques ou distincts : l'étude de compétition réalisée à l'aide d'un test ELISA sandwich permet de mettre en évidence la reconnaissance d'épitopes communs pour tous ou partie des anticorps testés.

Le principe de ce test est de mettre en compétition deux à deux les différents anticorps en présence du cCD22- β 2m fixé sur une plaque ELISA à l'aide d'un anticorps anti- β 2m. L'un des deux anticorps en compétition est biotinylé : la biotine permet de révéler le test à l'aide de la streptavidine couplée à la HRP. S'il existe une compétition pour la fixation sur le cCD22 entre les anticorps d'un couple donné, on peut alors dire que ces deux anticorps reconnaissent un épitope identique ou deux épitopes chevauchants. Un résultat caractéristique est présenté dans la Figure 19.



Figure 19 : Exemple de l'étude de compétition en ELISA sandwich pour l'anticorps biotinylé anti-cCD22 1E3.

En mettant en œuvre cet ELISA sandwich pour chacun des 7 anticorps anti-cCD22 biotinylés, il est possible d'identifier 4 épitopes différents reconnus par les anticorps produits au laboratoire. Ces résultats sont résumés dans le <u>Tableau 20</u> dans lequel les couples d'anticorps compétitifs figurent en noir. On distingue ainsi 4 profils de compétition distincts : le profil 2D1, le profil 5A3, le profil 6B7-1E3-5F8 et le profil 10C6-5C2.

Alors que les trois derniers profils sont bien définis, le profil de compétition du 2D1 est plus compliqué à établir : seules des inhibitions partielles aux fortes concentrations d'anticorps compétiteurs ont été observées (notées en gris dans le <u>Tableau 20</u>) et la symétrie de compétition n'est pas retrouvée. En effet, la fixation de l'anticorps 2D1 est partiellement inhibée par les anticorps 1E3, 5F8 et 6B7 mais la présence du 2D1 n'empêche pas la fixation des trois autres. Cette asymétrie dans

les résultats est en faveur d'un encombrement stérique ou de modifications conformationnelles du CD22 selon l'identité de l'anticorps qui se fixe en premier sur sa cible.



<u>Tableau 20 :</u> Réactivités croisées mise en évidence par des tests ELISA sandwich. Les phénomènes de compétition sont notifiés en noir, les cases grises correspondant à des phénomènes de compétition partielle

L'anticorps anti-cCD22 2D1 est nécessairement différent des autres du fait de son isotype particulier, mais la communauté ou divergence de reconnaissance par rapport aux autres anticorps est délicate à établir, probablement pour des raisons de chevauchement entre les épitopes reconnus. C'est ce que représente la <u>Figure 20</u> : les profils de reconnaissance sont représentés par des ensembles à intersections plus ou moins importantes.



<u>Figure 20 :</u> Schématisation de la diversité et du chevauchement des épitopes reconnus par les anticorps murins anti-cCD22.

Les anticorps 10C6 et 5C2 reconnaissent le même épitope, le 5A3 reconnaît seul un second épitope et les anticorps 2D1, 1^E3, 5F8 et 6B7 reconnaissent un troisième épitope avec un profil de compétition plus complexe.

Parmi les six anticorps anti-cCD22 d'isotype $IgG_{1,\kappa}$, l'anticorps 5A3 est distinct des autres. De plus les anticorps 10C6 et 5C2 ne sont pas distinguables à ce stade de la caractérisation, tout comme les anticorps 6B7, 1E3 et 5F8.

2. CINETIQUE D'INTERNALISATION DES COMPLEXES ANTIGENE-ANTICORPS ANTI-CD22

L'une des principales caractéristiques des anticorps anti-CD22 humain (hCD22) est leur capacité à induire une internalisation du complexe anticorps-antigène suite à leur fixation sur les cellules. Cette propriété a été utilisée pour vectoriser des immunotoxines vers le compartiment cellulaire de cellules de lymphome B (Herrera *et al.*, 2000 ; Du X. *et al.*, 2008).

Ce point est particulièrement important pour leur utilisation en médecine nucléaire, qu'il s'agisse de l'imagerie phénotypique ou de la radioimmunothérapie parce que de tels anticorps radiomarqués permettraient de séquestrer les radioéléments dans le compartiment intracellulaire. Ce caractère résidualisant permettrait un dépôt d'activité plus élevé dans les régions ciblées par rapport à ce qui pourrait être observé lors d'une simple liaison de l'anticorps au niveau membranaire (Mattes MJ. *et al.*, 1997). Cette propriété d'internalisation, qui peut être conditionnée par la nature de l'épitope reconnu sur l'antigène, intervient donc de manière essentielle dans le choix du type de marquage utilisé en médecine nucléaire.

Afin d'évaluer le potentiel des différents anticorps anti-CD22 à induire l'internalisation du CD22, nous avons opté pour une étude de cytométrie en flux sur une cinétique d'incubation des cellules de la lignée CLBL-1 (exprimant le cCD22) et de la lignée Daudi (exprimant le hCD22) avec les anticorps à tester. Cette étude se fait dans des conditions où la membrane cytoplasmique est figée par maintien à 4°C ainsi que dans des conditions où la membrane cellulaire reste fluide par incubation à 37°C, selon un protocole éprouvé pour évaluer l'internalisation du CD22 murin (John B. *et al.*, 2003 ; O'Reilly MK. *et al.*, 2011).

Habituellement, l'internalisation du CD22 est évaluée sur des cellules préalablement incubées à 4°C avec des quantités saturantes en anticorps. Après lavage, ces cellules sont placées à 37°C et le phénomène d'internalisation est évalué à différents points-temps. Cependant, dans les applications de médecine nucléaire, les cellules lymphomateuses ciblées par les anticorps anti-CD22 sont exposées à des concentrations variables en anticorps circulants pendant toute la durée du traitement : les anticorps administrés sont mobilisés par les cellules B non tumorales tout comme par les cellules tumorales et le catabolisme des anticorps diminue progressivement la concentration de ces anticorps dans le sang.

Ainsi nous nous sommes demandé quelle pourrait être le taux de fixation des anticorps anti-CD22 sur leur cible à diverses concentration à 37°C par rapport à 4°C. La mise en évidence des anticorps fixés sur la membrane de cellules incubées à 37°C pendant des temps croissants renseigne sur le nombre de cibles restant en surface et sur le potentiel de chaque anticorps à induire l'internalisation du cCD22. Chaque anticorps a été testé à quatre concentrations correspondant à 10, 5, 1 et 0,1 fois leur K_D respectif afin de se positionner à capacité de saturation équivalente des sites antigéniques.

2.1. Comportement internalisant de l'anticorps hLL2

2.1.1. Calcul de l'affinité relative (K_D) de l'anticorps hLL2

L'affinité de l'anticorps anti-hCD22 donnée dans la littérature, K_D de 7.10⁻¹⁰ M (Carnahan J. *et al.*, 2003), a été mesurée par la technique de BIAcore : cette valeur résulte du rapport de la constante d'association K_a et de la constante de dissociation K_d de l'anticorps concerné. Dans nos travaux, nous avons privilégié une mesure du K_D des anticorps par cytométrie en flux qui rend mieux compte du comportement des anticorps sur leur cible dans les conditions de fixation sur cellules vivantes.

Afin de nous placer dans les mêmes conditions expérimentales, l'affinité relative de l'anticorps anti-hCD22 hLL2 a été recalculée par une étude de cytométrie en flux en utilisant des cellules de la lignée cellulaire Daudi. Ainsi évalué, le K_D de l'anticorps anti-hCD22 hLL2 est de 3,6.10⁻⁹ M.

2.1.2. Cinétique d'internalisation du complexe hCD22-hLL2

Nous avons évalué la propriété d'internalisation de l'anticorps monoclonal humanisé anti-CD22 humain sur une lignée cellulaire de lymphome humain : cet anticorps a déjà été utilisé dans des essais cliniques de phase I/II pour le traitement du DLBCL chez l'Homme. L'objectif de cette étude est d'obtenir un élément de comparaison avec les propriétés d'internalisations des anticorps anti-CD22 canin étudiés dans cette Partie A du Chapitre RESULTATS.

La <u>Figure 21</u> présente le taux de fixation de l'anticorps hLL2 sur les cellules cibles en fonction de la durée d'incubation. Le comportement internalisant ou non internalisant est illustré dans la <u>Figure 25</u>.

Ainsi, nous observons que l'anticorps humanisé hLL2 est internalisant à de fortes concentrations (10 et 5 x K_D) tandis que ce comportement n'est pas retrouvé à de faibles concentrations (1 et 0,1 K_D).



<u>Figure 21 :</u> Cinétique d'internalisation de l'anticorps anti-CD22 humain hLL2 sur des cellules de la lignée Daudi (lymphome de Burkitt).

L'anticorps hLL2 est incubé en présence des cellules à différentes concentrations (10 x et 1 x son K_D) à 4°C et à 37°C : à chaque point-temps, les cellules sont placées à 4°C, fixées avec du paraformaldéhyde et la présence d'anticorps fixés à leur surface est révélée à l'aide de fragments F(ab')₂ de chèvre anti-IgG humain couplés au PE et dilué au 1/100^{ème}.

2.2. Comportement internalisant des anticorps anti-cCD22

Les <u>Figures 22 à 24</u> présentent les taux de marquage obtenus pour les incubations à 4°C et 37°C pour les différents anticorps étudiés, ainsi que le pourcentage d'expression du cCD22 à 37°C en référence au taux observé à 4°C.

Le temps nécessaire pour obtenir un plateau de fixation varie d'un anticorps à l'autre, mais il est atteint à 60 minutes pour chacun d'entre eux.

Concernant le processus d'internalisation, on observe pour tous les anticorps anti-cCD22 à 37° C et pour des concentrations de 1 et 0,1 K_D (excepté pour le 5C2 à 1 K_D) que la fixation de l'anticorps induit un marquage plus intense qu'à 4°C : ceci traduit une stabilisation du complexe antigène-anticorps au niveau membranaire. Aux concentrations saturantes d'anticorps (5 et 10 K_D), l'internalisation est visualisable pour tous mais à des temps d'incubation et à des taux variables d'un anticorps à l'autre. En effet, un plateau d'expression du cCD22 à la surface cellulaire est atteint dès 15 minutes d'incubation pour l'anticorps 5C2 à 5 et 10 K_D et après 120 minutes le taux d'expression

observé à 37°C ne représente plus que le tiers de celui observé à 4°C. En revanche, pour l'anticorps 6B7 à 5 et $10K_D$ et à 37°C, le taux d'expression du cCD22 reste supérieur à celui observé à 4°C : l'internalisation du complexe antigène-anticorps n'est observable qu'après 60 minutes d'incubation à 37°C et le taux d'expression à 120 minutes n'a diminué que de 20% par rapport à ce qui est observé à 4°C.



<u>Figure 22 :</u> Evaluation de la quantité d'anticorps anti-cCD22 fixés sur leur cible à la surface des cellules (lignée CLBL-1) après incubation à 4°C et 37°C et cinétique d'internalisation du complexe antigèneanticorps – Anticorps 5C2 et 10C6, reconnaissant un épitope commun.



<u>Figure 23 :</u> Evaluation de la quantité d'anticorps anti-cCD22 5A3 fixés sur sa cible à la surface des cellules (lignée CLBL-1) après incubation à 4°C et 37°C et cinétique d'internalisation du complexe antigène-anticorps.



<u>Figure 24 :</u> Evaluation de la quantité d'anticorps anti-cCD22 fixés sur leur cible à la surface des cellules (lignée CLBL-1) après incubation à 4°C et 37°C et cinétique d'internalisation du complexe antigèneanticorps – Anticorps 6B7, 5F8, 1E3 et 2D1, reconnaissant deux épitopes chevauchants.

La <u>Figure 25</u> récapitule ces résultats et met en évidence l'existence de deux types de comportements : les anticorps 5C2, 10C6 et 2D1 sont fortement internalisants quelle que soit leur concentration, tandis que les anticorps 5F8, 1^E3, 6B7 et 5A3 sont faiblement internalisants à de fortes concentrations (10 et 5 x K_D) et non-internalisants à de faibles concentrations (1 et 0,1 x K_D).



<u>Figure 25 :</u> Comparaison des comportements internalisants des sept anticorps murins anti-CD22 canin produits dans le laboratoire et de l'anticorps humanisé anti-CD22 humain hLL2.

Si tous les anticorps étudiés présentent un comportement internalisant aux fortes concentrations (10 et 5 x K_D), des différences sont observées aux plus faibles concentrations (1 et 0,1 K_D). En effet, le rapport des taux de fixation des anticorps à la surface des cellules exprimant leur cible (cCD22 et hCD22) après incubation à 37°C et à 4°C permet de classer les anticorps étudiés en deux catégories : des anticorps fortement internalisants quelle que soit leur concentration dans le milieu (5C2, 10C6 et 2D1) et des anticorps faiblement internalisants (5F8, 1E3, 6B7, 5A3 et hLL2).

3. ETUDE PHARMACOCINETIQUE A L'AIDE DE QUATRE ANTICORPS ANTI-cCD22 MARQUES A L'IODE-125

Afin d'évaluer si les différences de capacité des anticorps anti-cCD22 à induire l'internalisation du cCD22 ont des conséquences sur l'accumulation de radioactivité au niveau tumoral, nous avons réalisé une étude de biodistribution sur des souris greffées avec la lignée de lymphome canin CLBL-1. Les quatre anticorps sélectionnés pour cette étude présentent des affinités relatives (K_D) et des potentiels d'induction de l'internalisation variables : les anticorps 5C2 et 10C6 ont un très fort potentiel d'internalisation, alors que les anticorps 6B7 et 1E3 l'induisent peu.

3.1. Marquage des anticorps anti-cCD22 10C6, 1E3, 6B7 et 5C2 à l'iode-125

Pour réaliser cette étude de biodistribution, les quatre anticorps sélectionnés 10C6, 5C2, 1E3 et 6B7 ont été marqués avec de l'¹²⁵lode (source de rayons γ , période de 59 jours). Il s'agit d'un marquage direct réalisé à l'aide d'un agent oxydant appelé Iodo-Gen : ce dernier permet l'incorporation de l'iode sur les groupements hydroxyles des tyrosines des protéines.

Pour chacun des anticorps, 150 μ g de protéine ont été marqués avec 150 μ Ci d'iode-125. Les rendements du marquage et de la purification des anticorps anti-cCD22-¹²⁵Iode figurent dans le <u>Tableau 21</u> : ils ont été estimés par chromatographie sur couche mince.

Anticorps anti-cCD22	Rendement du marquage à l' ¹²⁵ Iode	Rendement de la purification sur colonne PD10	Concentration anticorps anti-cCD22- ¹²⁵ lode
<i>10C6</i>	90%	88%	120 μg.mL ⁻¹
1E3	79%	74%	134 μg.mL ⁻¹
6B7	68%	71%	130 μg.mL ⁻¹
5C2	72%	72%	126 μg.mL ⁻¹

Tableau 21 : Caractéristiques du marquage des anticorps anti-cCD22 à l'iode-125.

3.2. Immunoréactivité des anticorps anti-cCD22 ¹²⁵I-10C6, ¹²⁵I-1E3, ¹²⁵I-6B7 et ¹²⁵I-5C2

A la suite de ce marquage, il est nécessaire d'évaluer l'immunoréactivité des anticorps ainsi modifiés : une incorporation d'¹²⁵lode au niveau du site de reconnaissance de l'anticorps anti-cCD22 peut influer sur la capacité de fixation de ce même anticorps sur sa cible.

Nous avons choisi de déterminer la fraction immunoréactive des anticorps anti-cCD22-¹²⁵I par la technique décrite par LINDMO : les anticorps sont incubés à concentration constante en excès d'antigènes présents à la surface des cellules CLBL-1. L'incubation en excès d'antigènes permet de déplacer l'équilibre de la réaction de fixation-dissociation du couple antigène-anticorps vers la fixation de la totalité des anticorps sur leur cible. Ainsi, l'activité mesurée dans le surnageant après centrifugation correspond à la fraction des anticorps ayant perdu leur affinité pour le cCD22. La **Figure** <u>26</u> représente la part d'anticorps anti-cCD22-¹²⁵I non fixés en fonction de la concentration cellulaire. Le plateau observé pour les anticorps anti-cCD22 ¹²⁵I-10C6, ¹²⁵I-6B7 et ¹²⁵I-5C2 confirme que le test a été réalisé en excès d'antigène.



<u>Figure 26 :</u> Test d'immunoréactivité par la méthode de LINDMO en excès d'antigènes après marquage à l'iode-125 des anticorps anti-cCD22 10C6, 6B7 et 5C2.

La fraction immunoréactive des anticorps anti-cCD22 marqués à l'iode-125 est calculée dans un modèle de régression linéaire ainsi que montré dans la <u>Figure 27</u>. L'inverse de l'ordonnée à l'origine, soit 1/y₀, représente la fraction immunoréactive du vecteur radiomarqué à l'iode-125.



<u>Figure 27 :</u> Calcul de la fraction immunoréactive des anticorps anti-cCD22-¹²⁵Iode 10C6, 6B7 et 5C2 dans un modèle de régression linéaire.

Les valeurs des ordonnées à l'origine des quatre modèles de régression linéaire ainsi que les valeurs des fractions immunoréactives pour chacun des anticorps sont données dans le <u>Tableau 22</u>. Il n'a pas été possible de déterminer l'immunoréactivité de l'anticorps anti-cCD22 ¹²⁵I-1E3 pour des raisons techniques, le test nécessitant un très grand nombre de cellules.

L'anticorps ¹²⁵I-6B7 est l'anticorps anti-cCD22 le plus immunoréactif parmi les trois anticorps marqués et évalués, avec une fraction immunoréactive de 83%. Les anticorps 10C6 et 5C2 marqués à l'iode-125 présentent une fraction immunoréactive égale à 68% et 50% respectivement.

Anticorps anti- cCD22	¹²⁵ I-10C6	¹²⁵ I-1E3	¹²⁵ I-6B7	¹²⁵ I-5C2
y ₀	1,47	ND	1,21	1,99
Fraction immunoréactive	68%	ND	83%	50%

Tableau 22 : Fractions immunoréactives des anticorps anti-cCD22 marqués à l'iode-125.

3.3. Etude de biodistribution des anticorps anti-cCD22 ¹²⁵I-10C6, ¹²⁵I-1E3, ¹²⁵I-6B7 et ¹²⁵I-5C2

L'étude de biodistribution réalisée avec les anticorps anti-cCD22-¹²⁵I permet d'évaluer la cinétique de distribution et d'accumulation des vecteurs radiomarqués au niveau des différents organes, y compris la tumeur, dans un modèle murin xénogreffé avec la lignée CLBL-1.

Dans ce modèle, les tumeurs sous-cutanées apparaissent 7 jours après l'injection au niveau du flanc droit des animaux : l'étude de biodistribution est réalisée 14 jours après la greffe (taille des tumeurs variant de 0,5 cm³ à 1 cm³). Pour cette étude pharmacocinétique, 6 μ g d'anticorps anti-cCD22 marqués à l'iode-125 sont injectés au temps T₀. La distribution de l'activité injectée est évaluée 1, 4 et 16 h après l'injection, et est exprimée en % de la dose injectée par gramme : la <u>Figure 28</u> illustre la biodistribution de l'anticorps ¹²⁵I-10C6 au cours du temps.



<u>Figure 28 :</u> Répartition de la radioactivité (% de la dose injectée/g) 1, 4 et 16 h après injection de l'anticorps anti-cCD22 10C6-¹²⁵I.

(T: tumeur, Sg: sang, F: foie, Re: reins, I: intestins, Po: poumons, M: muscles, Rat: rate, Pe: peau, Ce: cerveau, Co: cœur, Os, E: estomac, Q: queue).
L'activité détectée au niveau tumoral augmente au cours du temps, alors qu'elle diminue dans tous les autres compartiments excepté la peau. Cette accumulation traduit une fixation spécifique de l'anticorps ¹²⁵I-10C6 sur sa cible, surexprimée dans la tumeur xénogreffée.

Cette analyse a été réalisée de la même manière pour les quatre anticorps anti-cCD22 marqués à l'iode-125 : leurs comportements respectifs *in vivo* sont comparables. La <u>Figure 29</u> compare la distribution au cours du temps de ces quatre anticorps en se focalisant sur quatre compartiments : la tumeur, le foie, les reins et le sang.



<u>Figure 29 :</u> Comparaison de la biodistribution des anticorps anti-cCD22 10C6, 1E3, 6B7 et 5C2 marqués à l'iode-125 à différents temps post-injection (1, 4 et 16 h).

Les quatre anticorps sont fixés de manière équivalente dans la tumeur au temps 16 h. Toutefois, le 5C2 et le 10C6 ont une cinétique de fixation dans le tissu tumoral plus rapide. Aucune différence significative n'est observée pour le foie et le sang pour les quatre anticorps, hormis le 10C6 dont le pourcentage d'activité injectée par gramme de sang est supérieur à tous les temps. La distribution dans les reins varie selon l'immunoréactivité des anticorps : le 10C6 et le 5C2, moins immunoréactifs, semblent subir une élimination rénale plus précoce que le 1E3 et le 6B7.

Au niveau tumoral, il semble que la fixation des anticorps anti-cCD22 ¹²⁵I-10C6 et ¹²⁵I-5C2 soit plus rapide que pour les autres anticorps : le pourcentage d'activité injectée par gramme est plus élevé à 4 h pour ces deux anticorps comparativement au ¹²⁵I-6B7et au ¹²⁵I-1E3. En ce qui concerne la fraction de la dose injectée accumulée dans la tumeur à 16 h, les quatre anticorps anti-cCD22 marqués à l'iode-125 présentent tous une valeur qui approche les 5%. De plus, il n'est pas observé de différence significative de l'activité fixée au niveau tumoral, que ce soit pour les anticorps internalisants ou non internalisants, notamment pour les anticorps ¹²⁵I-10C6 et ¹²⁵I-6B7 d'immunoréactivité et de K_D proches. Bien que l'immunoréactivité de l'anticorps anti-cCD22 ¹²⁵I-1E3 n'a pu être évaluée précédemment, sa biodistribution, identique à celle des autres anticorps, semble indiquer qu'il présente une immunoréactivité satisfaisante.

La distribution de l'activité injectée par gramme de foie est similaire pour tous les anticorps : il n'y a pas de fixation non spécifique au niveau hépatique.

Au niveau rénal, une différence est observée selon la valeur de l'immunoréactivité des anticorps considérés. En effet, les anticorps ¹²⁵I-10C6 et ¹²⁵I-5C2, moins immunoréactifs que le ¹²⁵I-6B7 (68% et 50% versus 83%), semblent être éliminés par voie rénale à un temps plus précoce.

La fraction d'activité injectée retrouvée dans le sang est plus élevée à tous les temps après l'injection pour l'anticorps ¹²⁵I-10C6 que pour les autres anticorps anti-cCD22 qui ont entre eux une cinétique sanguine comparable.

En confrontant l'ensemble des données obtenues jusqu'alors et portant sur les propriétés des anticorps anti-cCD22 étudiés, nous avons choisi de conserver les anticorps 10C6 et 5C2 comme candidats pour la réalisation d'une imagerie phénotypique immuno-TEP, essentiellement en raison de leur forte affinité pour le cCD22.

4. ETUDE IN VIVO DANS UN MODELE MURIN XENOGREFFE

4.1. Adaptation des anticorps anti-cCD22 pour leur utilisation en imagerie immuno-TEP/TDM

La réalisation d'une imagerie phénotypique telle que l'immuno-TEP nécessite d'utiliser un anticorps marqué avec un radioélément émetteur de positons. L'iode-125 ne possède pas cette caractéristique, et les anticorps marqués avec ce radioélément ne sont pas utilisables pour une imagerie TEP. Parmi les radioéléments à notre disposition, notre choix s'est porté sur le cuivre-64 : sa période (12 h) est compatible avec son utilisation en imagerie TEP dans le cadre d'un marquage d'anticorps complets et ARRONAX, le cyclotron situé à Saint-Herblain, est déjà fournisseur du laboratoire d'accueil.

Le marquage d'un anticorps avec du cuivre-64 nécessite au préalable de coupler la protéine avec un agent chélateur pour lequel les métaux possèdent une très forte affinité.

4.1.1. Couplage des anticorps anti-cCD22 5C2 et 10C6 au DOTA (avec résultats du nombre de ligands)

Ainsi que précédemment expliqué, il est nécessaire de coupler les anticorps anti-cCD22 à un agent chélateur de métaux, dont le cycle azoté pourra accueillir les radioéléments choisis, à la fois pour

l'imagerie phénotypique (indium-111 pour l'immuno-SPECT, cuivre-64 pour l'immuno-TEP) et la RIT (yttrium-90 et lutétium-177).

Le choix s'est porté sur le DOTA. L'agent chélateur p-SCN-Bn-DOTA se fixe de manière covalente sur les anticorps grâce à ses groupements fonctionnels isothiocyanate (-NCS).

Les anticorps anti-cCD22 10C6 et 5C2 sont couplés avec le DOTA selon la technique décrite dans le paragraphe 5.2.1.1. du Chapitre MATERIELS ET METHODES. Au cours de cette réaction chimique de couplage, une ou plusieurs molécules de DOTA peuvent se fixer sur l'anticorps concerné. Il est important de connaitre le nombre de DOTA fixé par anticorps, notamment pour expliquer l'activité spécifique de l'anticorps-DOTA après marquage avec un radioélément.

La détermination du nombre de DOTA fixés par anticorps se fait à l'aide d'un test à l'indium (mélange d'indium froid et d'indium-111 à l'état de traces) et se base sur une chromatographie sur couche mince. Le rendement de cette chromatographie renseigne de manière quantitative sur le nombre de DOTA fixés par molécule de la protéine couplée. La <u>Figure 30</u> illustre les rendements de la chromatographie sur couche mince réalisée pour les anticorps DOTA-10C6 et DOTA-5C2.



<u>Figure 30</u> : Résultats de l'iTLC-SG des anticorps 5C2 et 10C6 couplés au DOTA (à gauche) et représentation des rendements de cette chromatographie sur couche mince associés (à droite).

Le radiomarquage des anticorps couplés au DOTA est réalisé à différents rapports d'équivalents indium/anticorps. Les valeurs « rendement de marquage x nombre d'équivalents indium » augmentent jusqu'à atteindre une valeur maximale pour les concentrations contenant le plus grand nombre d'équivalents indium. L'indium est alors en condition saturante par rapport au DOTA et à ces concentrations saturantes, la valeur « rendement de marquage x nombre d'équivalents indium » renseigne sur le nombre de DOTA fixé par anticorps.

D'après nos résultats, l'anticorps DOTA-5C2 dispose de 2,2 molécules de DOTA pouvant accueillir un radioélément, tandis que l'anticorps DOTA-10C6 ne dispose que de une molécule de DOTA.

4.1.2. Immunoréactivité des anticorps anti-cCD22 DOTA-5C2 et DOTA-10C6

Une fois le nombre de DOTA fixés sur chaque anticorps connu, il est indispensable de vérifier que les anticorps couplés sont encore capables de reconnaitre leur cible : en effet, il n'est pas exclu qu'un ou plusieurs DOTA se fixent au niveau du site de reconnaissance de l'antigène de l'anticorps.

Les activités spécifiques des anticorps radiomarqués à l'indium-111 disponible étant faibles, il n'est pas possible de travailler en excès d'antigènes avec un signal détectable au compteur gamma. Il a été choisi d'explorer l'affinité relative des anticorps DOTA-5C2 et DOTA-10C6 par une étude de cytométrie en flux. L'ensemble de l'étude a été réalisé en parallèle sur ces mêmes anticorps nus. Les affinités relatives des anticorps couplés au DOTA seront notées K_{Ddota} , celle des anticorps nus K_D . Les résultats sont présentés dans le <u>Tableau 23</u> : le ratio K_D / K_{Ddota} renseigne sur la perte d'immunoréactivité des anticorps après couplage au DOTA.

Cette étude de cytométrie en flux montre que l'affinité de l'anticorps anti-cCD22 10C6 n'est pas modifiée après couplage au DOTA, alors que l'anticorps 5C2-DOTA a perdu 38% d'immunoréactivité lors de ce couplage.

	10C6	DOTA-10C6	5C2	DOTA-5C2
Bmax	213,9	205,1	208	209,3
K_D (mol.L ⁻¹)	2,19.10 ⁻¹⁰	2,20.10-10	2,44.10 ⁻¹⁰	3,95.10 ⁻¹⁰
K _D / K _{Ddota}	1		0,0	62

Tableau 23 : Evaluation de la perte d'immunoréactivité après couplage des anticorps au DOTA.

4.1.3. Marquage des anticorps DOTA-5C2 et DOTA-10C6 au cuivre-64

Nous venons de déterminer le nombre DOTA fixés sur chaque anticorps anti-cCD22 DOTA-5C2 et DOTA-10C6 : les molécules de DOTA vont chélater les métaux avec lesquels ils seront mis en contact. C'est sur cette affinité naturelle existant entre les métaux et le DOTA que repose le marquage des anticorps anti-cCD22-DOTA avec du cuivre-64.

200 μg d'anticorps DOTA-5C2 et DOTA-10C6 ont été marqués avec 50 MBq de cuivre-64 par la société ARRONAX. Les caractéristiques du marquage sont résumées dans le <u>Tableau 24</u>.

Anticorps	⁶⁴ Cu-DOTA-10C6	⁶⁴ Cu-DOTA-5C2
Rendement de marquage (%)	94,5	98,5
Activité totale (dans 600 μL) (MBq)	36	39
Activité volumique (MBq.mL ⁻¹)	60	65
Activité spécifique (MBq.mg ⁻¹)	216	229

<u>Tableau 24 :</u> Caractéristiques du marquage au cuivre-64 des anticorps anti-cCD22 **DOTA-10C6** et DOTA-5C2 par ARRONAX.

L'activité spécifique d'un anticorps correspond à l'activité totale rapportée à la masse d'anticorps marqué : l'activité spécifique de l'anticorps DOTA-5C2 est supérieure à celle du DOTA-10C6 , ce qui est cohérent avec le nombre de DOTA par anticorps supérieur pour le 5C2 par rapport au 10C6.

A l'issue du couplage au DOTA et du marquage au cuivre-64, il n'a pas été possible de déterminer l'immunoréactivité des anticorps anti-cCD22 ⁶⁴Cu-DOTA-10C6 et ⁶⁴Cu-DOTA-5C2 : la totalité des solutions de marquage a été utilisée pour la réalisation de l'imagerie immuno-TEP.

4.2. Etude du comportement *in vivo* des anticorps ⁶⁴Cu-DOTA-10C6 et ⁶⁴Cu-DOTA-5C2

Suite aux divers travaux menés pour caractériser les anticorps anti-cCD22 produits par le laboratoire d'accueil sur le plan biochimique et fonctionnel, combinés aux résultats obtenus dans l'étude de biodistribution, une imagerie immuno-TEP/TDM suivie d'une étude de biodistribution avec prélèvement d'organes a été réalisée à l'aide de deux anticorps anti-cCD22 adaptés pour cette technologie : il s'agit du ⁶⁴Cu-DOTA-10C6 et ⁶⁴Cu-DOTA-5C2.

Quatre souris « NMRI-nu » ont été xénogreffées avec la lignée CLBL-1 dix-huit jours auparavant. Deux d'entre elles ont reçu une injection de 10 MBq d'anticorps ⁶⁴Cu-DOTA-10C6, et les deux autres ont reçu une injection de près de 10 MBq d'anticorps ⁶⁴Cu-DOTA-5C2. Le <u>Tableau 25</u> résume les quantités d'anticorps injectées pour chaque animal.

Anticorps	10C6-DOTA- ⁶⁴ Cuivre	5C2-DOTA- ⁶⁴ Cuivre
Activité injectée (MBq)	10,8	9,7
Quantité d'anticorps injectée (µg)	49,8	42,5

<u>Tableau 25 :</u> Activité et quantité d'anticorps anti-cCD22 couplé au DOTA et marqué au cuivre-64 injectées dans chacune des souris.

4.2.1. Imagerie immuno-TEP/TDM

L'imagerie phénotypique est réalisée à 4 h et 16 h post-injection. Pour chaque image, la représentation graphique de l'intensité du signal est réglée de manière à ne pas observer de saturation du signal : il est alors possible de dire si le contraste entre le signal de la tumeur et le signal du reste de l'organisme permet la localisation de la tumeur.

Les souris 1 et 2 ont reçu une injection de ⁶⁴Cu-DOTA-5C2 à T0 et les souris 3 et 4 ont reçu une injection de ⁶⁴Cu-DOTA-10C6 à T0 + 30 minutes : ce décalage temporel associé aux variations de l'activité spécifique explique les différences de quantité d'anticorps injectée. Les acquisitions TEP/TDM sont réalisées successivement sur une durée totale de 30 minutes sur deux souris à la fois au temps 4 h, et animal par animal au temps 16 h comme illustré dans la <u>Figure 31</u>.

Au temps 4 h post-injection des deux anticorps anti-cCD22 ⁶⁴Cu-DOTA-10C6 et ⁶⁴Cu-DOTA-5C2, le signal d'activité au niveau de la tumeur est inférieur à celui observé dans le système vasculaire des animaux, ainsi qu'au niveau hépatique. Au temps 16 h post-injection, le contraste entre le signal de la tumeur et celui du reste des organes (notamment le foie et les vaisseaux sanguins) est bien meilleur. Les images de la <u>Figure 32</u> correspondent aux acquisitions TDM et TEP d'une souris réalisée à l'aide de la μTEP/TDM Inveon d'Oniris 16 h après l'injection de l'anticorps ⁶⁴Cu-DOTA-10C6 : il s'agit de coupes longitudinales passant par la tumeur, localisée sur le flanc gauche de l'animal.



<u>Figure 31 :</u> µTEP/TDM Inveon d'Oniris et dispositif d'installation des animaux ayant permis la réalisation des imageries phénotypiques.



<u>Figure 32</u>: Validation du ciblage tumoral dans un modèle murin avec l'anticorps ⁶⁴Cu-DOTA-10C6 au temps 16 h post-injection (coupe longitudinale).

Des souris nude ont été xénogreffées avec des cellules de la lignée CLBL-1 au niveau du flanc gauche. L'image de gauche correspond à l'acquisition TDM et l'image de droite à l'acquisition TEP.

4.2.2. Etude de biodistribution

Au temps 16 h post-injection, une étude de distribution de la dose injectée a été réalisée et les résultats sont présentés dans la <u>Figure 33</u> : les comportements des deux anticorps anti-cCD22 étudiés sont similaires. La fraction de dose contenue dans la tumeur des souris ayant reçu l'injection de l'anticorps ⁶⁴Cu-DOTA-5C2 est légèrement inférieure à celle contenue dans la tumeur des souris ayant reçu l'injection de l'anticorps ⁶⁴Cu-DOTA-10C6.



<u>Figure 33 :</u> Distribution dans les organes au temps 16 h post-injection de la dose injectée (10 MBq) d'anticorps anti-cCD22-DOTA-⁶⁴Cuivre.

(T : tumeur, Sg : sang, F : foie, Re : reins, I : intestins, Po : poumons, M : muscles, Rat : rate, Pe : peau, Ce : cerveau, Co : cœur, Os, E : estomac, Q : queue).

Les résultats de cette étude de biodistribution sont en accord avec ceux de l'étude précédente, réalisée avec les anticorps anti-cCD22 marqués à l'iode-125 : la fixation des anticorps au niveau de la tumeur approche les 5% au temps tardif 16 h. Cependant, le foie contient une fraction de la dose injectée plus élevée : cette observation est à mettre en relation avec le métabolisme du cuivre, dont l'élimination se fait principalement par excrétion biliaire.

L'anticorps anti-cCD22 ⁶⁴Cu-DOTA-10C6 semble s'accumuler de manière plus intense au niveau de la tumeur que le ⁶⁴Cu-DOTA-5C2. Il serait nécessaire de confirmer ces résultats préliminaires sur un plus grand nombre d'animaux afin d'obtenir des différences significatives d'un point de vue statistique.

Partie B. MISE EN PLACE D'UN ESSAI PRECLINIQUE MULTICENTRIQUE D'IMAGERIE PHENOTYPIQUE ET DE RADIOIMMUNOTHERAPIE CHEZ LES CHIENS SPONTANEMENT ATTEINTS DE LYMPHOMES B AGRESSIFS

1. CONTEXTE DE LA MISE EN PLACE DE CET ESSAI PRECLINIQUE CHEZ L'ANIMAL SPONTANEMENT MALADE

1.1. Besoin de la recherche clinique chez l'Homme

Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) représentent la septième cause de décès par cancer en France et les DLBCL, qui représentent 40% des LNH de l'Homme, constituent le variant le plus agressif. L'utilisation d'anticorps monoclonaux sous forme native ou associés à des isotopes radioactifs a montré son efficacité pour améliorer le diagnostic des masses tumorales de petite taille grâce à l'imagerie phénotypique, ainsi que la survie des patients grâce à la radioimmunothérapie (Strohl WR, 2018). Une recherche clinique demeure nécessaire afin de préciser le positionnement de la RIT seule ou en consolidation de la chimiothérapie en première ligne de traitement et d'optimiser les méthodes d'imagerie phénotypique.

Pour aborder ces questions au niveau préclinique, les modèles de tumeurs xénogéniques chez la souris sont limitants et peu de modèles syngéniques sont disponibles. Le lymphome B à point de départ centrofolliculaire du chien, hémopathie maligne la plus fréquente dans cette espèce, présente une grande homologie clinique et anatomopathologique avec le DLBCL de l'Homme (Ponce F. *et al.*, 2010 ; Valli VE. *et al.*, 2011 ; Fourel J., 2013 ; Nguyen F. *et al.*, 2013 ; Nguyen F. *et al.*, 2015). Le modèle de lymphome spontané canin offre ainsi l'opportunité d'aborder les questions spécifiques qui restent en suspens en clinique humaine : les caméras d'imagerie utilisées chez les grands animaux sont les mêmes que celles utilisées en médecine humaine, et le suivi médical d'un chien spontanément malade s'apparente à celui d'un patient humain.

Dans cet essai vétérinaire à visée préclinique, il a été décidé de réaliser, après une étape de cytoréduction par injection intramusculaire de L-asparaginase (KIDROLASE®), une série de quatre imageries phénotypiques TEMP/TDM réparties sur une période de 7 jours suivant l'injection de l'anticorps monoclonal anti-cCD22 ¹¹¹In-DOTA-10C6 suivie d'une radioimmunothérapie deux semaines plus tard avec le même anticorps marqué à l'yttrium-90.

Concernant l'aspect imagerie, l'objectif est de réaliser une approche de pharmacocinétique de population, ce qui est actuellement difficile en médecine humaine : l'étape d'imagerie phénotypique n'est souvent réalisée que pour les premiers patients inclus dans les essais de phase I afin de valider le ciblage tumoral mais également afin d'établir le profil pharmacocinétique et dosimétrique du radioconjugé. Après l'administration, les patients font l'objet d'imageries TEMP/TDM (ou TEP/TDM) pour visualiser la biodistribution du radioconjugué : un nombre minimal de quatre acquisitions est nécessaire pour garantir la fiabilité des résultats obtenus. Cependant, il arrive que le nombre d'images soit limité à trois. Le principe de la pharmacocinétique de population est d'obtenir des imageries TEMP/TDM (ou TEP/TDM) faiblement espacées dans le temps (entre dix et vingt points-temps sur une période de sept jours) en regroupant les données obtenues chez plusieurs patients ayant fait l'objet de quatre acquisitions seulement. Ce travail doit permettre de déterminer un nombre minimal d'acquisitions d'imagerie phénotypique à programmer par patient afin de pouvoir estimer les doses déposées aux organes et à la tumeur, ainsi que pour ajuster l'activité injectée lors de la phase thérapeutique (radioimmunothérapie) : l'intérêt est de garantir une efficacité tumorale maximale tout en prévenant les toxicités individuelles.

Du point de vue du traitement proprement dit, nous nous sommes fixés deux autres objectifs. Le premier est de déterminer la dose maximale tolérée (DMT) de ⁹⁰Y-DOTA-10C6 chez le chien spontanément atteint de DLBC par une étude d'escalade de dose. En effet, il n'existe pas de données concernant ce point dans la littérature, la radiothérapie interne vectorisée n'étant pas une approche thérapeutique développée pour une application en médecine vétérinaire pour le moment. Le deuxième objectif est d'évaluer l'efficacité thérapeutique d'une radioimmunothérapie anti-CD22 positionnée précocement dans la prise en charge d'un individu malade, qu'il s'agisse d'un homme ou d'un chien. Cette information est difficile à obtenir chez l'Homme car il est d'abord proposé aux patients les traitements ayant déjà démontré leur efficacité dans les cas de DLBCL (gold standard), sous peine de se placer dans un contexte de possible « perte de chance » pour les personnes enrôlées. Cet état de fait amène à inclure dans les essais cliniques des patients réfractaires aux thérapeutiques habituelles, ou en rechute, ayant déjà bénéficié de plusieurs lignes de traitement : les résultats obtenus, même s'ils sont encourageants, ne peuvent refléter ce qu'il en serait en proposant ces thérapies innovantes à des patients naïfs de tout traitement. Le modèle spontané canin peut permettre de répondre à ces questions, la prise en charge des animaux malades ne pouvant pas toujours bénéficier d'un « gold standard » thérapeutique et étant majoritairement tributaire des moyens financiers des propriétaires. Les animaux inclus appartiendront à deux catégories de patients : un groupe d'animaux naïfs de tout traitement vis à vis de leur DLBCL (inclusion immédiatement après l'établissement du diagnostic) et un groupe d'animaux en rechute après une première ligne de traitement par chimiothérapie. Si nous pouvons établir une preuve de concept concernant l'intérêt de positionner la RIT anti-cCD22 précocement dans la prise en charge thérapeutique de ces animaux, nous espérons pouvoir poursuivre cet essai préclinique sur une quinzaine d'animaux après établissement de la DMT de ⁹⁰Y-DOTA-10C6 et ainsi favoriser la recherche clinique chez l'Homme. Le synopsis du protocole de cet essai clinique figure en <u>Annexe 1</u>.

1.2. Contexte juridique

Actuellement, en France, la recherche clinique réalisée chez l'animal de compagnie, de sport et loisir ou encore de production ne bénéficie pas du cadre réglementaire qui s'applique à la recherche préclinique encore connue sous le terme d'expérimentation animale. Il n'est donc pas exigé qu'une saisine soit évaluée par un comité d'éthique pour pouvoir réaliser des travaux de recherche et les porter à la connaissance de la communauté scientifique.

De même, la recherche clinique dont il est question dans ce travail ne correspond pas à un essai clinique de médicament vétérinaire avec pour objectif l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM). Il n'est donc pas nécessaire de soumettre à l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) une déclaration de mise en place d'un essai clinique.

Toutefois, afin de se placer dans un contexte éthiquement acceptable, il a été décidé de prendre exemple sur ce qui est fait dans le cadre de la recherche clinique chez l'Homme, avec notamment la soumission d'une demande d'avis préalable à un comité de protection des personnes (CPP) lorsqu'il est souhaité qu'une recherche impliquant la personne humaine soit menée. Les CPP se prononcent sur les conditions dans lesquelles le promoteur de la recherche (personne physique ou morale qui prend l'initiative de la recherche) assure la protection des personnes et notamment des participants, sur le bien-fondé et la pertinence du projet de recherche et sur sa qualité méthodologique. L'avis favorable d'un CPP est indispensable pour pouvoir commencer une recherche clinique.

Une saisine a été soumise au Comité d'Ethique pour la Recherche clinique Vétérinaire d'Oniris (CERVO) et dont la mission est d'évaluer un projet de recherche clinique vétérinaire sur le plan éthique. Le dossier soumis pour accréditation par le CERVO doit inclure une lettre d'information ainsi qu'un document de « consentement éclairé » à destination du ou des propriétaire(s) des animaux et qui devront être signés et paraphés par le(s) propriétaire(s). Ces documents ont été rédigés en prenant appui sur des lettres d'informations et des consentements éclairés utilisés dans le cadre d'essai clinique de médecine nucléaire réalisés chez l'Homme : ils figurent dans les <u>Annexe 2</u> et <u>Annexe 3</u> de ce manuscrit.

Le CERVO a donné un avis favorable à la réalisation de l'essai clinique intitulé « étude préclinique prospective multicentrique de ciblage de l'antigène CD22 canin pour l'imagerie phénotypique (immuno-TEMP) suivie de radioimmunothérapie (RIT) chez les chiens spontanément atteints de lymphome B » et lui a délivré le numéro CERVO-2016-21-V.

1.3. Etat des lieux de la médecine nucléaire dans la pratique vétérinaire en France

La médecine nucléaire est une discipline apparue dans les années 1970 au sein de certains établissements d'enseignement vétérinaire d'Amérique du Nord et de l'Europe. Elle est aujourd'hui peu développée en médecine des animaux de compagnie en France, en raison des difficultés logistiques et réglementaires qui entourent la manipulation des radioéléments, ainsi que leur coût et celui des équipements nécessaires. A l'heure actuelle, les centres de médecine nucléaire sont encore réservés aux établissement d'enseignement vétérinaire et à quelques centres spécialisés.

La technique d'imagerie la plus répandue est la scintigraphie, notamment dans le milieu équin. Chez les carnivores domestiques, la scintigraphie est surtout utilisées dans le diagnostic des affections thyroïdiennes, des shunts porto-systémiques, des affections osseuses, des thromboembolies pulmonaires et des atteintes de l'encéphale. Cet examen peut également être utile dans l'exploration fonctionnelle rénale, cardiaque et la recherche de nœuds lymphatiques sentinelles dans certains cas de cancers. En France, seulement trois structures sont équipées d'une gamma-caméra planaire à usage vétérinaire pour les animaux de compagnie, parmi lesquelles figure Oniris (école nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation, à Nantes). Concernant l'imagerie tridimensionnelle, Oniris et la clinique MICEN VET (Créteil) disposent également d'une gamma-caméra permettant de faire de la TEMP et de réaliser des images tomographiques corps entier après injection d'un radiopharmaceutique avec une meilleure définition que les gamma-caméras planaires bidimensionnelles. Par ailleurs, certaines machines sont couplées à un scanner (c'est le cas à Oniris) donnant accès à une localisation anatomique plus précise des points de fixation de la radioactivité. Les imageries de type TEMP/TDM sont utilisées pour les mêmes indications que celles citées pour la scintigraphie. Aujourd'hui, aucune structure vétérinaire n'est équipée d'une machine TEP en état de fonctionnement.

Concernant le versant thérapie de la médecine nucléaire, peu d'affections sont actuellement prises en charge par radiothérapie métabolique. Seule la clinique MICEN VET propose un traitement à l'iode-131 lors d'atteinte thyroïdienne.

Pour mener cet essai clinique d'imagerie phénotypique et de radioimmunothérapie anticCD22 chez le chien spontanément atteint de DLBCL, il a été décidé d'associer au projet le Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV) d'Oniris et la clinique vétérinaire MICEN VET, afin de réaliser une étude multicentrique. Les deux centres sont équipées d'une TEMP/TDM, d'un laboratoire permettant la manipulation d'éléments radioactifs et d'une animalerie radioprotégée afin d'assurer l'hébergement des animaux pris en charge.

1.4. Contraintes supplémentaires à ce qui est fait chez l'Homme

Chez l'Homme, les études cliniques de médecine nucléaire sont le plus souvent réalisées en ambulatoire avec des patients conscients toute la durée des procédures. Chez l'animal, les conditions de travail sont différentes et des contraintes supplémentaires sont à prendre en compte dans la mise en place d'un essai clinique d'imagerie phénotypique et de radioimmunothérapie. Ces contraintes sont détaillées ci-dessous.

1.4.1. Radioprotection

L'inclusion de chiens de compagnie dans un essai clinique de médecine nucléaire pose la question de l'exposition des propriétaires, et plus largement des personnes côtoyant quotidiennement l'animal, aux rayonnements ionisants émis du corps de l'animal. Actuellement, il n'existe pas de réglementation spécifique concernant l'utilisation d'un radiopharmaceutique en médecine vétérinaire : la réglementation est identique à celle de la médecine humaine et figure dans le code de la santé publique (protection de l'environnement et de la population) et le

code du travail (protection des travailleurs). Cette réglementation est floue et ne stipule de règles précises que pour l'administration d'iode-131, les autres radioéléments n'étant pas mentionnés.

Le principal problème, en médecine vétérinaire, concerne les selles et les urines émises par cet animal dans l'environnement, problème ne concernant pas les Hommes, ces derniers utilisant des toilettes. Afin d'éviter la dispersion de matières radioactives dans l'environnement, une période d'hospitalisation en animalerie radioprotégée suit l'administration d'un radiopharmaceutique chez l'animal. La durée de cette hospitalisation après injection de ¹¹¹In-DOTA-10C6 et de ⁹⁰Y-DOTA-10C6 a été fixée dans le cas de notre étude à 4 jours, durée pendant laquelle les urines et les selles des animaux sont placées dans des poubelles plombées en attente de décroissance. Lors de leur retour au domicile des propriétaires, il est conseillé à ces derniers d'éviter de promener leurs animaux dans des lieux publics, de favoriser l'émission des selles et des urines au niveau des grilles d'évacuation des caniveaux ainsi que de porter des gants s'ils doivent ramasser les déjections de leur animal et nettoyer le sol.

L'animal lui-même est également une source de rayonnements ionisants pour son entourage et la durée d'hospitalisation de 4 jours a également pour objectif de réduire l'exposition des propriétaires. En médecine humaine, les patients recevant une injection d'indium-111 (111 à 185 MBq) en vue d'une imagerie phénotypique repartent chez eux après l'acquisition TEMP/TDM sans précaution particulière à respecter (débit de dose mesuré à 1 m estimé inférieur à 15 μ Sv.h⁻¹ après injection d'une activité de 240 MBq) (Fiche radioprotection ED4242 de l'INRS, mars 2006). Il en est de même après une injection d'un radiopharmaceutique marqué à l'yttrium-90 (débit de dose à 1 m proche du bruit de fond). Dans notre étude, nous avons choisi de prendre comme référence les données connues lors de radiothérapie internes des cancers thyroïdiens à l'iode-131 : les patients sont autorisés à regagner leur domicile si le débit de dose à 1 m est inférieur à 40 μSv.h⁻¹ (Prost A. *et al.*, 2017). Ainsi le débit de dose à 1 m est mesuré pour chaque animal quelques heures avant son retour à domicile : les données obtenues chez les chiens d'expérimentation et les chiens de compagnie spontanément malades ayant reçu une injection de ¹¹¹In-DOTA-10C6 ont toujours été en-deçà de cette valeur. Il est toutefois recommandé aux propriétaires d'éviter les contacts entre leurs animaux et des personnes particulièrement sensibles aux rayonnements ionisants, telles que les femmes enceintes et les enfants, ainsi que de dormir avec leur animal (partage du lit).

1.4.2. Anesthésies générales répétées

Une contrainte supplémentaire doit être prise en compte lors de la prise en charge d'un animal inclus dans notre étude pour l'injection des radiopharmaceutiques ainsi que pour la réalisation des acquisitions TEMP/TDM. En médecine humaine, les patients peuvent rester immobiles pendant toute la durée de l'acquisition des images (injections et imageries), tandis qu'en médecine vétérinaire il est nécessaire d'anesthésier les animaux.

L'anesthésie générale des chiens pratiquée en vue de l'injection des radiopharmaceutiques a pour objectif la radioprotection des personnels intervenant pour prendre en charge l'animal. Une fois anesthésié, l'animal est placé en décubitus ventral et plusieurs paramètres sont surveillés (fréquence respiratoire, courbe respiratoire, pression partielle en CO_2 de l'air expiré, fréquence cardiaque, électrocardiogramme, pression artérielle, température rectale, taux d'oxygénation du sang). L'injection du radiopharmaceutique se faisant à l'aide d'un pousse-seringue protégé par des écrans plombés, le monitoring décrit ci-dessus permet à l'anesthésiste de surveiller l'animal à distance et de n'être soumis qu'à un débit de dose égal au bruit de fond. Lorsque l'état de l'animal nécessite une intervention d'un vétérinaire, celle-ci doit se faire en respectant autant que possible les règles de radioprotection en lien avec le radioélément injecté et est grandement favorisée par l'immobilité de l'animal (il n'est pas nécessaire par exemple d'attribuer une personne à la contention rapprochée de l'animal).

L'anesthésie générale des chiens pratiquée en vue de la réalisation des acquisitions TEMP/TDM assure l'immobilité des animaux dans le lit de la machine et favorise leur bon positionnement (respect de la symétrie notamment).

Ainsi, pour résumer, chaque animal inclus dans l'essai clinique est anesthésié quatre fois lors de la phase d'imagerie phénotypique et une fois lors de la phase de radioimmunothérapie. A ces anesthésies générales doivent également être ajoutées la sédanalgésie pratiquée pour la réalisation de la biopsie diagnostique et le myélogramme, complétés si nécessaire par des cytoponctions spléniques et des biopsies hépatiques. Toutes ces procédures sont réalisées sur des animaux à jeun depuis 8 h. Seuls des animaux en bon état général ou pour lesquels une amélioration de leur état est raisonnablement attendue après la phase de cytoréduction (injection de L-asparaginase) peuvent donc être inclus dans l'étude. Il est également important d'adapter leur alimentation sur toute la période encadrant les anesthésies nécessaires aux acquisitions TEMP/TDM en fractionnant les rations et en favorisant une alimentation molle ou humide : l'objectif est de favoriser la digestion et de réduire les périodes de jeûne.

Les critères d'inclusion détaillés dans le résumé du protocole présenté en <u>Annexe 1</u> tiennent compte de la nécessité de pouvoir pratiquer plusieurs anesthésies sur une durée restreinte (index de Karnofsky modifié pour les chiens, valeurs biochimiques et hématologiques).

2. MISE AU POINT D'OUTILS POUR SE PLACER AU NIVEAU D'EXIGENCE DES ESSAIS CLINIQUES MENES CHEZ L'HOMME

2.1. Détection d'anticorps canins anti-10C6

Lors de la mise en place d'étude clinique chez l'Homme reposant sur l'utilisation répétée ou non d'anticorps administrés par voie intraveineuse, une recherche d'anticorps canins antianticorps murin (ACAM) est proposée. En effet, la présence d'ACAM peut modifier la biodistribution des anticorps injectés qui forment alors, avec les ACAM, des complexes immuns circulants. Ces derniers sont éliminés par le foie, diminuant ainsi les doses déposées aux foyers tumoraux.

Dans notre étude, deux injections d'anticorps murins sont envisagées, à deux semaines d'intervalle : il est peu probable que les animaux inclus aient le temps de développer une réponse immunitaire en si peu de temps avec pour conséquence une modification de la biodistribution du ⁹⁰Y-DOTA-10C6 par rapport à l'étude qui aura été réalisée après l'injection du ¹¹¹In-DOTA-10C6. De plus, les animaux inclus seront porteurs d'un DLBCL, affection immunodéprimante, et seront moins à même de développer une réponse immunitaire en comparaison de ce qui pourrait être observé chez des animaux avec un système immunitaire compétent.

Chez l'Homme, une immunisation est mise en évidence si la concentration sérique en d'anticorps réactionnels est supérieure à 50 ng.mL⁻¹. Dans notre étude, nous avons développé un test ELISA indirect permettant de suivre la cinétique d'apparition de ces anticorps pendant les mois suivant une injection unique de l'anticorps ¹¹¹In-DOTA-10C6 chez les chiens sains d'expérimentation et chez les chiens atteints de DLBCL.

2.1.1. Résultats chez les chiens sains

Cinq chiens d'expérimentation ont reçu une unique injection de ¹¹¹In-DOTA-10C6 : trois chiens (BAC.ALI, NIA.ALI et NOR.ALI) ont reçu 1,5 mg.kg⁻¹ d'anticorps et deux chiens (DAI.ALI et DOR.ALI) n'ont reçu que 750 µg d'anticorps par voie intraveineuse.

Le premier chien (BAC.ALI), après avoir reçu 1,5 mg.kg⁻¹ d'anticorps, a ensuite suivi un an plus tard un protocole d'immunisation par voie sous-cutanée afin de disposer d'un témoin positif. Le <u>Tableau 26</u> récapitule les dates de prélèvements sanguins pour chacun de ces cinq chiens.

Animal	JO	M1	M2	M3	M6
BAC.ALI	Х	Х			Х
NIA.ALI	Х	Х	Х	Х	
NOR.ALI	Х	Х	Х	Х	
DAI.ALI	Х		Х	Х	
DOR.ALI	Х		Х	Х	

<u>Tableau 26 :</u> Périodicité des prélèvements sériques réalisés après une injection unique de ¹¹¹In-DOTA-10C6 chez des chiens d'expérimentation sains

Un test ELISA indirect est réalisé en « tripliquette » pour chacun des sérums de chacun des chiens et à chaque date de prélèvement sanguin. L'évolution de la densité optique donnée par une lecture au spectrophotomètre renseigne sur l'apparition ou non d'anticorps canins antianticorps murins ou ACAM.



Figure 34 : Détection de la présence d'anticorps anti-10C6 dans le sérum des chiens sains ayant reçu une injection intraveineuse de 10C6 : cinétique au cours du temps du rapport de la densité optique mesurée pour chaque prélèvement par rapport à celle mesurée pour le témoin positif. L'animal BAC.ALI n'a pas développé d'anticorps anti-10C6. Les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI, ayant reçu environ 17 mg d'anticorps 10C6, présentent une réponse humorale détectable dès le trentième jour post-injection et toujours observable au bout de trois mois. Les chiennes DOR.ALI et DAI.ALI, n'ayant reçu que 750 μg d'anticorps 10C6, présentent également une réponse humorale, moins marquée toutefois et presque indétectable au bout de trois mois.

Parmi les animaux ayant reçu une grande quantité d'anticorps 10C6, seules les chiennes NIA.ALI et NOR.ALI ont développé des anticorps dirigés contre l'anticorps anti-CD22 10C6. Il s'agit d'individus jeunes (4 ans versus 13 ans pour BAC.ALI). De plus, la présence de ces anticorps circulants dans le sang est durable et toujours détectée 3 mois après le contact. Une réponse humorale est également observée chez les chiennes DAI.ALI et DOR.ALI mais dans une moindre mesure et de manière moins durable. Les résultats sont présentés dans la <u>Figure 34</u>.

2.1.2. Résultats chez les chiens malades

Deux chiens spontanément atteints de DLBCL ont reçu une unique injection de ¹¹¹In-DOTA-10C6 : un chien (AMI.NIC) a reçu 1,5 mg.kg⁻¹ d'anticorps et un chien (FAX.FRE) a reçu 750 µg d'anticorps par voie intraveineuse.

Le <u>Tableau 27</u> récapitule les dates de prélèvements sanguins pour chacun de ces deux chiens.

Animal	JO	M1	M2	M3	M6
AMI.NIC	Х	Х			
FAX.FRE	Х		Х		

<u>Tableau 27 :</u> Périodicité des prélèvements sériques réalisés après une injection unique de ¹¹¹In-DOTA-10C6 chez des chiens spontanément atteints de DLBCL.

Un test ELISA indirect est réalisé en « tripliquette » comme pour les chiens sains.

Les deux chiens atteints de lymphome B diffus à grandes cellules n'ont pas développé d'immunité humorale dirigée contre l'anticorps murin 10C6, quelle que soit la quantité d'anticorps 10C6 administrée par voie intraveineuse. Les résultats sont présentés dans la <u>Figure 35</u>.



<u>Figure 35 :</u> Détection de la présence d'anticorps anti-10C6 dans le sérum des chiens atteints de DLBCL ayant reçu une injection intraveineuse de 10C6 : cinétique au cours du temps du rapport de la densité optique mesurée pour chaque prélèvement par rapport à celle mesurée pour le témoin positif.

Quelle que soit la quantité d'anticorps murin 10C6 administrée, aucun de deux animaux n'a développé d'immunité humorale dirigée contre l'antigène 10C6.

2.2. Radiomarquages à l'indium-111 et à l'yttrium-90 à l'APUI

Afin de se placer dans des conditions de radiomarquage et de radioprotection identiques à ce qui est observé dans les études cliniques de médecine nucléaire chez l'Homme, une collaboration a été initiée avec l'Annexe de la Pharmacie à Usage Interne (APUI) et le cyclotron ARRONAX, à Saint-Herblain (44). Cette collaboration présente également un intérêt pour la radioprotection des personnes réalisant les radiomarquages. En effet, les radiomarquages manuels effectués à Oniris sont accompagnés d'une exposition du personnel supérieure à ce qui est observé à ARRONAX où le radiomarquage s'effectue dans un automate.

L'intérêt de cette collaboration est également de standardiser le radiomarquage de l'anticorps DOTA-10C6 à l'indium-111 et à l'yttrium-90, en se plaçant dans des conditions optimales de rendement de marquage et de stérilité du radiopharmaceutique. Le radiopharmaceutique est également l'objet d'un contrôle de qualité systématique dont les résultats figurent sur un certificat d'analyse (aspect macroscopique, pH, activité, pureté radiochimique déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance ou HPLC, volume final, concentration en anticorps, activité spécifique et activité volumique) avant d'être mis à la disposition du transporteur à destination d'Oniris ou de MICEN VET.

Ainsi, tous les radiomarquages de l'anticorps DOTA-10C6 sont réalisés par l'APUI. 1,5 mg d'anticorps DOTA-10C6 sont incubés avec 250 MBq d'indium-111 à 40°C pendant 30 minutes. En sortie de l'automate, le flacon du radiopharmaceutique contient une solution d'¹¹¹In-DOTA-10C6 en tampon acétate de sodium 0,1 M, pH = 5. Le volume final, la concentration en anticorps, la pureté radiochimique, l'activité spécifique et l'activité volumique sont déterminés sur place avant enlèvement par un transporteur accrédité pour les produits radioactifs, à destination d'Oniris. Les résultats des deux radiomarquages réalisés à ARRONAX, très similaires entre eux, figurent dans le <u>Tableau 28</u>.

	Radiosynthèse 1	Radiosynthèse 2
Volume final (mL)	4,6	4,3
Concentration en anticorps (µg.mL-1)	325	337
Pureté radiochimique (%)	87	87,6
Activité dans le flacon à 12:00 (MBq)	175	165
Activité spécifique (MBq.mg ^{.1})	117	113,8
Activité volumique (MBq.mL ^{.1})	38	38,4

<u>Tableau 28 :</u> Caractéristiques des produits finaux issus des radiosynthèses du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 réalisées à ARRONAX.

La pureté radiochimique est de 87% et l'activité spécifique varie entre 114 et 117 MBq.mg⁻¹, ce qui rend les lots conformes pour une utilisation chez l'animal.

La pureté radiochimique des produits finaux est déterminée par deux méthodes en parallèle : une analyse par HPLC et une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM). La chromatographie sur couche mince est une technique de chromatographie planaire dont la phase liquide est mobile et entraine les composés du mélange étudié à se séparer le long de la phase stationnaire, matérialisée par une couche mince de matériel absorbant. La chromatographie liquide à haute pression est plus performante et permet une meilleure séparation grâce à la fine granulométrie de la phase stationnaire au sein de laquelle l'éluant (ou phase mobile) s'écoule à un débit élevé. La révélation se fait grâce à un détecteur de radioactivité avec une plus grande résolution que la CCM.

Lors de la première radiosynthèse, le chromatogramme du produit final obtenu par la méthode HPLC montre la présence d'une impureté présente à 13% et d'environ 3% d'indium-111 non complexé, ainsi qu'indiqué dans la <u>Figure 36</u>. Ce pourcentage d'indium libre est confirmé par l'analyse par CCM (2 à 5 % selon le système d'élution). L'impureté radiomarquée inconnue est liée à la présence d'une impureté déjà présente dans la solution d'anticorps froid DOTA-10C6 au même temps de rétention (25,5 minutes). Ce produit est retenu plus fortement sur la colonne d'exclusion stérique : il peut s'agir d'un fragment de l'anticorps avec des greffons DOTA ou de traces résiduelles de réactif DOTA utilisé pour la conjugaison de l'anticorps et absorbant à 280 nm. Ces résultats sont également concordants avec ceux obtenus lors de l'analyse de la pureté radiochimique par la méthode de chromatographie sur couche mince. Les résultats sont présentés dans la <u>Figure 37</u>.

Les résultats de l'analyse « qualité » du produit issu de la deuxième radiosynthèse sont sensiblement les mêmes.

Contrôle HPLC	Anticorps froid 10C6-DOTA						
Date/Heure		Le 20/03/2017 à 15h05					
Volume injecté		20 µl					
Pression		28 bars					
	Produit	Tr (min)	Aire	% Aire	W(50%)	Plateaux	
UV	10C6-DOTA	15,607	959633	86,76	0,572	4118	
	Inconnu	25,484	146392	13,24	0,528	12887	

Contrôle HPLC	111In-10C6-DOTA (fin de synthèse)					
Date/Heure		L	e 21/03/2017	à 11h01		
Volume injecté			20 µl			
Pression			28 bar			
	Produit	Tr (min)	Aire	% Aire	W(50%)	Plateaux
UV	10C6-DOTA	15,601	607794	79,16	0,580	4004
	Inconnu	25,422	159973	20,84	0,614	9513
	Produit	Tr (min)	Aire	% Aire	W(50%)	Plateaux
Dadioactivitá	¹¹¹ In-10C6-DOTA	15,708	2018556	84,99	0,587	3966
Radioactivite	Inconnu	25,858	303015	12,76	0,838	5279
	111ln ?	26,771	53540	2,25	-	-

<u>Figure 36</u> : Résultats des analyses HPLC réalisées sur l'anticorps froid DOTA-10C6 et le radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 en fin de radiomarquage, réalisées à ARRONAX. Le produit final contient 2% d'indium-111 libre non complexé, 13% d'une impureté déjà présente dans la

solution d'anticorps froid et 85% du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6.

Contrôle CCM	111In-10C6-DOTA fin de synthèse				
Date/Heure		Le 21/03/2017	7 à 11h15		
Volume déposé		3 µl			
Phase stationnaire		ITLC-S	G		
L1:	Produit	Rf	Aire	% Aire	
Phase mobile : Acide citrique 0,1 M	¹¹¹ In-10C6-DOTA	0,0	10072370	94,9	
	¹¹¹ In	0,9-1,0	543419	5,1	
L2 :	Produit	Rf	Aire	% Aire	
Phase mobile : Tampon citrate 0,1 M pH 5,0	¹¹¹ In-10C6-DOTA	0,0	10406179	96,7	
	¹¹¹ In	0,9-1,0	351513	3,3	



<u>Figure 37</u> : Résultats des analyses réalisées à ARRONAX par la méthode de CCM réalisées sur le radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 en fin de radiomarquage.

Le produit final contient 3 à 5 % d'indium-111 libre non complexé, selon la nature de la phase mobile permettant la migration.

Contrôle HPLC	111In-10C6-DOTA (t=6heures)					
Date/Heure		L	e 21/03/2017	à 16h45		
Volume injecté			20 µl			
Pression			27bar			
	Produit	Tr (min)	Aire	% Aire	W(50%)	Plateaux
UV	10C6-DOTA	15,600	618850	81,41	0,577	4051
	Inconnu	25,430	141334	18,59	0,586	10433
	Produit	Tr (min)	Aire	% Aire	W(50%)	Plateaux
Dadioactivitá	¹¹¹ In-10C6-DOTA	15,707	1964279	85.01	0,587	3963
RadioaClivite	Inconnu	25,838	282670	12,23	0,826	5426
	111ln ?	26,500	63809	2,76	-	-

Contrôle HPLC	111In-10C6-DOTA (t=24heures)						
Date/Heure		Le 22/03/2017 à 11h01					
Volume injecté			20 µl				
Pression			27bar				
	Produit	Tr (min)	Aire	% Aire	W(50%)	Plateaux	
UV	10C6-DOTA	15,693	597695	88,38	0,578	4081	
	Inconnu	25,624	78600	11,62	0,561	11572	
	Produit	Tr (min)	Aire	% Aire	W(50%)	Plateaux	
Padioactivitá	Inconnu	13,064	55203	2,86	0,611	2534	
Radioactivite	¹¹¹ In-10C6-DOTA	15,795	1609322	83,50	0,590	3977	
	Inconnu + 111In ?	26,005	262768	13,63	0,795	5922	

<u>Figure 38 :</u> Résultats des analyses HPLC réalisées à ARRONAX sur le radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 aux temps 6 h et 24 h post-production.

Aucune dégradation significative du radiopharmaceutique n'est observée après 24 h de conservation, autorisant son utilisation pour une administration à l'animal.

De plus, lors de la première radiosynthèse de ¹¹¹In-DOTA-10C6, une étude de la stabilité du radiopharmaceutique produit a été réalisée aux temps 6 et 24 h post-production. L'objectif était de déterminer s'il est envisageable de livrer le radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans d'autres centres d'investigation clinique vétérinaires le lendemain de la radiosynthèse avec une qualité du radiopharmaceutique conservée.

Les analyses HPLC effectuées 6 et 24 h après la production du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 confirment qu'il n'y a eu aucune dégradation significative du produit. L'apparition d'une impureté radiomarquée (quantité inférieure à 3%) à un temps de rétention de 13 minutes sur le radiochromatogramme réalisé à 24 h post-production n'entraine pas de dégradation significative du produit de radiosynthèse. Les résultats de ces analyses sont présentés dans la <u>Figure 38</u>.

2.3. Détermination de l'immunoréactivité du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6

A la suite du radiomarquage à l'indium-111, il est nécessaire d'évaluer l'immunoréactivité du radiopharmaceutique produit : les étapes de radiomarquage peuvent modifier l'immunoréactivité de l'anticorps froid, notamment l'étape de chauffage, influençant alors la capacité de fixation du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 sur sa cible.

Nous avons choisi de déterminer la fraction immunoréactive du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 par la technique décrite par Lindmo et son équipe (Lindmo T. *et al.*, 1984) en remplaçant les cellules exprimant l'antigène cCD22 par des billes magnétiques coatées avec du cCD22 recombinant produit au laboratoire : les anticorps sont incubés à concentration constante en excès d'antigènes présents à la surface de ces billes. L'incubation en excès d'antigènes permet de déplacer l'équilibre de la réaction de fixation-dissociation du couple antigène-anticorps vers la fixation de la totalité des anticorps sur leur cible. Ainsi, l'activité mesurée dans le surnageant après séparation magnétique correspond à la fraction des anticorps ayant perdu leur affinité pour le cCD22.

La <u>Figure 39</u> représente le rapport de la fraction liée du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 sur la radioactivité totale en fonction de la concentration en billes magnétiques. Le plateau observé sur la courbe (A) confirme que le test a été réalisé en excès d'antigènes. La fraction immunoréactive de l'anticorps ¹¹¹In-DOTA-10C6 correspond à la valeur de ce plateau.

La fraction immunoréactive peut également être calculée dans un modèle de régression linéaire représentant la quantité totale d'anticorps injectée sur la fraction liée en fonction de l'inverse de la concentration en billes ainsi que représenté sur la courbe (B). La fraction immunoréactive correspond alors à l'inverse de l'ordonnée à l'origine.

La valeur obtenue par ces deux méthodes représente la fraction immunoréactive du vecteur radiomarqué à l'indium-111 et est de 81%.



Figure 39 : Immunoréactivité du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6.

La fraction immunoréactive a été déterminée à partir d'une concentration constante du radioimmunoconjugué testée sur une gamme de concentrations de billes métalliques coatées avec le cCD22. **(A)** Rapport de la radioactivité liée sur la radioactivité totale (libre + liée) en fonction de la concentration en billes testée. **(B)** Le facteur 1/R représente l'inverse de l'ordonnée à l'origine correspondant à la fraction immunoréactive du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 selon la méthode de Lindmo.

3. REDACTION D'UN PROTOCOLE COMPARABLE A CEUX PROPOSES EN MEDECINE HUMAINE

Un protocole détaillé a été élaboré avec l'aide d'un comité scientifique recensant toutes les disciplines concernées par cette étude clinique : oncologie vétérinaire, médecine nucléaire, radiopharmacie, anatomopathologie vétérinaire et physique médicale. Ce protocole positionne l'étude clinique chez l'animal spontanément malade par rapport à l'état de l'art, détaille les critères d'inclusion et d'exclusion des animaux concernés et précise les soins qui seront réalisés sur chacun d'entre eux. Il contient également la lettre d'information à destination des propriétaires des animaux ainsi que le document de « consentement éclairé » devant être signé par ces derniers.

Le synopsis du protocole figure en <u>Annexe 1</u> de ce manuscrit.

Les résultats présentés dans la Partie A du Chapitre RESULTATS ont permis de choisir l'hybridome 10C6 pour produire en grande quantité l'anticorps monoclonal murin destiné à être utilisé dans le modèle animal syngénique qu'est le DLBCL spontané canin. Le contexte de la mise en place de cet essai clinique vétérinaire a été détaillé dans la Partie B de ce même Chapitre. Toutefois, il n'est pas envisageable de démarrer le recrutement d'animaux malades avant d'avoir caractérisé la pharmacocinétique d'un radiopharmaceutique dont le vecteur est cet anticorps 10C6.

En recherche préclinique sur rongeurs, le pourcentage d'activité injectée par gramme d'organe est mesuré au compteur gamma : les animaux sont sacrifiés et les organes individualisés et déposés dans des tubes de comptage. En travaillant avec une espèce sensible qu'est l'espèce canine, la seule méthode d'évaluation de la biodistribution applicable (comme pour l'Homme) est d'effectuer une quantification des images TEMP/TDM obtenues : il s'agit de l'imagerie quantitative. Cette approche permet alors d'utiliser les méthodes applicables à l'Homme et présente alors un intérêt de validation préclinique des méthodes d'imagerie quantitative.

Ainsi, dans cette Partie C, nous allons nous intéresser à la méthodologie employée pour exploiter les imageries TEMP/TDM qui seront réalisées et présenter des arguments étayés nous permettant par la suite de travailler à partir des acquisitions TEMP/TDM pour les études de dosimétrie. Il s'agit ici de valider la méthodologie de quantification des imageries phénotypiques réalisées avec le radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6, jusqu'au calcul des doses déposées aux organes dans un contexte de RIT, que les animaux concernés soient des individus sains ou des chiens développant spontanément des DLBCL.

1. CORRELATION ENTRE LES DONNEES DU COMPTEUR GAMMA ET CELLES DES ACQUISITIONS TEMP/TDM

Deux calculs indépendants du pourcentage d'activité injectée par gramme de sang peuvent être obtenus par comptage au compteur gamma (fonction d'entrée du modèle de pharmacocinétique) ou par exploitation de l'imagerie quantitative.

Le pourcentage d'activité injectée par gramme de sang est déterminé par lecture au compteur gamma d'un gramme de sang. L'activité contenue dans cet échantillon sanguin est calculée à l'aide de la courbe d'étalonnage du compteur (nombre de coups détectés en fonction de l'activité mesurée). En rapportant l'activité mesurée dans le gramme de sang et corrigée de la décroissance à l'activité totale injectée dans l'animal (mesure à l'activimètre de l'activité contenue dans le volume de radiopharmaceutique injecté), nous obtenons le pourcentage d'activité injectée par gramme de sang.

Le pourcentage d'activité injectée par gramme de sang est déterminé à partir des acquisitions TEMP/TDM en rapportant le nombre de coups corrigé de la décroissance détectés dans le volume contouré correspondant au tube de sang imagé aux cotés de l'animal au nombre de coups totaux détectés sur l'acquisition TEMP/TDM du premier jour. Le tube de sang imagé correspond au même tube de sang que celui qui est analysé au compteur gamma.

Pour l'ensemble des chiens sains et malades dont il est question dans ce Chapitre RESULTATS (BAC.ALI, NOR.ALI, NIA.ALI, DOR.ALI, DAI.ALI, AMI.NIC et FAX.FRE), l'activité présente dans les tubes de sang est déterminée au compteur gamma moins d'une heure après la réalisation du prélèvement sanguin. L'acquisition TEMP/TDM quant à elle débute également dans l'heure suivant la prise de sang. La période de l'indium-111 étant de 67,2 h (soit 2,8 jours), nous considérons que le prélèvement sanguin, son passage dans le compteur gamma et l'imagerie correspondante sont effectués au même point-temps et que la décroissance est négligeable sur une période de soixante minutes. De manière arbitraire, nous décidons de prendre comme référence temporelle l'heure de début d'injection du radiopharmaceutique à J0 pour le positionnement dans le temps de ces trois actes successifs.

Les courbes représentant le pourcentage d'activité injectée par gramme de sang déterminé au compteur en fonction des valeurs calculées à partir des acquisitions TEMP sont présentées dans la <u>Figure 40</u> pour les chiennes DOR.ALI et DAI.ALI. Nous montrons que les points, pour chacune des deux chiennes, se distribuent autour d'une droite y = x. Ces résultats valident les informations obtenues par quantification des imageries TEMP/TDM.



<u>Figure 40 :</u> Corrélation existant entre les pourcentages d'activité injectée par gramme de sang calculés avec les données du compteur gamma et à partir des acquisitions TEMP/TDM chez deux chiennes saines (DOR.ALI et DAI.ALI).

Les données présentées sont corrigées de la décroissance. La fraction d'activité contenue dans 1 g de sang prélevé quelques minutes avant le début de l'imagerie est déterminée au compteur gamma puis avec les acquisitions TEMP/TDM. Les points se distribuent autour d'une droite d'équation y = x.

Les paramètres de la relation de proportionnalité ainsi mise en évidence dépendent principalement des réglages de la machine TEMP mais c'est également et surtout le cas pour le compteur gamma. En effet, les opérations de maintenance notamment, programmées régulièrement afin d'assurer le bon fonctionnement du matériel, peuvent modifier le nombre de coups détectés pour une même activité injectée.

Pour les chiens BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI, nous avons relevé malheureusement un problème d'étalonnage du compteur gamma, le dernier étalonnage connu étant ancien et une maintenance ayant été réalisée dans l'intervalle. Pour chacun de ces trois chiens, les points s'alignent sur une droite de type y = a x + b (<u>Tableau 29</u>). Ces résultats confirment bien qu'il existe une corrélation entre les résultats obtenus par ces deux méthodes indépendantes de détermination du pourcentage d'activité injectée par gramme de sang. Cependant, ils n'invalident pas le travail de quantification relative qui sera effectué par la suite dans le reste de ce Chapitre. En effet, le travail de quantification réalisé sur les organes et les masses tumorales permet de calculer un pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe en rapportant le nombre de coups détectés lors de l'acquisition TEMP au nombre de coups détectés dans l'organisme entier à J0 : il s'agit bien d'une quantification relative (Beykan S. *et al.*, 2016). Ainsi, il est toujours possible de comparer les données obtenues pour les chiennes DOR.ALI et DAI.ALI avec celles des trois autres chiens mentionnés précédemment.

Animaux	Equation de la droite de regression linéaire
BAC.ALI	$y = (1,32 \pm 0,05) x + (0,005 \pm 0,002)$; $R^2 = 0,99$
NOR.ALI	$y = (0,77 \pm 0,07) x + (0,004 \pm 0,003)$; $R^2 = 0,99$
NIA.ALI	$y = (0,77 \pm 0,07) x + (0,002 \pm 0,004)$; $R^2 = 0,98$

<u>Tableau 29 :</u> Equations des courbes de régression linéaire déterminées à partir des graphes représentant les pourcentages d'activité injectée par gramme de sang calculés avec les données du compteur gamma en fonction des valeurs calculées à partir des acquisitions TEMP/TDM chez les chiens BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI.

2. EXPLOITATION DE L'IMAGERIE PHENOTYPIQUE POUR LE CALCUL DES DOSES DEPOSEES AUX ORGANES

Après avoir validé notre méthodologie de travail à partir des acquisitions TEMP/TDM permettant de déterminer la pharmacocinétique de l'anticorps radiomarqué étudié, il est important de se poser la question suivante : quelle technique de contourage des organes/volumes d'intérêt sera la plus prédictive de la pharmacocinétique du radiopharmaceutique injecté et de la dose réellement déposée dans ces organes/volumes ?

La question ne se pose pas pour le tube de sang ni pour le contourage corps entier. En effet, le tube de sang est éloigné du flanc gauche de l'animal pour qu'il soit aisé de contouré la totalité de « l'activité » présente dans cet échantillon sanguin, en s'aidant des images TDM pour localiser le tube de sang et des acquisitions TEMP pour prendre en compte la totalité du signal correspondant. En ce qui concerne le corps entier, il est là aussi possible de réaliser un contourage très large en s'assurant de prendre en compte la totalité du signal TEMP, ainsi qu'illustré dans la <u>Figure 41</u>.

Lorsqu'il s'agit de déterminer la fraction d'activité injectée présente dans un organe interne à un temps donné, comme le foie, les reins, la rate et les poumons, le contourage large n'est pas réalisable car il n'est alors pas possible de distinguer la limite entre les signaux TEMP provenant de deux organes adjacents A et B. Ainsi, si les paramètres de reconstruction des acquisitions TEMP prennent en compte les informations en provenance des données des images TDM pour corriger le signal détecté de l'atténuation, il n'en reste pas moins qu'une part du signal devant être attribué à un organe sera « omis » dans le contourage anatomique : il s'agit de l'effet de volume partiel, conséquence de la résolution spatiale limitée de la gamma caméra et de son imparfaite correction de la diffusion des photons émis. Ceci se traduit par un étalement de la fonction de réponse du détecteur, traditionnellement représentée par une gaussienne, associé à une diminution de son amplitude.

En pratique, le signal contouré d'après le contourage anatomique des organes sur les images TDM n'est que partiel et une erreur est faite sur l'estimation du pourcentage d'activité injectée par unité de poids. En effet, certains rayonnements gamma émis en dehors du volume de l'organe (défini à partir des images TDM) provenant de radioéléments couplés à des vecteurs localisés dans l'organe A ne seront pas comptabilisées. A l'inverse, le contourage anatomique peut également attribuer un signal à un organe A alors que les désintégrations associées proviennent de radioéléments couplés à des vecteurs localisés dans l'organe B. Ainsi, l'activité des organes dans lesquels le vecteur radiomarqué s'accumule fortement peut être détectée en quantité non négligeable dans les organes adjacents, avec pour conséquence une surestimation de leur pourcentage d'activité par unité de poids. Les termes de « spill-in » et « spill-out » imagent cette notion de débordement du signal détecté.

Les débordements vers ou en dehors de l'organe étudié ne se compensent pas : nous faisons donc une erreur « d'attribution » de la radioactivité détectée dans les volumes d'intérêt que nous délimitons manuellement d'après leur limites anatomiques sur les coupes TDM.

Afin de nous absoudre de cette erreur « d'attribution » de la radioactivité, nous avons fait l'hypothèse suivante : en ne contourant qu'un volume restreint interne à l'organe d'intérêt, le signal « perdu » pour ce plus faible volume devrait être compensé par le signal « gagné » en provenance du reste de l'organe (Sandström M. *et al.*, 2015). Cette hypothèse suggère que la distribution du radiopharmaceutique est homogène dans un organe.

Ainsi nous avons effectué pour le foie, les reins, la rate et les poumons une quantification sur un échantillon de volumes limités de ces organes, comme illustré dans la <u>Figure 42</u> :

- cylindre de 15,7 cm³ (disque de 2 cm de diamètre sur 20 coupes) pour les reins (<u>Figure 42</u>, A)
- trois échantillonnages indépendants de trois cylindres de 15,7 cm³ (disque de 2 cm de diamètre sur 10 coupes) pour le foie dans trois zones distinctes : VR 1, VR 2 et VR
 3
- combinaison de 11 cylindres de 7,9 cm³ pour le foie (Figure 42, C₁, C₂ et C₃) : VR 4
- cylindre de 10,1 cm³ pour la rate (Figure 42, D₁) : VR 1
- combinaison de 6 cylindres de 5,1 cm³ (disque de 1,6 cm de diamètre sur 10 coupes)
 pour la rate (Figure 42, D₂ et D₃) : VR 3
- deux échantillonnages indépendants de deux cylindres de 15,7 cm³ (disque de 2 cm de diamètre sur 20 coupes) pour les poumons : VR1 et VR 2

combinaison de 7 cylindres de 7,9 cm³ (disque de 2 cm de diamètre sur 10 coupes)
 pour les poumons (<u>Figure 42</u>, B₁ et B₂) : VR 3



<u>Figure 41 :</u> Contourage large du corps entier sur l'image de fusion TEMP/TDM à J1 (NOR.ALI) : coupe transversale thoracique sur animal en décubitus ventral (poumons, foie, extrémités distales des membres pelviens).

La superposition des images TDM et de l'acquisition TEMP permet d'observer qu'une partie du signal TEMP déborde du corps de l'animal : l'activité présente dans l'organisme de l'animal aurait été sousestimée si le contourage de ce volume d'intérêt ne s'était basé que sur les contours anatomiques visualisés sur l'examen TDM. Ici, le contourage a été réalisé sur chaque coupe à l'aide d'un disque de large diamètre (périmètre orange).



<u>Figure 42 :</u> Contourage sur l'acquisition TDM de petits volumes au sein des reins, du foie, de la rate et des poumons (NOR.ALI).
(A) rein droit (contour bleu) et rein gauche (disque vert) ; (B) poumons. ; (C) foie ; (D) rate.



<u>Figure 43</u>: Comparaison des pourcentages d'activité injectée par kilogramme d'organe en contourant l'organe entier sur les images TDM et en déterminant des petits volumes au sein de ces organes : données obtenues chez trois chiens sains (BAC.ALI, NOR.AI et DOR.ALI) pour les reins, le foie, la rate et les poumons.

Les données présentées ont été calculées à différents temps après injection sans correction de la décroissance. Une régression linéaire permet de mettre en évidence des relations de proportionnalité entre les différentes méthodes de calcul du pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe. Les volumes restreints correspondent à des cylindres de 10,1 cm³ pour la rate et de 15,7 cm³ pour les autres organes. De plus, certains de ces volumes limités sont une combinaison de plusieurs cylindres : 11 cylindres de 7,9 cm³ pour le foie (VR 4), 6 cylindres de 5,1 cm³ pour la rate (VR 3) et 7 cylindres de 7,9 cm³ pour les pour

Le pourcentage d'activité injectée par unité de masse a été déterminé dans chacun de ces volumes restreints. Les valeurs obtenues ont été comparées à celles obtenues par contourage de l'organe dans sa totalité d'après ses limites anatomiques visualisables sur les images TDM. Ce travail a été effectué chez les chiens BAC.ALI, NOR.ALI et DOR.ALI et les graphes obtenus sont présentés dans la <u>Figure 43</u>.

A partir de ces graphes, des régressions linéaires ont été réalisées afin de déterminer s'il existe une relation de proportionnalité entre le pourcentage d'activité injectée par unité de masse calculé en contourant la totalité de l'organe selon ses limites anatomiques et les pourcentages d'activité injectée par unité de masse calculés en utilisant la méthode des volumes restreints.

S'il existe une relation de proportionnalité dans toutes les situations exposées, les droites ainsi créées passent rarement par le point (0; 0) mais ont un coefficient directeur proche de 1. En dehors des résultats obtenus chez NOR.ALI et DOR.ALI pour le volume restreint VR 2 dans le foie et ceux obtenus chez BAC.ALI et DOR.ALI pour le volume restreint VR 1, les valeurs de pourcentage d'activité injectée par kilogramme calculées dans le volume restreint sont représentatives de celles calculées en contourant l'organe correspondant dans sa totalité. Ce n'est pas le cas pour le VR 1 des poumons chez les deux chiens BAC.ALI et DOR.ALI : le pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe est supérieur en contourant l'organe entier en comparaison avec la méthode se basant sur des volumes restreints, les ordonnées à l'origine étant systématiquement négatives et les coefficients directeurs étant variables en fonction de l'échantillonnage des volumes considérés.

Malgré tout, ce travail sur les volumes restreints a abouti à des informations qui ne sont pas toujours cohérentes entre elles : les coefficients directeurs des droites de régression linéaire sont parfois supérieurs et parfois inférieurs à 1 et les ordonnées à l'origine sont parfois positives et parfois négatives. Aussi il n'est pas possible de conclure à partir de cette étude préliminaire quant à l'intérêt d'évaluer la fraction d'activité injectée par unité de masse présente dans un organe d'intérêt en utilisant la méthode des volumes restreints.

Une analyse plus complète est nécessaire, comparant les valeurs obtenues en fonction du volume et du nombre d'échantillons considérés afin de compenser l'hétérogénéité de distribution du radiopharmaceutique au sein des organes.

Dans le reste de ce Chapitre RESULTATS, nous avons donc choisi de contourer les organes dans leur totalité en suivant leurs contours anatomiques définis sur les images TDM. En effet, il s'agit de la méthode employée en médecine humaine pour les études de dosimétrie et

bien qu'une erreur soit commise dans le calcul du pourcentage d'activité injectée par unité de masse, cette erreur est présente pour chaque mesure et les résultats obtenus pour chacun des chiens imagés restent comparables.

En utilisant le logiciel 3D Slicer, il est possible de définir un volume d'intérêt en délimitant manuellement sur chacune des coupes de l'examen TDM une surface correspondant généralement aux limites anatomiques de l'organe considéré. Ce travail a été réalisé pour le corps entier (le volume défini est supérieur au volume anatomique, afin de prendre en compte la totalité de l'activité détectée dans l'animal) ainsi qu'illustré dans la <u>Figure 41</u>, pour les vertèbres lombaires ainsi que pour les masses tumorales (nœuds lymphatiques).

Il est également possible d'utiliser une fonction de segmentation automatique prenant en compte la rondeur, le volume et l'homogénéité de la densité tissulaire de l'organe étudié (module Robust Statistics Segmenter, 3D Slicer) : cette méthode a été utilisée pour le foie, les reins, la rate et les poumons. Le paramètre « volume » (en mL) varie d'un animal à un autre selon le gabarit du chien, mais les paramètres « rondeur » (en %) et « homogénéité de densité tissulaire » (en %) sont relativement constants pour l'ensemble des animaux. Les valeurs optimisées de ces paramètres sont présentées dans le <u>Tableau 30</u>. Toutefois, cette seconde méthode nécessite, notamment pour le foie et la rate, que les coupes TDM soient reprises une à une afin de vérifier que le contourage du volume d'intérêt correspond réellement aux limites anatomiques de l'organe concerné. En effet, cette fonction de segmentation facilite grandement le travail de contourage, mais l'anatomie individuelle et la plus ou moins grande proximité des organes contenus dans l'abdomen selon l'embonpoint des sujets ne permettent pas de se passer d'une correction systématique et manuelle du contourage automatique.

Volume/homogénéité /rondeur	BAC.ALI	NOR.ALI	NIA.AL I	DOR.ALI	DAI.ALI	AMI/NIC	FAX.FRE
Foie	600/0,9	600/0,9	550/0,	650/1	600/1	300/0,9	1300/0,9
	/0,7	/0,7	9/0,6	/0,6	/0,4	/0,4	/0,75
Rein droit	50/0,8	50/0,8	120/0,	130/0,9	120/0,9	60/0,8	150/0,9
	/0,8	/0,8	9/0,8	/0,7	/0,7	/0,8	/0,8
Rein gauche	100/0,8	100/0,8	140/0,	50/0,9	150/0,9	220/0,7	100/0,9
	/0,8	/0,7	9/0,6	/0,6	/0,7	/0,7	/0,8
Rate	100/1	100/1	200/1	200/1	200/1	100/0,8	400/1
	/0,5	/0,7	/0,5	/0,5	/0,5	/0,6	/0,7
Poumons	950/0,3	950/0,3	950/0,	950/0,4	400/1	550/0,8	1600/0,4
	/0,3	/0,3	8/0,3	/0,3	/0,4	/0,5	/0,3

<u>Tableau 30 :</u> Paramètres de segmentation (volume, homogénéité de densité tissulaire et rondeur de l'organe) utilisés dans le logiciel 3D Slicer pour effectuer un contourage automatique du foie, des reins, de la rate et des poumons chez les chiens sains et malades ayant reçu une injection du radiopharmaceutique 111n-DOTA-10C6.

Le volume est donné en mL, l'homogénéité de densité tissulaire et la rondeur sont donnés en pourcentage (0 à 1). Les chiens sains sont BAC.ALI, NOR.ALI, NIA.ALI, DOR.ALI et DAI.ALI. Les chiens spontanément atteints de DLBCL sont AMI.NIC et FAX.FRE.

Partie D. ETUDE DE LA PHARMACOCINETIQUE DE L'ANTICORPS ANTI-cCD22 ¹¹¹In-DOTA-10C6 CHEZ DES CHIENS SAINS D'EXPERIMENTATION

Les résultats présentés dans la Partie A du Chapitre RESULTATS ont permis de choisir l'hybridome 10C6 pour produire en grande quantité l'anticorps monoclonal murin destiné à être utilisé dans le modèle animal syngénique qu'est le DLBCL spontané canin.

Dans la Partie C, nous avons validé notre approche permettant d'évaluer la stabilité du radiopharmaceutique en s'intéressant à sa pharmacocinétique sanguine et nous avons choisi une méthode de quantification des imageries phénotypiques obtenues chez le chien afin d'évaluer la biodistribution du radiopharmaceutique dans les organes et de calculer les doses déposées en se projetant dans un contexte de RIT à l'yttrium-90.

Dans cette Partie D, la pharmacocinétique de l'anticorps DOTA-10C6 sera étudiée après marquage à l'indium-111 chez des chiens sains d'expérimentation. Le protocole suivi est celui décrit dans les essais cliniques menés chez l'Homme : injection par voie intraveineuse d'un mélange de 1 mg maximum d'anticorps anti-hCD22 radiomarqué et du même anticorps froid pour une dose totale de 1,5 mg.kg⁻¹ d'anticorps (Kraeber-Bodere F. *et al.*, 2017). Soulignons que dans la suite de ce Chapitre RESULTATS, toutes les valeurs de pourcentage d'activité injectée par unité de masse pour les organes d'intérêt seront calculées sans correction de la décroissance. En effet, il a été présenté dans la Partie B du Chapitre RESULTATS les caractéristiques des radiopharmaceutiques produits : la pureté radiochimique est le plus souvent située dans l'intervalle 80-90 %. De plus, les variations de l'immunoréactivité du radiopharmaceutique injecté doivent être prises en compte. Ainsi, il n'est pas évident de relier la présence d'activité dans un organe à la présence du vecteur intact, soit l'anticorps DOTA-10C6. Les coups détectés par la TEMP peuvent provenir également de l'indium-111 libre circulant (moins de 3%) ou encore de produits de dégradation du radiopharmaceutique (12%).

Une étude dosimétrique sera également réalisée à partir des images phénotypiques ainsi obtenues en vue d'évaluer les doses déposées aux organes et d'anticiper une potentielle toxicité limitante pour la radioimmunothérapie avec le radiopharmaceutique ⁹⁰Y-DOTA-10C6.

Trois chiens d'expérimentation sains (BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI) ont fait l'objet d'une étude de pharmacocinétique du radioimmunoconjugué ¹¹¹In-DOTA-10C6, avec co-infusion

d'anticorps froid 10C6, pour une quantité totale en anticorps anti-cCD22 de 1,5 mg.kg⁻¹. Les injections par voies intraveineuses du radiopharmaceutique ont été réalisées sous anesthésie générale à un débit de perfusion très faible au début afin de prévenir tout risque de réaction anaphylactique, puis à un débit respectant le taux horaire d'endotoxines maximal acceptable chez l'Homme (5 UI/kg/h).

Des acquisitions TEMP/TDM ont été réalisées à différents temps pour chacun des chiens : J0 (1 h post-injection), J1, J2, J3. Une acquisition supplémentaire a été réalisée à J6 pour le chien BAC.ALI.

Le <u>Tableau 31</u> récapitule les caractéristiques du mélange administré par voie intraveineuse, pour une quantité totale en anticorps de 1,5 mg.kg⁻¹.

Dans un premier temps, seul le chien BAC.ALI a reçu une injection du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6, avec la même activité injectée que chez l'Homme (entre 111 et 185 MBq / patient). Sur les images TEMP corps entier obtenues après injection de cette forte activité, il est difficile de distinguer les limites des organes intra-abdominaux : le foie, les reins et la rate, très proches anatomiquement, présentent un signal TEMP équivalent. Cet « effet masse » est renforcé par le petit gabarit du chien et l'absence de graisse abdominale développée. Par ailleurs, le taux de rayonnements détectés à 1 m de l'animal après 4 jours d'hospitalisation était élevé et n'a pas pu permettre d'envisager le retour de l'animal dans son chenil habituel : la période d'hébergement en animalerie radioprotégée s'est étendue sur huit jours au total. Il a donc été décidé par la suite d'injecter aux animaux une activité d'indium-111 en relation avec leur poids : 3,7 MBq.kg⁻¹. Les chiens NOR.ALI et NIA.ALI ont reçu une injection du même lot de radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6.

Animal	¹¹¹ In-DOTA- 10C6 (mg)	10C6 (mg)	Masse totale en anticorps (mg)	Activité injectée (MBq)	Activité spécifique ¹¹¹ In- DOTA-10C6 (MBq.mg ⁻¹)	Activité spécifique dans la seringue (MBq.mg ⁻¹)
BAC.ALI (10 kg)	0,7	14,3	15	109,1	143,0	7,3
NOR.ALI (11,8 kg)	0,3	17,4	17,7	39,6	139,4	2,2
NIA.ALI (11,8 kg)	0,3	17,4	17,7	37,4	142,8	2,1

<u>Tableau 31</u>: Caractéristiques du mélange co-infusé d'anticorps froid 10C6 et du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 réalisée chez 3 chiens d'expérimentation sains.

La quantité totale d'anticorps injectée est de 1,5 mg.kg⁻¹, la fraction du radioimmunoconjugué variant entre 0,3 et 0,7 mg. L'activité spécifique du mélange injecté varie entre 2,1 et 7,3 MBq.mg⁻¹.
1. DETERMINATION DE LA PHARMACOCINETIQUE SANGUINE DU RADIOPHARMACEUTIQUE ¹¹¹In-DOTA-10C6

La première méthode qui a été utilisée pour suivre la pharmacocinétique du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 repose sur l'exploitation des acquisitions TEMP/TDM et la détermination de la fraction d'activité présente dans 1 g de sang à chaque temps d'imagerie. Pour cela, un tube de sang contenant 1 g de sang total a été placé sur le flanc gauche de l'animal et un contourage large permet de prendre en compte la totalité de l'activité présente dans cet échantillon sanguin (Figure 44). La détermination du pourcentage d'activité par gramme de sang corrigé de la décroissance en fonction du délai s'étant écoulé entre le début de l'injection du radiopharmaceutique et la prise de sang permet de calculer la demi-vie biologique du radioimmunoconjugué évalué. Cette demi-vie biologique correspond au temps nécessaire devant s'écouler pour que la quantité de vecteurs soit divisée par deux. Ce calcul se fait à l'aide d'une régression non linéaire de type « décroissance bi-exponentielle » pour l'animal BAC.ALI mais par une régression non linéaire de type « décroissance mono-exponentielle » pour les animaux NOR.ALI et NIA.ALI du fait d'un trop faible nombre de points (le coefficient de corrélation est alors meilleur). Lorsque la courbe de tendance ainsi déterminée a une équation constituée de deux exponentielles, la valeur de la demi-vie est déterminée graphiquement.

La deuxième méthode qui a été utilisée pour évaluer la pharmacocinétique du radioimmunoconjugué ¹¹¹In-DOTA-10C6 consiste à déterminer le nombre de coups présents dans 1 g de sang au compteur gamma. Les mêmes calculs permettent de déterminer la demi-vie biologique du radiopharmaceutique étudié.

La <u>Figure 45</u> illustre les résultats obtenus pour les trois animaux ayant reçu une injection d'¹¹¹In-DOTA-10C6 avec co-infusion de l'anticorps froid 10C6.

Un test statistique non paramétrique de comparaison de moyennes, appelé test des rangs signés de Wilcoxon (ou test de Wilcoxon pour données appariées), permet de comparer les valeurs de demi-vies obtenues à l'aide du compteur et à l'aide de la quantification des imageries TEMP. Aucune différence significative n'est mise en évidence pour la demi-vie biologique (p-value = 0,25) du radioimmunoconjugué ¹¹¹In-DOTA-10C6. Ces données sont concordantes avec ce qui a été expliqué dans la Partie C du Chapitre RESULTATS.



<u>Figure 44 :</u> Contourage manuel du tube de sang sur les coupes transversales des acquisitions TEMP/TDM: exemple de l'acquisition à J0 pour l'animal NOR.ALI.

Le tube contenant 1 g de sang prélevé quelques minutes avant le début de l'acquisition TEMP/TDM est placé sur le flanc gauche de l'animal (espacement minimal de 5 cm garantissant la non-confusion du signal SPECT du tube de sang avec le signal détecté dans le corps de l'animal). Le logiciel 3D Slicer permet de déterminer un volume d'intérêt sur les images de fusion : le contourage large de ce tube de sang permet de prendre en compte la totalité de l'activité présente dans l'échantillon sanguin.



<u>Figure 45</u> : Pharmacocinétique sanguine chez trois chiens sains d'expérimentation du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 avec co-infusion de l'anticorps froid 10C6.

Le pourcentage d'activité injectée corrigée de la décroissance par g de sang est déterminé à partir des acquisitions TEMP/TDM. Une régression non linéaire de type « décroissance bi-exponentielle » ou « décroissance mono-exponentielle » permet de déterminer la demi-vie biologique de l'anticorps DOTA-10C6 qui est de **(A)** 9,5 \pm 1 h pour le chien BAC.ALI et **(B)** qui varie entre 28,8 et 32,4 h pour les chiens NOR.ALI et NIA.ALI injectés avec le même lot d'anticorps radiomarqué.

Le nombre de coups corrigés de la décroissance par gramme de sang peut également être déterminé par lecture dans un compteur gamma et la demi-vie biologique de l'anticorps DOTA-10C6 est de **(C)** 12 ± 1 h pour le chien BAC.ALI et **(D)** varie entre 30,2 et 36,8 h pour les chiens NOR.ALI et NIA.ALI injectés avec le même lot d'anticorps radiomarqué.

2. CARACTERISATION DE LA BIODISTRIBUTION DU RADIOPHARMACEUTIQUE ¹¹¹In-DOTA-10C6

L'exploitation des imageries phénotypiques réalisées chez des chiens sains après injection par voie intraveineuse du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6, en déterminant à chaque temps d'acquisition le pourcentage d'activité injectée présent dans un kilogramme d'organe (ou du compartiment concerné), permet de caractériser la pharmacocinétique du radioimmunoconjugué ¹¹¹In-DOTA-10C6 au sein de cet organe (ou de ce compartiment).

Les pourcentages d'activité injectée par kilogramme d'organe (ou de compartiment) sont obtenus en délimitant sur les coupes tomodensitométriques les volumes d'intérêts pour chaque temps d'acquisition : le logiciel 3D Slicer détermine ensuite l'activité présente dans le volume d'intérêt, cette dernière étant rapportée à l'activité corps entier à J0. Il s'agit d'une méthode de quantification relative. Une courbe de tendance est ensuite tracée à l'aide d'une régression non linéaire : ces données prennent en compte à la fois le comportement biologique du vecteur (DOTA-10C6) et la période de l'indium-111, qui est de 2,8 jours.

Précisons qu'une difficulté a été rencontrée pour le chien NIA.ALI dans la détermination de ces pourcentages d'activité injectée. En effet, l'animal a bougé dans le lit de la machine entre l'acquisition TEMP de la moitié supérieure de l'animal et l'acquisition TEMP de sa moitié inférieure. Des informations sont manquantes à J0 pour les organes abdominaux notamment, et l'activité totale injectée n'a pu être évaluée à l'aide de l'acquisition TEMP/TDM réalisée au temps 1 h post-injection : elle a été extrapolée à partir d'un coefficient de correspondance entre le nombre de coups détectés lors de l'acquisition TEMP à J0 et l'activité présente dans la seringue d'injection, ce coefficient ayant été calculé à partir des données obtenues pour le chien NOR.ALI.

Les courbes de tendance du pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe ou de compartiment sont présentées dans la <u>Figure 46</u>.

Le comportement du radioimmunoconjugué ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le corps entier, les reins et les poumons est similaire chez tous les chiens sains imagés. En regroupant les données de ces trois chiens, il est possible de déterminer une courbe de tendance en réalisant une régression non linéaire de type « décroissance mono-exponentielle ».

Le comportement du radioimmunoconjugué ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le foie ne diffère que très peu entre le chien BAC.ALI d'une part et les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI d'autre part : après une première phase d'environ 24 h pendant laquelle le pourcentage d'activité injectée par

gramme de foie augmente chez le chien BAC.ALI, ce dernier diminue lentement dans un deuxième temps selon le même profil que celui observé chez les deux autres animaux. Malgré une pureté radiochimique satisfaisante du radiopharmaceutique injecté au chien BAC.ALI, l'immunoréactivité de l'anticorps radiomarqué était faible par rapport à celle du radiopharmaceutique injecté à NOR.ALI et NIA.ALI : 53,4 % versus 80,1 %. Cette différence de qualité peut expliquer les variations de biodistribution hépatique mises en évidence entre le chien BAC.ALI et les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI. Il n'a été possible de déterminer une courbe de tendance dans cet organe que pour les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI.



<u>Figure 46</u> : Pharmacocinétique du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 avec co-injection d'anticorps froid 10C6 chez trois chiens sains (BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI) : corps entier, reins, foie, poumons, rate et moelle osseuse hématopoïétique (MOH) des vertèbres lombaires.

Les données présentées ne sont pas corrigées de la décroissance. Le comportement du radiopharmaceutique au niveau du corps entier et dans les reins, le foie et les poumons est identique pour les trois animaux (régression mono-exponentielle). Il est évalué en déterminant le pourcentage d'activité injectée par kg à partir des acquisitions TEMP/TDM. En ce qui concerne la rate et la MOH des vertèbres lombaires, une différence est observée entre le chien BAC.ALI (régression bi-exponentielle) d'un part et les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI (régression mono-exponentielle) d'autre part : le profil cinétique est similaire mais le pourcentage d'activité injectée par kg est supérieur pour les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI.

Le comportement du radioimmunoconjugué ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans la rate et la moelle osseuse hématopoïétique est également différent selon le lot de radiopharmaceutique concerné. Ainsi il est possible de déterminer des courbes de tendance en réalisant des régressions non linéaires de type « décroissance bi-exponentielle » pour le chien BAC.ALI. Pour les animaux NOR.ALI et NIA.ALI, ayant reçu une injection de radiopharmaceutique d'un lot différent, les courbes de tendance sont réalisées en effectuant des régressions non linéaires de type « décroissance mono-exponentielle ».

Le profil cinétique est comparable pour les trois chiens, bien que la valeur du pourcentage d'activité injectée par kg est supérieure pour les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI. Cette différence peut être reliée aux valeurs d'immunoréactivité des deux lots de radiopharmaceutique. En effet, une grande partie de ce dernier est très rapidement éliminé chez BAC.ALI, d'où une valeur de pourcentage d'activité injectée par kilogramme de rate et de MOH plus faible au départ. Cependant, après les quarante-huit premières heures, le comportement de l'anticorps radiomarqué est similaire chez tous les animaux.

3. CALCUL DE LA DOSE DEPOSEE AUX ORGANES DANS UN CONTEXTE DE RIT A L'YTTRIUM-90

L'étude dosimétrique réalisée chez des chiens sains a pour objectif de déterminer si un risque de toxicité majeure existe pour un ou plusieurs organes vitaux des animaux qui pourraient être inclus dans une étude clinique de radioimmunothérapie. L'anticorps DOTA-10C6 est marqué avec de l'yttrium-90 : le vecteur est identique à celui du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 injecté pour la réalisation des imageries quantitatives. L'injection du radiopharmaceutique marqué à l'yttrium-90 sera réalisée dans les mêmes conditions que l'injection du radiopharmaceutique marqué à l'indium-111 : co-injection d'anticorps froid 10C6 pour une dose totale en anticorps de 1,5 mg.kg⁻¹.

La détermination du risque toxique chez les animaux sains n'est qu'indicative. En effet, si aucune toxicité potentielle n'est mise en évidence chez des animaux sains, il n'est pas exclu qu'une ou plusieurs toxicités soient ensuite détectées chez les animaux malades bénéficiant d'une RIT à l'yttrium-90, en fonction de l'envahissement tumoral de certains organes tels le foie, la moelle osseuse hématopoïétique ou moins fréquemment les reins. La référence des chiens sains est donc utile pour détecter une pharmacocinétique atypique dans les organes des chiens malades par comparaison. Une étude dosimétrique individualisée pour chaque animal inclus et bénéficiant d'une série d'acquisitions TEMP/TDM, suite à l'injection du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6, reste nécessaire pour programmer une RIT de manière personnalisée. Ces études ne sont pas réalisées de manière systématique chez l'Homme et présentent donc un potentiel de transfert vers la clinique.

Le travail de délimitation des volumes d'intérêt à partir de la série d'acquisitions TEMP/TDM réalisées chez un animal après une injection du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 permet de déterminer, à l'aide du logiciel 3D Slicer, le nombre de coups détectés par seconde (c'est à dire l'activité) à un temps donné dans ce volume. Après avoir corrigé ces valeurs de la décroissance de l'indium-111 et les avoir rapportées au nombre de coups détectés par seconde dans le corps entier à J0, on obtient un pourcentage d'activité injectée corrigée de la décroissance par compartiment concerné. L'intérêt de corriger les valeurs obtenues de la décroissance permet de raisonner sur la quantité de vecteurs présents dans l'organe étudié : en se plaçant dans un contexte de RIT avec le radiopharmaceutique ⁹⁰Y-DOTA-10C6 et en appliquant la décroissance de l'yttrium-90, il est ensuite possible de calculer les activités cumulées dans chaque organe et chaque site tumoral.

En supposant que l'injection initiale concerne 1 MBq du radiopharmaceutique ⁹⁰Y-DOTA-10C6, il est possible de déterminer le nombre de désintégrations d'yttrium-90 se produisant par seconde dans le volume d'intérêt à un temps donné. L'aire sous la courbe représentant ce nombre de désintégrations d'yttrium-90 par seconde en fonction du temps correspond au nombre de désintégrations total se produisant dans ce volume d'intérêt pendant la durée du traitement à l'aide du radioimmunoconjugué ⁹⁰Y-DOTA-10C6 : il s'agit de l'activité cumulée dans le volume d'intérêt. En multipliant cette valeur par l'énergie libérée par la désintégration d'un atome d'yttrium-90 et en la rapportant au poids de l'organe (en kg), on obtient la dose déposée à l'organe étudié en Gy.MBq⁻¹ ou mGy.MBq⁻¹ (ce qui correspond à des J.kg⁻¹.MBq⁻¹ ou des mJ.kg⁻¹.MBq⁻¹).

Il est ainsi possible, selon l'activité de ⁹⁰Y-DOTA-10C6 qui sera injectée à l'animal, de déterminer à l'avance les doses reçues aux organes et de prédire les risques toxiques majeurs.

Dans notre travail, nous avons déterminé l'activité cumulée dans les volumes d'intérêt en intégrant la fonction représentant l'activité en fonction du temps entre 0 et l'infini : cette courbe a été établie à partir des quantifications effectuées sur les images TEMP/TDM à différents temps après l'injection et a été ajustée auparavant avec une fonction de type exponentielle dont le plateau a été fixé à 0 (somme de deux exponentielles ou exponentielle simple à défaut).

Ainsi l'étude de la pharmacocinétique du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 chez les chiens sains d'expérimentation BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI a permis de déterminer une activité cumulée dans chaque volume d'intérêt en se plaçant dans le cadre d'une radioimmunothérapie anti-cCD22 : co-injection du radiopharmaceutique ⁹⁰Y-DOTA-10C6 et de l'anticorps froid 10C6. La valeur de l'activité cumulée multipliée par l'énergie d'une désintégration d'yttrium-90 et pondérée par la fraction absorbée dans l'organe aboutit à la dose auto-absorbée déposée dans le volume d'intérêt étudié. Cette fraction de dose auto-absorbée, correspond à la dose déposée dans un organe du fait de la désintégration de particules provenant de ce même organe. Elle a été calculée pour chacun de ces chiens à partir de la masse des volumes d'intérêt étudiés et de S-facteurs organes sains calculés dans l'équipe en interne avec le code Monte Carlo MCNPX à partir d'une image par résonance magnétique d'un chien sain de race Rottweiler de 35 kg. Les résultats de calcul des doses auto-absorbées aux organes par mégabéquerel injecté sont présentés dans le <u>Tableau 32</u>.

Les calculs de la cross-dose ont également été effectués pour chacun des organes étudiés : foie, rein droit, rein gauche, rate et poumons. La cross-dose correspond à la dose déposée dans un organe du fait de la désintégration de particules en provenance des organes voisins. Les S-facteurs utilisés proviennent également de calculs effectués en interne comme expliqué dans le paragraphe précédent. Les cross-doses ainsi calculées se sont révélées négligeables par rapport aux doses auto-absorbées de chaque organe (cf <u>Annexe 4</u>) : la cross-dose maximale a été calculée pour l'irradiation des poumons par le foie chez le chien BAC.ALI, sa valeur étant de 0,45 mGy.MBq⁻¹, la dose auto-absorbée calculée pour les poumons chez ce sujet atteignant 9,8 ± 0,3 mGy.MBq⁻¹.

D'une manière générale, les doses absorbées par les organes sains du chien sont du même ordre de grandeur que celles calculées chez l'Homme lors de RIT anti-CD22 à l'yttrium-90. Une attention particulière doit cependant être portée au foie, qui reçoit une dose plus élevée chez le chien que chez l'Homme. La dose auto-absorbée par mégabéquerel injecté la plus élevée est calculée pour le foie de BAC.ALI : $35,2 \pm 4,5 \text{ mGy.MBq}^{-1}$. En se plaçant dans une situation d'exemple où un chien de 10 kg (soit 0,46 m²) recevrait une injection de 555 MBq.m⁻² du radiopharmaceutique ⁹⁰Y-DOTA-10C6 avec co-injection de l'anticorps froid 10C6 pour une quantité totale en anticorps de 1,5 mg.kg⁻¹, la dose absorbée au foie serait alors de 9 ± 1,2 Gy. En se basant sur les données connues, le risque toxique pour cet organe reste faible (Emami B. *et al.*, 1991 ; Milano MT. *et al.*, 2007).

Volumo d'intérêt	Dose auto-absorbée (mGy.MBq ⁻¹)			
volume a interet	BAC.ALI	NOR.ALI	NIA.ALI	
Corps entier	3,3 ± 0,1	$2,8 \pm 0,1$	3 ± 0,1	
Foie	35,2 ± 4,5	19,8 ± 0,1	22,5 ± 2,9	
Rein droit	7,7 ± 0,1	7,5 ± 0,7	8,8 ± 0,1	
Rein gauche	3,8 ± 1	$4,4 \pm 0,1$	5,5 ± 1,5	
Rate	1,3 ± 0,1	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,2	
Poumons	9,8 ± 0,3	8,9 ± 0,2	11,2 ± 0,3	

<u>Tableau 32 :</u> Doses auto-absorbées aux organes par mégabéquerel injecté calculées chez des chiens sains dans le cadre d'une radioimmunothérapie anti-cCD22 réalisée avec le radiopharmaceutique ⁹⁰Y-DOTA-10C6 avec co-injection d'une grande quantité d'anticorps froid 10C6.

L'évaluation du comportement du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 permet de déterminer l'activité cumulée des volumes d'intérêt et les doses auto-absorbées qui en découlent dans le cadre d'une RIT anticCD22 avec l'anticorps ⁹⁰Y-DOTA-10C6 et co-injection d'anticorps froid 10C6 pour une dose totale en anticorps de 1,5 mg.kg⁻¹.

La dose absorbée par mégabéquerel injecté n'a pu être que grossièrement approchée pour la moelle osseuse contenue dans les vertèbres lombaires.

Nous avons calculé, à partir des données de la littérature, la masse de moelle osseuse hématopoïétique contenue dans les sept vertèbres lombaires des trois animaux imagés d'après les informations suivantes : la moelle osseuse représente 3,4% de la masse corporelle totale (Polig E. et Jee WSS., 1989), le rapport moelle osseuse hématopoïétique / moelle jaune est de 0,42 (Jain NC., 1986 ; Weiss DJ., 1986 ; Polig E. et Jee WSS., 1989), et la moelle osseuse hématopoïétique contenue dans les vertèbres lombaires représente 19,7% de la moelle osseuse totale chez le chien (Rowe JA. *et al.*, 2019). Par ailleurs, la moelle osseuse contenue dans les vertèbres lombaires est entièrement de la moelle osseuse hématopoïétique pour les chiens dont l'âge correspond à celui des animaux d'expérimentation utilisés.

Actuellement, il n'existe pas de S-facteur connu pour la moelle osseuse hématopoïétique pour un modèle canin (Padilla L. *et al.*, 2007). Le S-facteur retenu pour le calcul de la dose autoabsorbée a été extrapolé à partir des données connues chez l'Homme pour un enfant de 5 ans (gabarit comparable) (Stabin MG. *et al.*, 2005). Une pondération par la masse de moelle osseuse hématopoïétique a été effectuée (Hindorf C. *et al.*, 2010). La valeur retenue est de 2,4.10⁻⁴ mGy.MBq⁻¹.s⁻¹. Précisons, dans ce cas précis que, quel que soit le fantôme utilisé (5 ans, 10 ans, 15 ans), nous obtenons une valeur du même ordre de grandeur. L'activité cumulée a été déterminée à l'aide d'une régression non linéaire de type biexponentielle pour le chien BAC.ALI et de type monoexponentielle pour les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI. Les résultats sont présentés dans le <u>Tableau 33</u>.

La dose absorbée par mégabéquerel injecté la plus élevée, d'une valeur de 6,6 ± 0,5 mGy.MBq⁻¹, est évaluée pour l'animal NIA.ALI. En se plaçant dans le contexte d'un essai clinique

de RIT anti-CD22 au palier le plus élevé, à savoir 185 MBq.m⁻², un animal de 10 kg (0,46 m²) recevrait une dose à la moelle osseuse de 0,6 Gy.

ANIMAL	BAC.ALI	NOR.ALI	NIA.ALI
Masse de MOH dans les vertèbres lombaires (g)	27,8	32,8	32,8
S-facteur pondéré (mGy.MBq ⁻¹ .s ⁻¹)	5,67.10-4	4,8.10-4	4,8.10-4
Dose auto-absorbée pour la MOH totale (mGy.MBq ⁻¹)	6,6 ± 0,5	5,6 ± 0,4	6,2 ± 0,5

<u>Tableau 33 :</u> Doses auto-absorbées à la moelle osseuse hématopoïétique (MOH) par mégabéquerel injecté calculées chez des chiens sains dans le cadre d'une radioimmunothérapie anti-cCD22 réalisée avec le radiopharmaceutique ⁹⁰Y-DOTA-10C6 avec co-injection d'anticorps froid 10C6 pour une dose totale d'anticorps de 1,5 mg.kg⁻¹.

L'évaluation du comportement du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 permet de déterminer l'activité cumulée au sein de la moelle osseuse des vertèbres lombaire et les doses auto-absorbées qui en découlent dans le cadre d'une RIT anti-cCD22 avec l'anticorps ⁹⁰Y-DOTA-10C6. MOH : moelle osseuse hématopoïétique.

4. EVALUATION DE LA PART DE LA DOSE DEPOSEE AUX ORGANES LIEE A LA CIRCULATION DU RADIOPHARMACEUTIQUE DANS LE SANG ET A SON ACCUMULATION DANS LE PARENCHYME TISSULAIRE

Dans cette section, nous allons différencier la dose déposée aux organes liée à la circulation du radiopharmaceutique dans le compartiment vasculaire des organes, c'est à dire à la présence du radiopharmaceutique dans le volume sanguin des organes, de la dose déposée aux organes liée à la présence du radiopharmaceutique dans le compartiment extravasculaire des organes, correspondant aux espaces interstitiels ainsi qu'aux cellules du parenchyme.

L'objectif de ce travail est d'essayer de mettre en évidence les caractéristiques du catabolisme du radioisotope utilisé et de la fixation spécifique ou non de ce radiopharmaceutique.

4.1. Calcul du volume sanguin des organes : foie, reins, rate, poumons et moelle osseuse

4.1.1. Caractéristiques du radiopharmaceutique ^{99m}Tc-VASCULOCIS injecté à trois chiens d'expérimentation

Afin de déterminer le volume sanguin circulant des organes canins, il a été choisi de travailler avec de l'albumine. En effet, cette protéine n'est que peu ou pas éliminée par les reins. Ainsi 10 mg d'albumine (Vasculocis®) ont été radiomarqués avec 2,5 GBq de technetium-99m. Le rendement de marquage déterminé par chromatographie sur couche mince est de 96%.

Une étude de stabilité du radiopharmaceutique ^{99m}Tc-VASCULOCIS dans le sérum canin a été réalisée en considérant qu'en moyenne, les chiens avaient reçu une injection de 150 MBq dans un volume sanguin circulant de 1 L, correspondant à environ 500 mL de plasma. Ainsi une activité de 0,3 MBq du radiopharmaceutique ^{99m}Tc-VASCULOCIS a été incubée dans 1 mL de plasma de chien frais pendant 4 h à 37°C, et des chromatographies sur couche mince ont été réalisées régulièrement au cours de cette période.

Les résultats des chromatographies sur couche mince ont montré que le radiomarquage du radioconjugué ^{99m}Tc-VASCULOCIS est stable au cours du temps, le rendement de marquage restant supérieur ou équivalent à 96%, quelles que soient les conditions d'incubation.

4.1.2. Détermination du volume sanguin des organes chez des chiens sains d'expérimentation

L'albumine humaine est une protéine de haut poids moléculaire (65 kDa) qui se maintient dans la circulation sanguine pendant au moins 4 h. Ainsi, en dehors du compartiment vasculaire, il n'est pas détecté de concentration importante de radioactivité après injection du radiopharmaceutique ^{99m}Tc-VASCULOCIS (données fournies dans le résumé des caractéristiques produit). Ainsi une acquisition TEMP/CT réalisée immédiatement après l'injection du radiopharmaceutique ^{99m}Tc-VASCULOCIS permet de déterminer l'activité présente dans 1 g de l'organe d'intérêt et de calculer, en prenant comme référence l'activité détectée dans 1 g de sang (contenu dans un tube imagé sur le flanc gauche de l'animal), le volume sanguin de l'organe étudié. Trois chiens sains d'expérimentation ont reçu une injection de ^{99m}Tc-VASCULOCIS sous anesthésie générale : les activités injectées sont répertoriées dans le <u>Tableau 34</u> ainsi que le délai existant entre l'injection sous forme de bolus du radiopharmaceutique ^{99m}Tc-VASCULOCIS et le début de l'acquisition TEMP.

Animal	Activité injectée	Délai injection - TEMP
NOR.ALI	211,8 MBq	9 minutes
NIA.ALI	128,5 MBq	38 minutes
NOU.ALI	104 MBq	30 minutes

<u>Tableau 34 :</u> Activités injectées de ^{99m}Tc-VASCULOCIS et délai existant entre l'injection du bolus du radiopharmaceutique et le début de l'acquisition TEMP.

En moyenne, les chiens ont reçu 148,1 ± 57 MBq de ^{99m}Tc-VASCULOCIS (ce qui correspond à la posologie pédiatrique recommandée) et l'acquisition TEMP/TDM a été réalisée moins d'une heure après l'injection.

L'évaluation de l'activité présente dans 1 g de sang (tube de sang imagé) et dans les volumes d'intérêt (corps entier, foie, reins, rate, poumons et vertèbres lombaires), définie par contourage avec le logiciel 3D-Slicer, permet de calculer le volume de sang circulant contenu dans chacun de ces volumes d'intérêt. Le <u>Tableau 35</u> récapitule les résultats obtenus pour la détermination du rapport masse sanguine / masse du volume d'intérêt ainsi que pour la détermination du volume de sang par unité de masse du volume d'intérêt. La valeur 88 ± 4,1 mL.kg⁻¹ correspondant au volume sanguin rapporté à la masse de l'animal est concordante avec les données de la littérature qui indiquent un volume sanguin de 85 mL.kg⁻¹ dans l'espèce canine (Diehl KH. *et al.*, 2001). Le foie et les reins, très vascularisés, contiennent respectivement 346,1 ± 42 et 384,8 ± 39,5 mL.kg⁻¹ de sang circulant. Les poumons contenant majoritairement de l'air, leur masse est due en grande partie à la présence de sang dans les vaisseaux sanguins avec un volume de sang circulant rapporté à la masse de 577,6 ± 76,1 mL.kg⁻¹. Soulignons toutefois que ces informations ne sont pas disponibles dans la littérature, rendant la comparaison de nos données impossible.

La moelle osseuse hématopoïétique, au niveau des vertèbres lombaires, est localisée dans la fraction trabéculaire de ces os, le tout étant entouré d'os cortical. Cette répartition des tissus osseux et hématopoïétiques nous amène à estimer le volume sanguin contenu dans les vertèbres lombaires sans distinguer le volume sanguin de la moelle osseuse hématopoïétique en particulier. En effet, les cellules de la MOH, dans un contexte de RIT, peuvent être irradiées par les rayonnements bêta libérés par les molécules de radiopharmaceutique circulant dans les vaisseaux sanguins osseux tout aussi bien que par celles circulant dans les sinus médullaires. Afin de déterminer le volume de distribution de l'albumine dans le compartiment contouré « vertèbres lombaires », nous nous sommes appuyés sur les données de la littérature : nous avons ainsi pu déterminer que les vertèbres lombaires contiennent 27,6 mL de sang par kg d'organe. Plus de 85% de ce volume concerne la moelle osseuse hématopoïétique, le tissu osseux étant lui peu vascularisé et très dense. Enfin la masse de sang compte pour 2,9% de la masse totale des vertèbres lombaires (Morris MA. *et al.*, 1982 ; Polig E. et Jee WSS., 1989 ; Zhou JJ. *et al.*, 2015).

En exploitant nos données expérimentales, nous obtenons une valeur de 42,7 ± 7,5 mL.kg⁻¹ de sang circulant, la masse de sang comptant pour 4,4% de la masse totale des vertèbres lombaires. Cependant, il est important de souligner que le contourage du volume « vertèbres lombaires » a été réalisé au-delà des limites anatomiques des os concernés, afin de prendre en compte la totalité du signal provenant de la circulation du ^{99m}Tc-VASCULOCIS. Ce faisant, nous prenons en compte le signal lié à la présence de ce même radioconjugué dans le tissu musculaire entourant les vertèbres ainsi qu'une partie du signal en provenance de l'aorte, ventrale à la colonne vertébrale.

Nos données expérimentales étant trop approximatives, il a été choisi de ne conserver que les valeurs obtenues dans la littérature pour les calculs ultérieurs.

Volume d'intérêt	Masse de sang / masse du volume d'intérêt (%)	Volume sang / masse volume d'intérêt (mL.kg ⁻¹)	
Corps entier	9,2 ± 0,4	88,8 ± 4,1	
Foie	36,3 ± 4,4	346,1 ± 42	
Reins	$40,4 \pm 4,1$	384,8 ± 39,5	
Rate	9,8 ± 0,3	93,2 ± 3,3	
Poumons	60,6 ± 8	577,6 ± 76,1	
Vertèbres lombaires	4,4 ± 0,8 (2,9)	42,7 ± 7,5 <i>(27,6)</i>	

Tableau 35 : Volume sanguin circulant des organes d'intérêt canins.

Le volume sanguin total circulant moyen d'un chien est de 88 \pm 4,1 mL.kg⁻¹. Les données en italiques sont celles extrapolées de la littérature.

4.2. Evaluation de la distribution du pourcentage d'activité injectée présente dans les organes en lien avec leur volume sanguin

Connaissant le volume sanguin des organes ainsi que l'activité présente dans un volume sanguin imagé aux cotés de l'animal dans le lit de la TEMP, il est possible de calculer la fraction d'activité dans un organe en lien avec la présence du radiopharmaceutique étudié dans le compartiment vasculaire de ce même organe. Il est ainsi possible d'en déduire la valeur de la fraction d'activité injectée par kilogramme d'organe due à la présence du radiopharmaceutique dans le parenchyme tissulaire de l'organe considéré. La <u>Figure 47</u> illustre cette distribution du pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe chez les chiens BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI.

L'activité présente dans le foie, la rate et la moelle osseuse des vertèbres lombaires est principalement due à l'accumulation du radiopharmaceutique dans le parenchyme tissulaire de ces organes. Pour la rate et la moelle osseuse hématopoïétique, ceci s'explique par la présence de cellules exprimant le CD22 à leur surface et est en faveur d'une fixation spécifique de ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans ces deux organes. En ce qui concerne le foie, la part d'activité imputée à la présence du radiopharmaceutique dans le compartiment extravasculaire peut-être liée d'une part à une fixation spécifique de l'anticorps ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans cet organe, mais également à une accumulation d'indium-111 libre et de produits de dégradation du radiopharmaceutique dans les voies biliaires. En effet, le métabolisme d'élimination de l'indium libre est principalement hépatique, tout comme la voie de dégradation des anticorps murins. Cependant, les études d'immunohistochimie sur coupes paraffinées ont montré que l'anticorps anti-CD22 10C6 se fixe dans le parenchyme hépatique. Toutefois, l'argument en faveur d'une accumulation de produits de dégradation du radiopharmaceutique dans le parenchyme hépatique est renforcé par la mise en évidence d'un plus fort pourcentage d'activité injectée par kilogramme de foie chez BAC.ALI en comparaison avec les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI. En effet, l'immunoréactivité du radiopharmaceutique injecté à BAC.ALI était bien inférieure à celle du radiopharmaceutique injecté aux deux autres chiennes (53,4% versus 80,1%).



<u>Figure 47</u>: Imputation du pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe lié à la circulation du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le compartiment vasculaire ainsi que lié à sa présence dans le parenchyme tissulaire chez des chiens sains (BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI) : étude du foie, des reins, des poumons, de la rate et de la moelle osseuse hématopoïétique des vertèbres lombaires.

Les données présentées ne sont pas corrigées de la décroissance. L'activité présente dans le foie, la rate et la moelle osseuse hématopoïétique des vertèbres lombaires est majoritairement liée à une accumulation de la radioactivité dans le compartiment extravasculaire de ces organes. Des différences sont observées pour le foie et les reins selon la valeur de l'immunoréactivité du radiopharmaceutique : 53,4% pour BAC.ALI versus 80,1% pour NOR.ALI et NIA.ALI.

L'activité détectée dans le rein gauche est majoritairement imputable à la circulation du radiopharmaceutique dans le compartiment vasculaire, tandis que la distribution de l'activité détectée dans le rein droit est un intermédiaire entre ce qui est observé dans le foie et dans le rein gauche. Cette variation d'un rein à l'autre peut s'expliquer par l'anatomie de la cavité abdominale dans l'espèce canine : en effet, en situation physiologique normale, le rein droit est enchâssé pour moitié dans le processus caudé du lobe caudé du foie alors que le rein gauche est plus caudal et n'a pas de contact avec le foie, ainsi qu'illustré dans la <u>Figure 48</u>. Cette proximité anatomique du rein droit et du foie s'accompagne d'une imprécision de mesure de l'activité détectée dans le rein droit : une part de l'activité devant être attribuée au parenchyme hépatique est rapportée au rein droit, ce qui explique l'apparente accumulation du radiopharmaceutique dans le compartiment extravasculaire de cet organe et la surestimation de l'activité détectée. Ce phénomène, bien que de moindre ampleur, est également observé pour les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI.

Il existe cependant une différence entre le chien BAC.ALI et les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI : les valeurs de pourcentage d'activité injectée par kilogramme de rein dans le compartiment vasculaire sont supérieurs chez BAC.ALI. Les différences de fixation dans le parenchyme rénal entre BAC.ALI et les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI sont probablement liées aux différences d'immunoréactivité du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 injecté chez BAC.ALI d'une part (53,4%) et chez NOR.ALI et NIA.ALI d'autre part (80,1%). Elles se traduisent par une élimination plus rapide par le rein de fragments protéiques radiomarqués et donc une localisation de la radioactivité dans le parenchyme rénal plutôt que dans le compartiment vasculaire.

L'imputabilité de l'activité détectée dans les poumons varie d'un lot d'anticorps à un autre : nous observons une accumulation de l'activité dans le parenchyme pulmonaire du chien BAC.ALI tandis que cette observation n'est pas retrouvée chez les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI. Là encore il est probable que l'immunoréactivité soit un paramètre déterminant. Il est en effet fréquent d'observer une accumulation d'activité dans les poumons des radiopharmaceutiques de mauvaise qualité.



<u>Figure 48 :</u> Anatomie de la cavité abdominale dans l'espèce canine : positionnement relatif du foie et des reins.

(A) La partie crâniale du rein droit (pourtour bleu) est enchâssé dans le processus caudé du lobe caudé (colorié en vert) et (B) le contact avec le foie se prolonge sur près de 50% de son grand axe. (C_1 et C_2) Le rein gauche (colorié en bleu) est plus caudal et est en contact avec la rate dans sa portion crâniale. (D, E) Le rein droit dans sa portion crâniale et la quasi-totalité du rein gauche n'ont pas de contact avec des organes sièges d'une accumulation de l'activité injectée.

4.3. Calcul de la dose absorbée aux organes liée à l'accumulation du radiopharmaceutique dans le parenchyme tissulaire de l'anticorps dans un contexte de RIT à l'yttrium-90

En connaissant le pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe au cours du temps, en tenant compte des demi-vies respectives de l'indium-111 et de l'yttrium-90, il est possible de déterminer la fraction de dose attribuable à la circulation du radiopharmaceutique dans le sang de l'animal ainsi que celle liée à la présence du radiopharmaceutique dans le parenchyme tissulaire de ce même organe (métabolisme, fixation spécifique et circulation dans les espaces interstitiels). Cette répartition de la dose auto-absorbée a été évaluée pour les chiens BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI dans les organes suivants : foie, reins, poumons, rate et moelle osseuse hématopoïétique. Les données moyennes sont présentées dans le <u>Tableau 36</u>.

Organe	% dose auto-absorbée liée à la présence de sang circulant		ée liée à la 6 % dose auto-absor circulant l'accumulation dans tissulai	
	BAC.ALI	NOR.ALI et NIA.ALI	BAC.ALI	NOR.ALI et NIA.ALI
Foie	7	19,5 ± 0,5	93	80,5 ± 0,5
Reins	32,7	58,4 ± 2,5	67,3	41,6 ± 2,5
Poumons	53,2	83,5 ± 7,1	46,8	16,5 ± 7,1
Rate	44,4	48,1 ± 2,0	55,6	51,9 ± 2,0
MOH vert.lomb.	7,6	7,6 ± 0,7	92,4	92,4 ± 0,7

<u>Tableau 36</u> : Part de la dose auto-absorbée des organes (foie, reins, poumons, rate et moelle osseuse hématopoïétique) liée à la circulation du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le compartiment sanguin et de celle liée à son accumulation dans le parenchyme tissulaire, chez trois chiens sains (BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI).

La fraction de la dose auto-absorbée imputée à la présence du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le parenchyme tissulaire du foie, des reins et des poumons varie entre les deux lots de radiopharmaceutique. Pour le chien BAC.ALI, l'accumulation dans le parenchyme tissulaire de ces trois organes est très supérieure à celle observée pour les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI . En ce qui concerne la rate et la moelle osseuse hématopoïétique, les valeurs de la fraction de la dose auto-absorbée imputée à la présence du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans leur parenchyme tissulaire sont du même ordre de grandeur quel que soit le lot d'anticorps radiomarqué.

La fraction de la dose auto-absorbée imputée à la présence du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le parenchyme tissulaire du foie, des reins et des poumons varie entre les deux lots de radiopharmaceutique. Pour le chien BAC.ALI, l'accumulation dans le parenchyme tissulaire de ces trois organes est très supérieure à celle observée pour les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI : 93,0 versus 80,5 % pour le foie, 67,3 versus 41,6% pour les reins et 46,8 versus 16,5% pour les poumons. Cette différence peut s'expliquer probablement par le métabolisme du radiopharmaceutique : le radioimmunoconjugué injecté au chien BAC.ALI était de moins bonne qualité que celui injecté aux chiennes NOR.ALI et NIA.ALI. Les voies de dégradation et d'élimination du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 sont principalement hépatique et rénale. De plus, le foie étant un organe de grande taille dans lequel s'enchâsse le rein droit tout en étant adjacent aux poumons. Nous pouvons supposer que « l'excès » d'activité détectée dans le parenchyme hépatique du chien BAC.ALI se répercute sur les reins et les poumons. L'évolution de l'immunoréactivité au cours du temps effectuée sur le plasma de BAC.ALI (Figure 49) montre une augmentation de la valeur de l'immunoréactivité du radiopharmaceutique circulant dans le sang durant les premières 48 h. Ces résultats sont cohérents avec une élimination durant cette période des produits de dégradation du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6.



Immunoréactivité du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 présent dans le plasma de BAC.ALI

<u>Figure 49 :</u> Evolution au cours du temps de l'immunoréactivité du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 présent dans le plasma du chien BAC.ALI.

L'immunoréactivité du radiopharmaceutique présent dans le sang du chien BAC.ALI est proche de 50% le jour de l'injection et atteint 73,9% à J1 et 91,4% à J2.

En ce qui concerne la rate et la moelle osseuse hématopoïétique, les valeurs de la fraction de la dose auto-absorbée imputée à la présence du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans leur parenchyme tissulaire sont du même ordre de grandeur quel que soit le lot d'anticorps radiomarqué : $46,8 \pm 2,6\%$ en moyenne dans la rate et $92,4 \pm 0,5\%$ en moyenne dans la moelle osseuse hématopoïétique. Soulignons que la quasi-totalité de la dose auto-absorbée calculée pour la moelle osseuse hématopoïétique par mégabéquerel injecté est due à l'accumulation du radiopharmaceutique dans le compartiment extravasculaire de l'organe : l'antigène ciblé, le cCD22, étant exprimé par les cellules hématopoïétiques, nous pouvons supposer qu'il s'agit ici d'une fixation spécifique.

Partie E. APPORT DU MODELE SPONTANE ANIMAL DE DLBCL : ETUDE DE L'EFFET DE LA VARIATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DU RADIOPHARMACEUTIQUE INJECTE PAR INJECTION DE L'ANTICORPS ANTIcCD22¹¹¹In-DOTA-10C6 EN PRESENCE OU EN L'ABSENCE D'UNE CO-INFUSION D'ANTICORPS FROID 10C6

Les résultats présentés dans la Partie D du Chapitre RESULTATS ont permis de valider la faisabilité de la radioimmunothérapie anti-CD22 à l'yttrium-90 chez des chiens sains du fait de la faiblesse des doses absorbées calculées pour les différents organes.

En situation de maladie, les résultats de la dosimétrie pourront être différents et variables d'un animal à l'autre, selon le stade du DLBCL (envahissement ou non de la rate, du foie et de la moelle osseuse hématopoïétique) mais également selon des critères individuels de pharmacocinétique du radiopharmaceutique injecté.

Le premier objectif de cette Partie E du Chapitre RESULTATS est de valider le ciblage des cellules tumorales surexprimant le cCD22 chez un chien spontanément atteint de DLBCL en se plaçant dans les mêmes conditions que celles suivies dans les essais cliniques de RIT chez l'Homme, à savoir l'administration par voie intraveineuse du radiopharmaceutique et le vecteur seul de manière concomitante pour une dose totale en anticorps de 1,5 mg.kg⁻¹.

Toutefois, peu de données sont disponibles dans la littérature scientifique qui justifient de la quantité totale d'anticorps injectée ni du schéma d'administration. Par exemple, la radioimmunothérapie des lymphomes à l'aide d'un anticorps anti-CD20 se fait avec administration d'une dose de charge de l'anticorps froid : l'anticorps froid (250 mg.m⁻²) est administré en amont (1 à 3 h) de l'injection de l'anticorps radiomarqué à l'yttrium-90 (Tennvall J. *et al.*, 2007). Dans le cadre des essais cliniques de radioimmunothérapie des lymphomes à l'aide d'un anticorps anti-CD22, l'épratuzumab, l'anticorps radiomarqué est injecté de manière simultanée avec le même anticorps froid (Kraeber-Bodéré F. *et al.*, 2017). Il s'agit alors d'une co-infusion ou encore co-injection.

Dans le cas de la co-infusion, la quantité d'anticorps froid injectée en même temps que l'anticorps radiomarqué influe sur l'activité spécifique du mélange administré, ce qui peut avoir des conséquences sur les doses auto-absorbées reçues par les organes et les masses tumorales (Muylle K. *et al.*, 2015 ; Blakkisrud J. *et al.*, 2018) . L'effet de la variation de l'activité spécifique n'a jamais été exploré chez l'Homme lors des essais de radioimmunothérapie réalisés avec l'épratuzumab, et nous nous proposons de l'aborder dans cette partie en réalisant une étude de dosimétrie chez des chiens sains en faisant varier l'activité spécifique du mélange injecté à ces animaux.

Enfin, le ciblage tumoral chez un chien spontanément malade sera également évalué lorsque l'activité spécifique du radiopharmaceutique injecté est fortement augmentée (absence de co-injection).

1. VALIDATION DU CIBLAGE TUMORAL CHEZ UN CHIEN SPONTANEMENT MALADE

1.1. Recrutement d'un chien spontanément malade

1.1.1. Obtention du consentement éclairé des propriétaires

Un chien de compagnie ayant développé un DLBCL a été présenté au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Oniris (CHUV) à l'initiative de ses propriétaires et le clinicien l'ayant reçu en consultation nous l'a adressé en vue d'une inclusion dans un protocole de recherche clinique. L'animal a pu intégrer notre étude restreinte à sa phase d'imagerie phénotypique, les données de dosimétrie chez les chiens sains n'étant pas suffisantes à l'époque pour garantir la sécurité de la phase thérapeutique.

Ce premier chien concerné par notre étude est un mâle entier Cavalier King Charles de 10 ans, pesant 8 kg et identifié AMI.NIC dans le reste du texte. Son inclusion a été réalisée en avril 2015 après une première consultation ayant abouti à la suspicion diagnostique de lymphome multicentrique, puis une seconde consultation d'inclusion au cours de laquelle la lettre d'information et le document de « consentement éclairé » ont été présentés aux propriétaires.

1.1.2. Diagnostic clinique et stade du DLBCL

Le diagnostic clinique de lymphome B repose sur les signes cliniques présent chez l'animal concerné. Chez AMI.NIC, l'examen clinique révèle une adénomégalie sévère généralisée (hypertrophie des nœuds lymphatiques périphériques et abdominaux) associée à des signes généraux non spécifiques tels qu'une apathie, une dysorexie, un amaigrissement et une hyperthermie. L'ensemble des signes cliniques mentionnés ci-dessus est très en faveur d'un lymphome multicentrique de type B (les lymphomes multicentriques de type T étant rares).

La réalisation d'un bilan d'extension détaillé permet de renseigner le stade clinique du lymphome en précisant le degré d'envahissement de l'organisme. Les résultats des examens complémentaires entrepris pour cet animal figurent dans le <u>Tableau 37</u>.

Examens complémentaires	AMI.NIC	
Radiographies thoraciques	Adénomégalie sus-sternale	
Echoaranhie ahdominale	Adénomégalie généralisée et	
	suspicion d'infiltration splénique	
Numération formule	Légère anémie, lymphopénie	
Muéle angrere e	Non conclusif (prélèvements	
Myelogramme	paucicellulaires et hématiques)	

<u>Tableau 37</u> : Résultats des examens complémentaires réalisés dans le cadre du bilan d'extension suite au diagnostic clinique de lymphome B multicentrique chez AMI.NIC. AMI.NIC est atteint d'un lymphome multicentrique de stade clinique IV.

L'ensemble de ces résultats permet de déterminer le stade de la maladie : AMI.NIC est atteint d'un lymphome multicentrique de stade IV en l'absence de données fiables vis-à-vis de l'envahissement du compartiment médullaire. Par ailleurs, AMI.NIC rentre dans la catégorie du sous-stade b, des signes cliniques généraux étant associés à la polyadénomégalie.

1.1.3. Analyse histologique et immunohistochimique des nœuds lymphatiques envahis par le DLBCL

Le diagnostic de certitude de lymphome ne peut être obtenu qu'à l'aide d'une analyse cytologique ou histologique. Dans notre étude, il a été choisi de réaliser des prélèvements biopsiques, seule technique permettant de réaliser à la fois une analyse histologique combinée à une analyse immunohistochimique, cette dernière étant indispensable pour phénotyper le processus tumoral en cours.

Le nœud lymphatique mandibulaire droit du chien AMI.NIC a été retiré chirurgicalement sous anesthésie générale. L'analyse histologique et immunohistochimique a révélé un envahissement diffus du nœud lymphatique par un lymphome malin ganglionnaire B (positivité pour les marqueurs CD20 et Pax5, négativité pour le marqueur CD3) à grandes cellules de type centroblastique (DLBCL), de haut grade de malignité (Ki-67 > 90%) et surexprimant le cCD22. Les détails de cette analyse figurent en <u>Annexe 5</u> et sont illustrés dans la <u>Figure 50</u>.



<u>Figure 50 :</u> Immunomarquages réalisés sur les lames histologiques issues du nœud lymphatique mandibulaire droit du chien AMI.NIC.

Les imunomarquages révèlent un lymphome d'immunophénotype B (CD3 négatif, Pax5 et CD20 positif), hautement prolifératif (Ki-67 > 90%) surexprimant le CD22 canin.

Des analyses immunohistochimiques supplémentaires ont été réalisées afin de caractériser plus finement le type de DLBCL en cours de développement chez AMI.NIC (<u>Figure 51</u>). L'algorithme de Hans appliqué à ce lymphome révèle qu'il s'agit d'un DLBCL double négatif pour CD10 et BCL-6 et positif pour MUM-1, c'est à dire un DLBCL non-centrogerminatif, de plus mauvais pronostic. Le score de double hit a également été déterminé : il s'agit d'un DLBCL positif pour BCL-2 et c-MYC, c'est-à-dire un DLBCL-DE, de pronostic plus sombre.



<u>Figure 51 :</u> Détermination par analyse immunohistochimique du sous-type et du double score de hit du DLBCL d'AMI.NIC.

L'algorithme de Hans est en faveur d'un DLBCL non centro-germinatif (CD10 négatif, BCL-6 négatif, MUM-1 positif) et le score de double hit est de 2 (BCL-2 positif, c-MYC positif).

1.1.4. Evaluation de l'expression du cCD22 dans les nœuds lymphatiques tumoraux par cytométrie en flux

Lors de l'exérèse chirurgicale du nœud lymphatique mandibulaire droit d'AMI.NIC, des prélèvements tissulaires ont été placés dans un milieu de conservation et pris en charge afin de réaliser une étude de cytométrie en flux. Bien qu'elle n'apporte pas autant d'informations sur le processus cancéreux en cours que l'analyse histologique et immunohistochimique réalisée en parallèle, cette étude permet d'accéder à certaines informations phénotypiques plus précocement. En 24 à 48 h (contre 3 à 4 j pour l'analyse histologique et immunohistochimique), il est possible de dire si le lymphome de l'animal surexprime l'antigène cCD22 et de trier les animaux candidats pour réaliser une imagerie phénotypique avec l'anticorps ¹¹¹In-DOTA-10C6.

Pour AMI.NIC, l'analyse par cytométrie en flux a révélé, dans les prélèvements tumoraux réalisés, l'existence d'une population cellulaire composée de cellules de grande taille et fortement positives pour le cCD22, ainsi que le montrent la <u>Figure 52</u>. Le CD21 canin et le CD20 canin sont des facteurs d'expression membranaire de la lignée lymphoïde B.

Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par marquage immunohistochimiques (section 1.1.3.).



<u>Figure 52 :</u> Analyse par cytométrie en flux de l'expression du cCD21, cCD20 et cCD22 au niveau de la membrane des cellules tumorales du nœud lymphatique mandibulaire droit du chien AMI.NIC. Les cellules sont incubées en présence d'un unique anticorps murin ciblant l'un de ces trois marqueurs puis avec un anticorps secondaire couplé PE. Les cellules tumorales sont positives pour les trois marqueurs étudiés.

1.2. Imagerie phénotypique après injection de l'anticorps anti-cCD22¹¹¹In-DOTA-10C6

L'injection de l'anticorps monoclonal ¹¹¹In-DOTA-10C6 a été réalisée sous anesthésie générale, à un débit de perfusion très faible au début pour prévenir tout risque de réaction anaphylactique, puis à un débit respectant le taux horaire d'endotoxines maximal acceptable chez l'Homme (5 UI/kg/h).

Une première image phénotypique a été réalisée chez le chien AMI.NIC (9 ans, 8 kg) après administration par voie intramusculaire de L-asparaginase (KIDROLASE®, 400 UI.kg⁻¹). Cette étape de cytoréduction a été initiée quatorze jours avant la co-injection par voie intraveineuse du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 (31,3 MBq, activité spécifique égale à 128,6 MBq.mg⁻¹) avec le même anticorps 10C6 froid (11,8 mg). Au total, 12 mg d'anticorps ont

été injectés par voie intraveineuse avec une activité spécifique dans la seringue d'injection de 2,61 MBq.mg⁻¹.

L'acquisition TEMP/TDM a été réalisée 48 h et 34 min après le début de l'injection (J2). Il n'y a pas eu d'acquisition TEMP/TDM à J0 car le chien souffrait par ailleurs d'une insuffisance cardiaque (maladie valvulaire dégénérative mitrale) et il n'était pas souhaitable de prolonger l'anesthésie générale au-delà d'une heure. A J2, il est possible de mettre en évidence les principaux nœuds lymphatiques tumoraux encore hypertrophiés du chien AMI.NIC, qui sont les nœuds lymphatiques rétropharyngés et le nœud lymphatique mandibulaire gauche, ainsi qu'illustré sur la <u>Figure 53</u>. Les autres sites tumoraux ne sont pas visualisables avec cet examen d'imagerie, l'injection de L-asparaginase ayant été suivie d'une lyse tumorale massive rendant l'identification des nœuds lymphatiques de taille normale non visualisables ni sur le scanner ni sur l'acquisition TEMP.



Coupe transversale J2

Nœuds lymphatiques rétropharyngés

Nœud lymphatique mandibulaire gauche



Coupe sagittale J2

<u>Figure 53</u> : Acquisition TEMP/TDM réalisée 48 h après la co-injection intraveineuse du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 et de l'anticorps froid 10C6 chez le chien AMI.NIC après une étape de cytoréduction.

Le signal TEMP met en évidence les principaux nœuds lymphatiques encore hypertrophiés après l'étape de cytoréduction initiée deux semaines auparavant, soit les nœuds lymphatiques rétropharyngés et le nœud lymphatique mandibulaire gauche.

Deux autres imageries phénotypiques ont été effectuées suite à une deuxième injection d'¹¹¹In-DOTA-10C6 réalisée après un mois de chimiothérapie (protocole COPLA : L-asparaginase puis vincristine + cyclophosphamide / vincristine / vincristine à une semaine d'intervalle). A ce moment, AMI.NIC avait repris du poids et pesait 8,9 kg et tous les nœuds lymphatiques de l'animal étaient de taille normale. 19,61 MBq de ¹¹¹In-DOTA-10C6 (activité spécifique : 64 MBq/mg) ont été co-injectés avec 13,1 mg d'anticorps 10C6 froid. Au total, 13,4 mg d'anticorps ont été administrés par voie intraveineuse pour une activité spécifique dans la seringue d'injection de 1,5 MBq.kg⁻¹.

Les acquisitions TEMP/TDM ont été réalisées 1 heure et 31 minutes (J0) et 23 h et 41 minutes (J1) après le début de l'injection du radiopharmaceutique. A ces deux temps d'acquisition, il n'est pas possible de dégager au sein du bruit de fond un signal TEMP permettant de visualiser les nœuds lymphatiques tumoraux ou de souligner la rate. La Figure 54 illustre la diminution de la fixation du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 au niveau des nœuds lymphatiques rétropharyngés et mandibulaires depuis le début de la prise en charge thérapeutique avec un protocole de polychimiothérapie (traitement d'une durée d'un mois).

L'examen visuel des images obtenues ne permet pas de mettre en évidence une évolution particulière de la maladie dans les autres organes. Afin de déterminer l'efficacité du ciblage et l'activité dans ces organes, nous avons donc procéder à une quantification du signal déduit des images pour un calcul de pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe aux temps explorés.



Coupe transversale J1



Coupe sagittale J1

<u>Figure 54</u> : Acquisition TEMP/TDM réalisée 24 h après la co-injection intraveineuse du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 et de l'anticorps froid 10C6 chez le chien AMI.NIC après un mois de traitement par polychimiothérapie.

Le signal TEMP ne permet pas de mettre en évidence une infiltration tumorale dans les nœuds lymphatiques.

1.3. Pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe : comparaison avec les chiens sains

Etant donné l'état de santé du chien AMI.NIC, il n'a pas été possible de réaliser toutes les anesthésies successives nécessaires à la détermination de la pharmacocinétique dans les

organes du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6, qu'il s'agisse de l'injection ayant eu lieu après la cytoréduction (avril 2015) ou après le premier mois de polychimiothérapie (juin 2015). Toutefois, il est possible de déterminer pour les acquisitions TEMP/TDM obtenues à J2 en avril et à J1 en juin les pourcentages d'activité injectée par kilogramme d'organe pour le foie, les reins, la rate et les vertèbres lombaires. Ces données, présentées dans la <u>Figure 55</u>, peuvent être comparées à celles obtenues chez les chiens sains BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI.

Les pourcentages d'activité injectée par kilogramme de foie et de reins sont comparables pour l'animal malade et pour les animaux sains. Une différence dans les valeurs est observée pour la rate en avril et en juin, ainsi que pour la moelle osseuse hématopoïétique contenue dans les vertèbres lombaires en juin : les pourcentages d'activité injectée par kilogramme d'organe sont supérieurs chez l'animal malade (18,7% et 60,2% à J1 en juin respectivement), comparés aux données obtenues chez les animaux sains (3,3% et 9,0% pour BAC.ALI, 5,2% et 24,1% pour NOR.ALI et 5,6% et 25,1% chez NIA.ALI à J1 respectivement).

En confrontant ces données avec les informations fournies par les examens d'imagerie médicale réalisés en parallèle, il semblerait que la rate soit le siège d'une infiltration tumorale dès avril 2015, avec persistance d'une maladie résiduelle en juin 2015. Ce point a été confirmé lors de la rechute clinique après l'arrêt de la chimiothérapie : l'échographie abdominale a révélé des modifications échographiques du parenchyme splénique en faveur d'une invasion tumorale de type lymphomateux.

Malheureusement, l'analyse du myélogramme réalisé au moment du diagnostic n'a pas été concluante vis-à-vis d'un potentiel envahissement médullaire (prélèvement paucicellulaire). Cet examen invasif n'a pas été répété ultérieurement, l'évolution de l'insuffisance cardiaque de l'animal n'ayant pas permis de renouveler une anesthésie au moment de la rechute clinique. Nous pourrions toutefois suspecter que l'envahissement de la moelle osseuse hématopoïétique était effectif dès le diagnostic mais que l'étape de cytoréduction avant la première acquisition TEMP/TDM ne permet pas de mettre en évidence une valeur de pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe supérieure à ce qui est observé pour les animaux sains. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'en juin 2015, après un mois de traitement par polychimiothérapie, le pourcentage d'activité injectée par kilogramme au niveau des vertèbres lombaires est supérieur à celui des animaux sains.



<u>Figure 55 :</u> Evolution des pourcentages d'activité injectée par kilogramme de foie, reins, rate et moelle osseuse hématopoïétique au cours du temps après co-injection du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 et de l'anticorps froid 10C6 chez le chien AMI.NIC atteint de DLBCL avant et après un mois de traitement par polychimiothérapie : comparaison avec les données obtenues chez les chiens sains BAC.ALI, NOR.ALI et NIA.ALI.

Aucune différence n'est observée dans le foie et les reins entre l'animal malade et les animaux sains. Un pourcentage d'activité injectée par kilogramme de rate (avril et juin) et de moelle osseuse hématopoïétique (juin uniquement) plus élevé chez AMI.NIC par rapport aux animaux sains est en faveur d'une infiltration tumorale de la rate et de la moelle osseuse hématopoïétique.

2. EFFET DE LA VARIATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DU RADIOPHARMACEUTIQUE INJECTE ¹¹¹In-DOTA-10C6 SUR SA PHARMACOCINETIQUE

Dans la Partie D du Chapitre RESULTATS, trois chiens d'expérimentation ont reçu une injection du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 de faible activité spécifique (grande

quantité d'anticorps froid ajoutée) en vue d'étudier sa biodistribution. Nous avons démontré que selon la valeur d'immunoréactivité du radioconjugué, des variations sont observées notamment au niveau hépatique et rénal. Nous avons décidé de ne pas intégrer les résultats du chien BAC.ALI dans le reste de notre étude pour simplifier l'analyse.

Afin d'aborder l'influence de l'activité spécifique sur les doses déposées aux organes, deux chiennes saines d'expérimentation, DOR.ALI et DAI.ALI, ont reçu une injection de radiopharmaceutique associé à une faible quantité d'anticorps froid ajoutée. L'immunoréactivité de ce lot de radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 était comparable avec celle du radiopharmaceutique administré aux chiennes NOR.ALI et NIA.ALI (85,4% versus 80,1% respectivement).

Des acquisitions TEMP/TDM ont été réalisées aux différents temps suivant pour chacune des chiennes : J0 (1 h post-injection), J1, J2, J3 et J6 (excepté pour les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI pour cette dernière imagerie).

Rappelons également qu'une co-infusion, aussi appelée co-injection, désigne l'administration concomitante d'un vecteur radiomarqué mélangé avec ce même vecteur nu dans une unique seringue d'injection, aboutissant à une baisse de l'activité spécifique du radiopharmaceutique injecté. Dans notre travail, l'activité spécifique du radiopharmaceutique en présence de la co-infusion d'une grande quantité d'anticorps froid 10C6 est inférieure à 10 MBq.mg⁻¹, tandis qu'elle est supérieure à 50 MBq.mg⁻¹ en l'absence de co-infusion d'une grande quantité d'anticorps froid et radiomarqué ainsi que la valeur des activités spécifiques du mélange injecté pour chacune des chiennes figurent dans le <u>Tableau 38</u>.

Animal	¹¹¹ In-DOTA- 10C6	10C6	Masse totale en anticorps	Activité injectée	Activité spécifique dans la seringue
NOR.ALI (11,8 kg)	0,3 mg	17,4 mg	17,7 mg	39,6 MBq	2,2 MBq.mg ⁻¹
NIA.ALI (11,8 kg)	0,3 mg	17,4 mg	17,7 mg	37,4 MBq	2,1 MBq.mg ⁻¹
DOR.ALI (11 kg)	337 μg	413 µg	0,75 mg	39,7 MBq	52,9 MBq.mg ⁻¹
DAI.ALI (9,8 kg)	337 μg	413 µg	0,75 mg	37,9 MBq	50,5 MBq.mg ⁻¹

<u>Tableau 38 :</u> Caractéristiques des injections du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 réalisées chez 4 chiennes d'expérimentation saines (NOR.ALI, NIA.ALI, DOR.ALI et DAI.ALI).

Chez les chiennes ayant reçu une co-infusion d'une grande quantité d'anticorps froid 10C6, la quantité totale d'anticorps injectée est de 1,5 mg.kg⁻¹, la fraction du radioimmunoconjugué variant entre 0,3 et 0,7 mg. L'activité spécifique du mélange injecté varie entre 2,1 et 7,3 MBq.mg⁻¹. Chez les autres chiennes, la quantité totale d'anticorps injectée est de 0,75 mg et l'activité spécifique dans la seringue d'injection varie entre 50,5 et 52,9 MBq.mg⁻¹.

2.1. Pharmacocinétique sanguine

La pharmacocinétique sanguine du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 administré en l'absence d'une grande quantité d'anticorps froid 10C6 (activité spécifique élevée), a été déterminée selon les deux méthodes décrites précédemment : détermination de l'activité présente dans 1 g de sang à partir des imageries TEMP/TDM et détermination au compteur gamma du nombre de coups détectés dans 1 g de sang (le tube imagé étant le même tube que celui passé au compteur gamma). Les résultats obtenus sont présentés dans la <u>Figure 56</u> et comparés dans le <u>Tableau 39</u> avec ceux obtenus lorsqu'une grande quantité d'anticorps froid 10C6 est injecté de manière concomitante au radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6.



Figure 56 : Pharmacocinétique sanguine chez deux chiennes d'expérimentation saines du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 en l'absence de co-infusion de l'anticorps froid 10C6. Le comportement du radiopharmaceutique peut être évalué selon deux méthodes : calcul du pourcentage d'activité injectée corrigée de la décroissance par g de sang à partir des acquisitions TEMP/TDM (A) et détermination du nombre de coups corrigés de la décroissance par g de sang détectés au compteur gamma (B). Une régression non linéaire de type « décroissance mono-exponentielle » permet de déterminer la demi-vie biologique de l'anticorps DOTA-10C6 chez chacune de ces chiennes.

Retenons ici que la demi-vie biologique du radioimmunoconjugué ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le compartiment sanguin d'animaux sains à qui il a été administré avec une forte activité spécifique est en moyenne de $12,1 \pm 1,3$ h.

Ainsi, lorsque la quantité globale d'anticorps injectée diminue, la demi-vie sanguine biologique du radioimmunoconjugué est plus courte (12,1 h versus 32,1 h).

Animal	¹ ⁄ ₂ vie biologique sanguine de l'anticorps 10C6		
Ammai	Compteur gamma	Quantification TEMP	
NOR.ALI	36,8 ± 2,3 h	32,4 ±4,1 h	
NIA.ALI	30,2 ± 5,8 h	28,8 ±3,4 h	
DOR.ALI	12,6 ±0,1 h	10,3 ± 0,1 h	
DAI.ALI	13,4 ± 0,3 h	12,1 ± 0,3 h	

<u>Tableau 39</u> : Demi-vies biologiques du radioimmunoconjugué ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le sang de quatre chiennes d'expérimentation pour lesquels l'activité spécifique du produit injecté diffère. Chez les chiennes ayant reçu une co-infusion d'une grande quantité d'anticorps froid 10C6 (NOR.ALI et NIA.ALI), la demi-vie biologique du radioconjugué est en moyenne de $32,1 \pm 3,5$ h. Chez les chiennes ayant reçu une injection d'un produit présentant une activité spécifique élevée (DOR.ALI et DAI.ALI), la demi-vie biologique du radioconjugué est en moyenne de $12,1 \pm 1,3$ h.

2.2. Biodistribution dans les organes sains

Le travail effectué dans cette section est similaire à celui présenté dans la section 2. de la Partie C du Chapitre RESULTATS. Ainsi les courbes de tendance du pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe (ou de compartiment) pour les 5 chiens sains ayant reçu une injection du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 sont présentées dans la <u>Figure 57</u>.

Le comportement du radioimmunoconjugué ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le corps entier, les reins, les poumons et le foie est similaire chez toutes les chiennes saines imagées, quelle que soit l'activité spécifique de la préparation pharmaceutique contenue dans la seringue d'injection. En regroupant les données des quatre animaux imagés, il est possible de déterminer une courbe de tendance en réalisant une régression non linéaire de type « décroissance mono-exponentielle » pour le corps entier, les reins, et le foie, et de type « décroissance bi-exponentielle » pour les poumons.

Le comportement du radioimmunoconjugué ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans la rate et la moelle osseuse hématopoïétique est différent selon la quantité d'anticorps injectée. Les courbes de tendance ont été déterminées par régression non linéaire de type « décroissance monoexponentielle ». Pour ces deux organes, le pourcentage d'activité injectée par kilogramme est supérieur lorsque l'administration du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 se fait en l'absence de co-injection d'une grande quantité d'anticorps froid (chiennes DOR.ALI et DAI.ALI).

Cette différence peut s'expliquer par la vascularisation très développée de ces deux organes et la présence dans leur parenchyme de nombreuses cellules exprimant le CD22 de manière physiologique : le radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6, injecté en l'absence d'anticorps froid 10C6, est piégé très rapidement dans la rate et la moelle osseuse hématopoïétique de manière durable. Par ailleurs, lorsque la quantité d'anticorps injectée

augmente, le pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe diminue : la fixation de l'anticorps radiomarqué dans la rate et la MOH en fonction de la quantité d'anticorps administrée n'est pas une fonction linéaire. Tout ceci est en faveur d'un phénomène de saturation du parenchyme splénique et médullaire par l'anticorps froid co-injecté avec le radiopharmaceutique, phénomène qui n'est pas retrouvé lorsque l'activité spécifique est élevée.



<u>Figure 57</u>: Pharmacocinétique du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 avec et sans co-injection d'anticorps froid 10C6 chez quatre chiennes saines (NOR.ALI, NIA.ALI, DOR.ALI et DAI.ALI) : corps entier, reins, foie, poumons, rate et moelle osseuse hématopoïétique (MOH) des vertèbres lombaires.

Le comportement du radiopharmaceutique au niveau du corps entier et dans les reins, le foie et les poumons est identique pour les 4 animaux : il est évalué en déterminant le pourcentage d'activité injectée par kg à partir des acquisitions TEMP/TDM. En ce qui concerne la rate et la MOH des vertèbres lombaires, une différence est observée entre les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI et les chiennes DOR.ALI et DAI.ALI : le profil cinétique est similaire mais le pourcentage d'activité injectée par kilogramme est supérieur lorsque l'injection du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 n'est pas accompagnée d'une co-injection d'anticorps froid 10C6.

Il est notable que les biodistributions corps entier à forte et à faible activité spécifique sont superposables. La diminution à forte activité spécifique de la demi-vie biologique sanguine n'est donc pas liée au catabolisme de l'anticorps mais plutôt à une différence de cinétique de biodistribution dans les organes.

2.3. Etude dosimétrique dans un contexte de RIT à l'yttrium-90

2.3.1. Calcul des doses absorbées aux organes

L'étude dosimétrique réalisée chez les deux chiennes saines ayant reçu une forte quantité d'anticorps froid (activité spécifique faible) en même temps que l'anticorps radiomarqué a été expliquée en détails dans la section 3. de la Partie D du Chapitre RESULTATS. Des calculs identiques ont été réalisés pour les chiennes DOR.ALI et DAI.ALI, qui ont reçu une injection intraveineuse d'un radiopharmaceutique dont l'activité spécifique était plus élevée (absence de co-injection d'anticorps froid 10C6). Les valeurs des doses auto-absorbées des quatre animaux sont présentées dans le <u>Tableau 40</u> ci-dessous.

	Dose auto-absorbée (mGy.MBq ⁻¹)				
Volume d'intérêt	Activité spécifique faible		Activité spécifique élevée		
	(< 10 MBq.mg ⁻¹)		(> 50 MBq.mg ⁻¹)		
	NOR.ALI	NIA.ALI	DOR.ALI	DAI.ALI	
Corps entier	2,8 ± 0,1	3 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,9 ± 0,1	
Foie	19,8 ± 0,1	22,5 ± 2,9	15,4 ± 2	20,2 ± 2,6	
Rein droit	7,5 ± 0,7	8,8 ± 0,1	9 ± 0,1	7,5 ± 0,1	
Rein gauche	$4,4 \pm 0,1$	5,5 ± 1,5	7,2 ± 1,9	5,4 ± 1,4	
Poumons	8,9 ± 0,2	11,2 ± 0,3	7,4 ± 0,2	8,8 ± 0,2	
Rate	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,2	8,4 ± 0,8	6 ± 0,6	
MOH totale	5,6 ± 0,4	6,2 ± 0,5	12,6 ± 1,0	11 ± 0,9	

<u>Tableau 40 :</u> Doses auto-absorbées aux organes calculées chez des chiennes saines dans le cadre d'une radioimmunothérapie anti-cCD22 réalisée avec le radiopharmaceutique ⁹⁰Y-DOTA-10C6 avec et sans co-injection d'une grande quantité d'anticorps froid 10C6 : corps entier, reins, poumons, rate et moelle osseuse hématopoïétique.

L'évaluation du comportement du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 permet de déterminer l'activité cumulée des volumes d'intérêt et les doses auto-absorbées qui en découlent dans le cadre d'une RIT anticCD22 avec l'anticorps ⁹⁰Y-DOTA-10C6. Le radiomarquage concerne la même quantité initiale d'anticorps DOTA-10C6 et l'activité spécifique est modulée par la co-injection (ou l'absence de) de ce même anticorps froid. MOH : moelle osseuse hématopoïétique. L'ensemble de ces calculs a été complété par la détermination de la cross-dose pour chacun des organes suivants : foie, rein droit, rein gauche, rate et poumons. Les cross-doses ainsi calculées sont négligeables par rapport aux doses auto-absorbées de chaque organe (cf <u>Annexe</u> <u>4</u>).

La dose auto-absorbée reçue par le corps entier est similaire quelle que soit l'activité spécifique du radiopharmaceutique injecté et varie de 2,8 \pm 0,1 à 3,0 \pm 0,1 mGy.MBq⁻¹. Dans l'hypothèse où la chienne NIA.ALI serait bénéficiaire d'une RIT anti-CD22 avec le radiopharmaceutique ⁹⁰Y-DOTA-10C6 au palier le plus élevé de notre étude clinique, à savoir 555 MBq.m⁻², la dose auto-absorbée reçue par le corps entier serait de 0,9 \pm 0,1 Gy (0,3 \pm 0,01 Gy au palier 185 MBq.m⁻²).

Les doses auto-absorbées reçues par les reins et les poumons sont sensiblement les mêmes en situation de co-injection d'anticorps froid 10C6 que lorsque l'activité spécifique du radiopharmaceutique injecté est élevée.

La dose auto-absorbée par le foie est également comparable à forte et à faible activité spécifique. En effet, les chiennes NOR.ALI et NIA.ALI d'une part, et DOR.ALI et DAI.ALI d'autre part, ont reçu une injection de radiopharmaceutique provenant de deux lots différents mais dont les puretés radiochimiques et les valeurs d'immunoréactivité étaient comparables (87% versus 87,6% et 80,1% versus 85,4% respectivement). Or, les doses auto-absorbées calculées pour le foie sont du même ordre de grandeur pour ces quatre animaux, bien que l'activité spécifique du radiopharmaceutique injecté soit très différente entre le groupe NOR/NIA.ALI et le groupe DOR/DAI.ALI. Ainsi, la co-injection (ou l'absence de) d'une grande quantité d'anticorps froid 10C6 n'influe pas sur la dose déposée au foie.

Une différence est mise en évidence pour les doses auto-absorbées calculées pour la rate. La dose reçue par la rate augmente lorsque l'activité spécifique augmente : $6,7 \pm 0,7 \text{ mGy.MB}^{-1}$ en moyenne lorsque l'activité spécifique est proche de 50 MBq.mg⁻¹ contre 2,0 ± 0,1 mGy.MBq⁻¹ en moyenne lorsque l'activité spécifique est inférieure à 10 MBq.mg⁻¹.

Une seconde différence est également observée pour les doses absorbées calculées pour la moelle osseuse hématopoïétique (MOH). En effet, en comparant les animaux NOR.ALI et NIA.ALI au couple DOR.ALI et DAI.ALI, la dose reçue par la moelle est plus de 1,7 fois plus élevée lorsque le radiopharmaceutique administré a une forte activité spécifique (absence de coinjection d'une grande quantité d'anticorps froid simultanément à l'administration du radioconjugué) : 11,8 ± 1,1 mGy.MB⁻¹ en moyenne lorsque l'activité spécifique est proche de 50 MBq.mg⁻¹ contre 5,9 ± 0,5 mGy.MBq⁻¹ en moyenne lorsque l'activité spécifique est inférieure à 10 MBq.mg⁻¹. La co-injection d'une grande quantité d'anticorps froid anti-CD22 de manière concomitante au même anticorps radiomarqué à l'yttrium-90 protège la rate et la MOH d'une trop forte irradiation : on peut donc supposer que la toxicité hématologique, facteur limitant de la RIT anti-CD22, s'en trouve diminuée. En contrepartie, la rate et la MOH étant potentiellement envahie chez les sujets malades, il est possible que la diminution de la dose à la rate à faible activité spécifique ne permette pas un ciblage optimal des sites tumoraux. Il est donc important d'envisager de réaliser une étude de biodistribution chez chaque chien malade inclus dans l'étude clinique présentée dans la Partie B de ce Chapitre RESULTATS. L'étude de dosimétrie qui en découle permettra d'évaluer la balance bénéfice/risque.

2.3.2. Calcul de la dose absorbée aux organes liée à l'accumulation du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le compartiment extravasculaire

Dans cette section, les résultats obtenus pour le chien BAC.ALI ne seront pas pris en compte, l'objectif étant d'évaluer l'impact de la variation de l'activité spécifique sur l'imputabilité de la fraction de dose déposée aux organes à l'accumulation dans le compartiment extravasculaire du radiopharmaceutique injecté. Si le lecteur souhaite toutefois y revenir, les graphes sont présentés dans les sections 4.2. et 4.3. de la Partie D du Chapitre RESULTATS (<u>Figure 47</u> et <u>Tableau 36</u>).

Ainsi en connaissant le volume sanguin de chaque organe, le pourcentage d'activité injectée par kilogramme et en tenant compte des demi-vies respectives de l'indium-111 et de l'yttrium-90, il est possible de déterminer un pourcentage d'activité injectée (<u>Figure 58</u>) ainsi qu'une fraction de dose (<u>Tableau 41</u>) liés à la présence du radiopharmaceutique dans le parenchyme tissulaire de ce même organe (métabolisme, fixation spécifique et circulation dans les espaces interstitiels).



Figure 58 : Imputation du pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe lié à la circulation du radiopharmaceutique 111In-DOTA-10C6 dans le compartiment vasculaire ainsi que lié à sa présence dans le parenchyme tissulaire chez des chiens sains en présence (NOR/NIA.ALI) ou en l'absence (DOR/DAI.ALI) de co-injection d'anticorps froid : étude du foie, des reins, des poumons, de la rate et de la moelle osseuse hématopoïétique des vertèbres lombaires. L'activité présente dans le foie, la rate et la moelle osseuse hématopoïétique des vertèbres lombaires est majoritairement liée à une accumulation de la radioactivité dans le compartiment extravasculaire de ces organes. L'activité détectée dans les reins correspond à la présence du radiopharmaceutique dans le sang des animaux.
Les courbes représentant l'évolution des pourcentages d'activité injectée par kilogramme au cours du temps sont très similaires entre les deux groupes de chiens pour le foie, les reins et les poumons (Figure 57 dans la section 2.2. de cette Partie du Chapitre RESULTATS). Il faut toutefois souligner que chez les chiennes DOR.ALI et DAI.ALI, le pourcentage d'activité injectée par unité de poids dans le sang diminue très rapidement pour atteindre une valeur proche de zéro dès J2 (Figure 56 dans la section 2.1. de cette Partie du Chapitre RESULTATS), le nombre de coups détecté par la TEMP ne dépassant pas le bruit de fond. En effet, l'absence de co-injection d'anticorps froid 10C6 diminue la demi-vie sanguine du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6, et la totalité de l'activité détectée dans les organes d'intérêt est imputable à la présence du radiopharmaceutique dans leur compartiment extravasculaire.

Ainsi, lorsque l'activité spécifique est faible, les concentrations en anticorps anti-CD22 semblent saturantes dans le stroma des organes et le radiopharmaceutique est détecté dans le sang pendant un temps supérieur à ce qui est observé lorsque l'activité spécifique est élevée et que les anticorps anti-CD22 sont présents en quantité limitante. Dans cette dernière situation, la détection du radiopharmaceutique dans le sang va principalement dépendre de l'affinité de l'anticorps vecteur : les anticorps peu affins circuleront plus longtemps dans le compartiment vasculaire tandis que les anticorps très affins iront se fixer sur leur cible très rapidement.

Lors du calcul des doses absorbées déposées aux reins et aux poumons, ces observations se traduisent par une nette diminution du pourcentage de la dose attribuée à la présence du radiopharmaceutique dans le sang pour les chiennes n'ayant pas reçu de co-injection : $30,6 \pm 10\%$ versus $58,4 \pm 2,5\%$ pour les reins, $47,0 \pm 4,4 \%$ contre $83,5 \pm 7,1\%$ pour les poumons (<u>Tableau 41</u>). En ce qui concerne le foie, aucune différence significative n'est mise en évidence, la dose reçue par cet organe étant majoritairement attribuée à la présence du radiopharmaceutique dans son compartiment extravasculaire et en lien avec ses voies de dégradation et d'élimination.

Des différences de profil sont observées pour la rate et la moelle osseuse hématopoïétique (MOH) entre les deux groupes de chiennes, avec des pourcentages totaux d'activité injectée par kilogramme 2 à 3 fois supérieurs dans le groupe des chiennes ayant reçue une injection du produit à forte activité spécifique (absence de co-injection d'une grande quantité d'anticorps froid). Cependant, il est difficile d'aller plus loin dans l'analyse car il peut être fait la même observation que celle faite pour le foie, les reins et les poumons : l'activité détectée dans le sang diminue très rapidement et la presque totalité de l'activité détectée dans les organes d'intérêt est imputable à la présence du radiopharmaceutique dans le compartiment extravasculaire de ces organes. Il semble donc qu'une faible activité spécifique favorise la fixation spécifique de l'anticorps sur sa cible, diminuant de ce fait la quantité d'anticorps circulants. L'augmentation plus importante du pourcentage d'activité injectée par kilogramme dans la rate à forte activité spécifique comparativement au parenchyme médullaire pourrait refléter une moindre fréquence des cellules exprimant le CD22 canin dans la MOH et/ou une plus faible expression de cet antigène dans cet organe, ainsi qu'une accessibilité plus rapide des anticorps du flux sanguin aux sites antigéniques de la rate.

L'étude dosimétrique conclut à un partage similaire de la dose reçue par la MOH, qu'il y ait eu ou non co-injection d'une quantité massive d'anticorps froid : plus de 90% de la dose reçue par cet organe est liée à l'accumulation du radiopharmaceutique dans son compartiment extravasculaire dans les deux groupes de chiennes. C'est également le cas pour la dose reçue par la rate chez les chiennes n'ayant pas bénéficié d'une co-injection d'anticorps froid tandis que la dose reçue par la rate des chiennes ayant reçu une injection de radiopharmaceutique à faible activité spécifique est due pour moitié seulement à la présence du radiopharmaceutique dans le compartiment extravasculaire du parenchyme splénique.

Organe	% dose auto-absorbée liée à la présence de sang circulant		% dose auto-absorbée liée à l'accumulation dans le parenchyme tissulaire	
	NOR/NIA.ALI	DOR/DAI.ALI	NOR/NIA.ALI	DOR/DAI.ALI
Foie	19,5 ± 0,5	13,4 ± 2,3	80,5 ± 0,5	86,6 ± 2,3
Reins	58,4 ± 2,5	30,6 ± 10	41,6 ± 2,5	69,4 ± 10
Poumons	83,5 ± 7,1	47,0 ± 4,4	16,5 ± 7,1	53,0 ± 4,4
Rate	48,1 ± 2,0	8,6 ± 3,2	51,9 ± 2,0	91,4 ± 3,2
MOH totale	7,6 ± 0,7	2,6 ± 0,3	92,4 ± 0,7	97,4 ± 0,3

<u>Tableau 41 :</u> Part de la dose auto-absorbée des organes (foie, reins, poumons, rate et moelle osseuse hématopoïétique) liée à la circulation du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le compartiment sanguin et de celle liée à son accumulation dans le parenchyme tissulaire, en présence (NOR/NIA.ALI) ou en l'absence (DOR/DAI.ALI) de co-injection d'anticorps froid 10C6 chez des chiens sains.

La fraction de la dose auto-absorbée imputée à la présence du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le compartiment extravasculaire des organes d'intérêt est fortement augmentée en l'absence de coinjection d'anticorps froid pour les reins, les poumons et la rate. A l'inverse, la variation d'activité spécifique n'influe pas sur la fraction de dose imputée à la circulation du radiopharmaceutique dans le sang et déposée au foie et à la moelle osseuse.

3. VALIDATION DU CIBLAGE TUMORAL EN L'ABSENCE DE CO-INJECTION DE L'ANTICORPS FROID 10C6 CHEZ UN CHIEN ATTEINT DE DLBCL

3.1. Recrutement d'un chien spontanément atteint de DLBCL

3.1.1. Obtention du consentement éclairé des propriétaires

Un chien de compagnie ayant développé un DLBCL a été présenté au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Oniris (CHUV) par son vétérinaire traitant en vue d'une inclusion dans un protocole de recherche clinique. L'animal a pu intégrer notre étude restreinte à sa phase d'imagerie phénotypique, les données de dosimétrie chez les chiens sains n'étant pas suffisantes à l'époque pour garantir la sécurité de la phase thérapeutique.

Ce deuxième chien concerné par notre étude est une femelle entière (non stérilisée) Flat Coat Retriever de 4,5 ans, pesant 25 kg et identifiée FAX.FRE dans le reste du texte. Son inclusion a été réalisée en mars 2017 après une première consultation chez son vétérinaire traitant ayant abouti au diagnostic cytologique de lymphome multicentrique, puis une seconde consultation d'inclusion au CHUV d'Oniris au cours de laquelle la lettre d'information et le document de « consentement » éclairé ont été présentés aux propriétaires.

3.1.2. Diagnostic clinique et stade du DLBCL

Le diagnostic clinique de lymphome B repose sur les signes cliniques présent chez l'animal concerné. Chez FAX.FRE, l'examen clinique révèle une adénomégalie sévère généralisée (hypertrophie des nœuds lymphatiques périphériques et abdominaux) associée à des signes généraux non spécifiques tels qu'une apathie, une dysorexie, un amaigrissement et une hyperthermie. L'ensemble des signes cliniques mentionnés ci-dessus est très en faveur d'un lymphome multicentrique de type B (les lymphomes multicentriques de type T étant rares).

La réalisation d'un bilan d'extension détaillé permet de renseigner le stade clinique du lymphome en précisant le degré d'envahissement de l'organisme. Les résultats des examens complémentaires entrepris pour cet animal figurent dans le <u>Tableau 42</u>.

L'ensemble de ces résultats permet de déterminer le stade de la maladie : FAX.FRE est atteinte d'un lymphome multicentrique de stade V. Par ailleurs, FAX.FRE rentre dans la catégorie du sous-stade b, des signes cliniques généraux étant associés à la polyadénomégalie.

Examens complémentaires	FAX.FRE	
Radiographies thoraciques	Adénomégalie sus-sternale	
Echographic abdominals	Adénomégalie généralisée et	
Echographie abaominale	suspicion d'infiltration splénique	
Numération formulo	Cellules tumorales circulantes,	
Numeration jormale	neutrophilie	
Muélo grammo	Envahissement de la moelle	
myeiogramme	osseuse	

<u>Tableau 42 :</u> Résultats des examens complémentaires réalisés dans le cadre du bilan d'extension suite au diagnostic clinique de lymphome B multicentrique chez FAX.FRE.

FAX.FRE est atteint d'un lymphome multicentrique de stade clinique V.

3.1.3. Analyse histologique et immunohistochimique des nœuds lymphatiques envahis par le DLBCL

Le diagnostic de certitude de lymphome a été réalisé à partir de prélèvements tissulaires : les nœuds lymphatiques préscapulaires gauches de la chienne FAX.FRE ont été biopsiés à l'aide d'un pistolet à biopsie sous sédanalgésie complétée d'une anesthésie locale. L'analyse histologique et immunohistochimique a révélé un envahissement diffus du nœud lymphatique par un lymphome malin ganglionnaire B (positivité pour les marqueurs CD20, négativité pour le marqueur CD3) à grandes cellules de type centroblastique (DLBCL), de haut grade de malignité (Ki-67 = 70%) et surexprimant le cCD22. Les détails de cette analyse figurent en <u>Annexe 6</u> et sont illustrés dans la <u>Figure 59</u>.

Des analyses immunohistochimiques supplémentaires ont été réalisées afin de caractériser plus finement le type de DLBCL en cours de développement chez FAX.FRE. L'algorithme de Hans appliqué à ce lymphome révèle qu'il s'agit d'un DLBCL double négatif pour CD10 et BCL-6 et positif pour MUM-1, c'est à dire un DLBCL non-centrogerminatif, de plus mauvais pronostic. Le score de double hit a également été déterminé : il s'agit d'un DLBCL positif pour BCL-2 et c-MYC, soit un DLBCL-DE, de pronostic plus sombre également.



<u>Figure 59</u> : Coloration HES (hématoxyline, éosine, safran) et immunomarquages réalisés sur les lames histologiques issues des biopsies des nœuds lymphatiques préscapulaires de la chienne FAX.FRE.

La coloration HES révèle un lymphome diffus à grande cellule d'immunophénotype B (CD3 négatif et CD20 positif), surexprimant le CD22 canin.

3.1.4. Evaluation de l'expression du cCD22 dans les nœuds lymphatiques tumoraux par cytométrie en flux

Lors de la réalisation de biopsies au pistolet des nœuds lymphatiques préscapulaires gauches de FAX.FRE, des prélèvements tissulaires ont été placé dans un milieu de conservation et pris en charge afin de réaliser une étude de cytométrie en flux.

Chez cet animal, plusieurs marqueurs de surface ont été ciblés par des anticorps couplés à des fluorochromes :

- le CD45 canin qui est un marqueur de la lignée leucocytaire
- le CD21 canin est un facteur d'expression membranaire de la lignée lymphoïde B
- le CD3 canin qui est un marqueur de la lignée lymphoïde T

Le cCD22 a été ciblé par l'anticorps monoclonal murin 10C6 révélé à l'aide d'un anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorochrome PE/Cy7.

L'analyse par cytométrie en flux a révélé dans les prélèvements tumoraux réalisés l'existence d'une population cellulaire majoritaire appartenant à la lignée lymphoïde B et composée de cellules de grandes tailles et fortement positives pour le cCD22, ainsi que le montre la <u>Figure 60</u>.



<u>Figure 60 :</u> Analyse par cytométrie en flux de l'expression du cCD45, cCD21 et cCD22 au niveau de la membrane des cellules tumorales des nœuds lymphatiques préscapulaires gauches de la chienne FAX.FRE.

Les cellules tumorales envahissant les nœuds lymphatiques biopsés représentent 71 % des cellules viables analysées et sont positives pour les marqueurs cCD45, cCD21 et cCD22.

Parmi les cellules viables analysées, 97,5 % expriment à leur surface membranaire le marqueur CD45 et sont identifiées comme appartenant à la lignée leucocytaire. Parmi les leucocytes, 73,2 % expriment le CD21 et appartiennent à la lignée lymphoïde B. De plus, la totalité des leucocytes CD21+ sont également CD22+. En conclusion, les nœuds lymphatiques préscapulaires tumoraux de l'animal FAX.FRE sont envahis par une population cellulaire tumorale appartenant à la lignée lymphoïde B et surexprimant le cCD22.

3.2. Imagerie phénotypique après injection de l'anticorps anti-cCD22¹¹¹In-DOTA-10C6 en l'absence de co-infusion de l'anticorps froid 10C6

Trois imageries phénotypiques ont été effectuées chez le chien FAX.FRE (4,5 ans ; 23,5 kg) suite à une injection de ¹¹¹In-DOTA-10C6 réalisée avant toute administration de molécule de chimiothérapie en dehors d'une corticothérapie à 1 mg.kg⁻¹.j⁻¹ par voir orale. A ce moment, l'ensemble des nœuds lymphatiques de l'animal étaient sévèrement hypertrophiés et une splénomégalie avait été objectivée lors de l'échographie abdominale.

L'injection de l'anticorps monoclonal ¹¹¹In-DOTA-10C6 a été réalisée selon le protocole décrit précédemment. 85,4 MBq de ¹¹¹In-DOTA-10C6 (activité spécifique : 113,9 MBq.mg⁻¹) ont

été injectés sans co-infusion d'anticorps 10C6 froid, pour une quantité totale en anticorps de 750 μ g.

Les acquisitions TEMP/TDM ont été réalisées 1 h (J0), 44 h et 56 min (J2) et 139 h et 8 min (J6) après le début de l'injection du radiopharmaceutique. La majorité des nœuds lymphatiques sont identifiables sur les acquisitions TEMP seules et les images de fusion TEMP/TDM, ainsi que la rate et certains os (têtes humérales et vertèbres) hébergeant de la moelle osseuse hématopoïétique. Le meilleur contraste étant obtenu à J2 sur les acquisitions TEMP (<u>Figure 61</u>), les images de fusion présentées ci-après (<u>Figure 62</u>) sont toutes issues de l'acquisition TEMP/TDM réalisée à J2.

L'imagerie phénotypique réalisée à J2 post-injection de ¹¹¹In-DOTA-10C6 confirme le bilan d'extension conventionnel réalisé par imagerie médicale chez le chien FAX.FRE. En effet, en plus des renseignements cliniques révélant une hypertrophie de nombreux nœuds lymphatiques de part et d'autre du diaphragme (stade clinique d'au moins II), l'envahissement tumoral de la rate (stade clinique d'au moins IV) et de la moelle osseuse (stade clinique de V) est confirmé par cette technique d'imagerie corps entier. De plus, il est relativement aisé d'identifier et de recenser les nœuds lymphatiques atteints.



<u>Figure 61 :</u> Acquisitions TEMP de la moitié supérieure du corps de l'animal FAX.FRE réalisées à J0, J2 et J6 après l'injection intraveineuse du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 sans coinjection de l'anticorps froid 10C6 et avant tout traitement en dehors d'une corticothérapie par voie orale à 1 mg/kg/j.

Le meilleur contraste est obtenu à J2 et la majorité des nœuds lymphatiques hypertrophiés sont visualisables : nœuds lymphatiques mandibulaires (a), rétropharyngés (b) et préscapulaires (c). Une fixation du radiopharmaceutique est également mise en évidence au niveau de la moelle osseuse hématopoïétique : têtes humérales (d) et rachis thoracique (e).



<u>Figure 62 :</u> Images de fusion TEMP/TDM (coupes transversales) de l'animal FAX.FRE réalisées à J2 après l'injection intraveineuse du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 sans co-injection de l'anticorps froid 10C6 et avant tout traitement en dehors d'une corticothérapie par voie orale à 1 mg/kg/j.

a) Nœuds lymphatiques mandibulaires. **b)** Nœuds lymphatiques rétropharyngés. **c)** Nœuds lymphatiques préscapulaires, têtes humérales et vertèbre cervicale C4. **d)** Nœud lymphatique sus-sternal et vertèbre thoracique. **e)** Rate.

3.3. Calcul des doses absorbées aux organes en l'absence de co-infusion de l'anticorps froid 10C6

Le chien FAX.FRE ayant pu être l'objet d'acquisitions TEMP/TDM à trois reprises après l'injection de l'anticorps ¹¹¹In-DOTA-10C6, il est possible d'étudier à partir des imageries phénotypiques successives la biodistribution du radiopharmaceutique étudié au cours du temps dans différents organes d'intérêts (foie, reins, poumons, rate, nœuds lymphatiques tumoraux et moelle osseuse envahie) ainsi que dans le compartiment sanguin circulant.

Une fois cette étude de pharmacocinétique réalisée, il est ensuite possible d'estimer la dose auto-absorbée déposée aux organes étudiés en cas de radioimmunothérapie avec le même anticorps marqué à l'yttrium-90 et de discuter sur l'efficacité et la toxicité éventuelles d'une RIT anti-cCD22 avec l'anticorps ⁹⁰Y-DOTA-10C6.

3.3.1. Pharmacocinétique de l'anticorps ¹¹¹In-DOTA-10C6

3.3.1.1. Pharmacocinétique sanguine du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6

Seuls les résultats obtenus à l'aide du compteur gamma seront présentés ici (<u>Figure 63</u>), car l'activité présente dans le tube de sang imagé aux cotés de l'animal était trop proche du bruit de fond à J2 et J6 pour que les résultats soient exploitables.

De plus, les résultats sont présentés en corrigeant de la décroissance du radioélément utilisé, soit l'indium-111, afin de pouvoir discuter de la demi-vie biologique du vecteur étudié, soit l'anticorps 10C6.

La courbe représentant le nombre de coups corrigés de la décroissance détectés au compteur gamma dans 1 g de sang en fonction du temps séparant le début de l'injection du radiopharmaceutique du prélèvement sanguin permet de déterminer graphiquement, en utilisant une régression non linaire de décroissance bi-exponentielle, la demi-vie biologique du vecteur DOTA-10C6 et qui équivaut à $6,5 \pm 1$ h.

En comparant ces données avec celles des chiennes saines, nous remarquons que le nombre de coups par gramme de sang à J0 est très inférieur (près de dix fois) chez la chienne malade par rapport aux chiennes saines, alors que le rapport de quantité d'anticorps injectée n'est que de deux environ (0,03 mg.kg⁻¹ chez la chienne FAX.FRE versus 0,07 mg.kg⁻¹ chez la chienne DOR.ALI et 0,08 mg.kg⁻¹ chez la chienne DAI.ALI). Ceci est en faveur d'une captation du radioconjugué en dehors du compartiment vasculaire chez la chienne malade : il s'agit d'un phénomène précoce et rapide. Toutefois, les valeurs semblent devenir comparables au-delà de J3 : le profil cinétique devient alors similaire.



Délai injection – prise de sang (heures)

<u>Figure 63</u> : Détermination au compteur gamma de la pharmacocinétique sanguine du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 en l'absence de co-injection de l'anticorps froid 10C6 chez une chienne atteinte de DLBCL et comparaison avec les chiennes saines DOR.ALI et DAI.ALI.

Une régression non linéaire de type « décroissance bi-exponentielle » permet de déterminer graphiquement la demi-vie biologique de l'anticorps DOTA-10C6 qui est de 6,5 ± 1 h. Les différences de valeurs du nombre de coups par gramme de sang à J0 sont en faveur d'une captation du radioconjugué en dehors du compartiment vasculaire chez la chienne malade, tandis que les profils cinétiques redeviennent similaires au-delà de J3.

3.3.1.2. Pharmacocinétique du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans les organes sains

La pharmacocinétique de l'anticorps ¹¹¹In-DOTA-10C6 est intéressante à analyser au niveau du corps entier (CE) ainsi qu'au niveau de certains organes sains tels le foie (en l'absence d'élément en faveur d'un envahissement tumoral, qu'il s'agisse des résultats de l'échographie abdominale ou des valeurs biochimiques en lien avec la fonction hépatique), les reins et les poumons. Les résultats présentés dans la <u>Figure 64</u> ont été obtenus par contourage du volume de chacun de ces organes ou compartiments sur les coupes TDM puis détermination de l'activité détectée dans ces mêmes volumes lors de l'acquisition TEMP.

Les courbes représentant le pourcentage d'activité par kilogramme d'organe (ou de compartiment) en fonction du temps s'étant écoulé entre le début de l'injection du radiopharmaceutique et la réalisation de l'acquisition TEMP/TDM ont été déterminées à l'aide d'une régression non linéaire de type « décroissance mono-exponentielle » ou « décroissance biexponentielle ».



<u>Figure 64</u> : Pharmacocinétique du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 en l'absence de coinjection de l'anticorps froid 10C6 dans le corps entier, le foie, les reins et les poumons chez un chien spontanément malade (FAX.FRE) et chez deux chiens sains (DOR/DAI.ALI). Les données présentées ne sont pas corrigées de la décroissance. Une régression non linéaire de type

« décroissance mono-exponentielle » permet de déterminer une courbe de tendance dans le CE et le foie. Pour les poumons, la régression non linéaire effectuée est de type « décroissance bi-exponentielle ». Il n'est pas possible de réaliser une courbe de tendance pour les reins chez FAX.FRE du fait d'un trop faible nombre de points.

Pour les courbes « corps entier », « foie » et « poumons » présentées dans la <u>Figure 64</u>, les profils des courbes de tendance sont très similaires, avec des pentes de courbe du même ordre de grandeur. Cela traduit un comportement identique de l'anticorps radiomarqué ¹¹¹In-DOTA-10C6 chez les trois chiennes dans le foie, les poumons et au niveau du corps entier. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'il s'agit du même lot de radiopharmaceutique ainsi que par des quantités en anticorps anti-CD22 non saturantes dans les organes.

Par ailleurs, les valeurs de pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe ou de compartiment sont plus faibles chez la chienne FAX.FRE que chez les chiennes saines DOR.ALI et DAI.ALI. Cette différence de valeur absolue de pourcentage d'activité injectée entre la chienne malade et les animaux sains peut s'expliquer par le fait que la quantité d'anticorps injectée rapportée au poids de FAX.FRE était inférieure à celle administrée aux chiennes saines : 0,03 mg.kg⁻¹ versus 0,07 et 0,08 mg.kg⁻¹ respectivement. De plus, la rate de la chienne FAX.FRE,

envahie par le DLBCL, était hypertrophiée. Cette splénomégalie peut expliquer les différences de pharmacocinétique du radiopharmaceutique entre FAX.FRE et les chiennes DOR.ALI et DAI.ALI. Une fraction importante de l'anticorps radiomarqué à une concentration non saturante est captée par la rate aux temps précoces (Figure 65 ci-après, section 3.3.1.3.) conduisant à un épuisement de la quantité de radiopharmaceutique dans le sang et les organes sains chez FAX.FRE, contrairement à ce qui se passe chez DOR.ALI et DAI.ALI qui ne présentent pas d'envahissement splénique ni de splénomégalie.

Ainsi en faisant abstraction de cette variation dans la valeur du pourcentage d'activité injectée par kilogramme, nous pouvons supposer que le comportement du radiopharmaceutique 111In-DOTA-10C6 est comparable pour le foie, les reins et les poumons chez l'animal malade et les chiens sains.

Cependant, le faible nombre d'imageries phénotypiques réalisées ne permet pas la détermination d'une courbe de tendance pour les reins. En effet, il a été expliqué, dans la section 4.2. de la Partie D du Chapitre RESULTATS, que le rein droit est enchâssé dans le processus caudé du lobe caudé. De plus, dans le cas particulier de cet animal, la rate était hypertrophiée, conséquence de son envahissement tumoral, et était en contact avec le rein gauche sur une surface plus grande que chez les chiens sains. Le comportement du radiopharmaceutique dans les reins est alors plus difficile à analyser, car la détermination de l'activité présente dans le volume contouré à chaque temps d'acquisition TEMP/TDM subit l'influence de l'activité présente dans les organes volumineux adjacents que sont le foie et la rate. Toutefois, il semblerait que le profil général soit similaire à celui observé chez les chiennes saines DOR.ALI et DAI.ALI, malgré des valeurs de pourcentage d'activité injectée par kilogramme plus faibles.

3.3.1.3. Pharmacocinétique du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans les sites tumoraux

La biodistribution du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 est également intéressante à déterminer dans les organes envahis par le DLBCL, à savoir la rate, la moelle osseuse hématopoïétique et les nœuds lymphatiques de l'animal. Le même travail que celui décrit dans le paragraphe 3.3.1.2. a été réalisé et les résultats sont présentés dans la <u>Figure 65</u>.



<u>Figure 65 :</u> Pharmacocinétique du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 en l'absence de coinjection de l'anticorps froid 10C6 dans les organes envahis de l'animal FAX.FRE (rate, moelle osseuse hématopoïétique des vertèbres lombaires et nœuds lymphatiques) : comparaison avec les animaux sains.

Les données présentées ne sont pas corrigées de la décroissance. Une régression non linéaire de type « décroissance mono-exponentielle » permet d'apprécier la pharmacocinétique du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans la rate et la moelle osseuse hématopoïétique (MOH). Pour les nœuds lymphatiques mandibulaires, rétropharyngés, préscapulaires et poplités, une première période d'augmentation du pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe est suivie d'une diminution de cette valeur. Pour les nœuds lymphatiques axillaires et susternal, le pourcentage d'activité injectée par kilogramme diminue progressivement au cours du temps. NL : nœud lymphatique. Contrairement à ce qui est observé dans les organes sains, le pourcentage d'activité injectée par kilogramme de rate est supérieur chez la chienne FAX.FRE à celui déterminé chez les chiennes saines. Ces données sont en faveur d'un envahissement tumoral marqué, associé à la présence dans le parenchyme splénique d'une très forte densité en antigène CD22. Ceci est cohérent avec la diminution du pourcentage d'activité injectée par gramme de sang par rapport à ce qui est observée pour les chiennes saines (<u>Figure 63</u> de la section 3.3.1.1.) : il n'y a que très peu d'anticorps anti-CD22 circulant.

L'analyse des pourcentages d'activité injectée par kilogramme de moelle osseuse hématopoïétique met en évidence une similitude de comportement du radiopharmaceutique chez l'animal malade et les animaux sains, abstraction faite de la différence observée entre les valeurs absolues de cette variable (en lien avec l'activité totale injectée et le poids des animaux). Il semble que la moelle osseuse hématopoïétique de la chienne FAX.FRE n'est que peu envahie par le DLBLC, en accord avec les images TEMP. En effet, bien que la lecture du myélogramme réalisé lors de l'inclusion de l'animal dans l'étude clinique a révélé un envahissement médullaire, la chienne FAX.FRE a bénéficié dans l'intervalle d'une injection de L-asparaginase (Kidrolase® ND). Cette injection, réalisée par voie intramusculaire, est suivie d'une étape de cytoréduction par lyse tumorale massive pouvant expliquer l'absence de différence de fixation du radiopharmaceutique entre l'animal malade et les animaux sains au niveau de la moelle osseuse hématopoïétique. Une autre explication serait également la captation massive du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le parenchyme splénique, toujours massivement envahi après l'étape de cytoréduction. Ainsi la très faible quantité d'anticorps radiomarqués circulants pourrait interférer avec la mise en évidence d'une fixation plus importante de ces derniers dans la MOH de la chienne malade en comparaison avec les animaux sains.

Les pourcentages d'activité injectée par kilogramme dans les nœuds lymphatiques envahis sont faibles : ils varient entre 1 et 3 % au maximum. Ces faibles valeurs sont à relier à un effet de volume partiel important du fait de la petite taille des nœuds lymphatiques étudiés : 2,2 cm de largeur au maximum pour le plus gros nœud lymphatique de FAX.FRE (rétro-pharyngé droit). En effet, pour les petites structures, l'erreur de quantification peut aboutir à une sousestimation de 80 à 100%.

Toutefois, les courbes présentées dans la <u>Figure 65</u> mettent en évidence une accumulation du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 dans le parenchyme de ces organes : en effet, l'augmentation du pourcentage d'activité injectée par kilogramme pendant les 48 premières heures est en faveur d'une fixation probablement spécifique de l'anticorps radiomarqué sur sa cible, surexprimée par les cellules lymphomateuses.

3.3.2. Evaluation des doses absorbées aux organes dans un contexte de RIT anti-CD22 à l'yttrium-90 à partir des données de pharmacocinétique

Le principe de l'étude dosimétrique a été expliquée en détails dans la section 3. de la Partie D du Chapitre RESULTATS à l'occasion de la détermination de la dose auto-absorbée déposée dans les organes de trois chiens sains ayant reçu une forte quantité d'anticorps froid (activité spécifique faible) en même temps que l'anticorps radiomarqué. Des calculs identiques ont été réalisés pour les chiennes DOR.ALI et DAI.ALI ayant reçu une injection intraveineuse d'un radiopharmaceutique dont l'activité spécifique était plus élevée (absence de co-injection d'une grande quantité d'anticorps froid 10C6). Ainsi le même calcul, en le projetant dans un contexte de RIT anti-CD22 à l'yttrium-90, a été réalisé pour la chienne FAX.FRE, atteinte d'un DLBCL et pour laquelle l'injection du radiopharmaceutique a été réalisée en l'absence de co-injection d'anticorps froid 10C6. Les valeurs des doses auto-absorbées sont présentées dans le <u>Tableau 43</u> ci-dessous.

L'ensemble de ces calculs a été complété par la détermination de la cross-dose pour chacun des organes suivants : foie, rein droit, rein gauche, rate et poumons. Les cross-doses ainsi calculées sont négligeables par rapport aux doses auto-absorbées de chaque organe.

Volumo d'intérêt	Dose auto-absorbée (mGy.MBq ⁻¹)		
volume a interet	FAX.FRE	DOR/DAI.ALI	
Corps entier	$1,2 \pm 0,1$	2,8 ± 0,1	
Foie	12,7 ± 0,1	17,8 ± 3,4	
Rein droit	$0,2 \pm 0,1$	7,7 ± 0,6	
Rein gauche	$0,3 \pm 0,1$	5,5 ± 1,4	
Poumons	1,1 ± 0,1	6,5 ± 0,7	
Rate	7,4 ± 0,1	6,7 ± 2,4	
MOH totale	2,8 ± 0,2	11,8 ± 1,1	

<u>Tableau 43 :</u> Doses auto-absorbées aux organes par mégabéquerel injecté calculées chez une chienne spontanément malade dans le cadre d'une radioimmunothérapie anti-cCD22 réalisée avec le radiopharmaceutique ⁹⁰Y-DOTA-10C6 en l'absence de co-injection d'une grande quantité d'anticorps froid 10C6 : corps entier, reins, poumons, rate et moelle osseuse hématopoïétique. L'évaluation du comportement du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 permet de déterminer l'activité cumulée des volumes d'intérêt et les doses auto-absorbées qui en découlent dans le cadre d'une RIT anti-cCD22 avec l'anticorps ⁹⁰Y-DOTA-10C6. Les doses auto-absorbées calculées chez la chienne atteinte d'un DLBCL (FAX.FRE) sont confrontées à celles obtenues chez des chiennes saines (DOR. ALI et DAI.ALI). MOH : moelle osseuse hématopoïétique.

Les doses auto-absorbées déposées au corps entier, au foie, aux reins et aux poumons sont inférieures chez la chienne malade par rapport à celles calculées pour les animaux sains.

Cependant, la dose auto-absorbée déposée dans la rate est très légèrement plus élevée chez la chienne malade que chez les chiennes saines : 7,4 ± 0,1 mGy.MBq⁻¹ versus 6,7 ± 2,4 mGy.MBq⁻¹. Cette quasi équivalence de dose auto-absorbée calculée pour la rate s'explique par la splénomégalie de l'organe chez la chienne FAX.FRE ainsi qu'à l'envahissement tumoral de l'organe : le parenchyme splénique de cette rate exprime une quantité d'antigènes CD22 bien supérieure à celle exprimée dans la rate des chiennes saines. Le radiopharmaceutique est alors capté massivement dans la rate où il se fixe de manière spécifique.

A l'inverse, la dose auto-absorbée déposée dans la moelle osseuse hématopoïétique est très inférieure chez la chienne malade en comparaison avec celle calculée chez les chiennes saines (2,8 \pm 0,2 mGy.MBq⁻¹ versus 11,8 \pm 1,1 mGy.MBq⁻¹), probablement en raison d'une moindre accessibilité des sites antigéniques et de l'épuisement des quantités d'anticorps circulants du fait d'une forte fixation dans les organes plus facilement accessibles comme la rate.

Les doses absorbées déposées dans les sites tumoraux que sont les nœuds lymphatiques chez la chienne FAX.FRE sont plus faibles, et varient entre 0,1 et 0,6 mGy.MBq⁻¹. Les valeurs présentées ici ont été calculées en déterminant l'activité présente dans un volume correspondant aux limites anatomiques des ganglions tumoraux et il a été considéré que la totalité des désintégrations considérées ont lieu dans ce même volume. Ces faibles doses ainsi calculées sont probablement corrélées à la très faible quantité d'anticorps circulant chez cet animal du fait d'une forte captation par la rate notamment. Il aurait été intéressant de corréler ces doses à une réponse thérapeutique chez la chienne FAX.FRE. Malheureusement, l'envahissement médullaire chez cet animal objectivé lors des acquisitions TEMP/TDM contreindiquait la mise en œuvre d'une RIT anti-cCD22.

En conclusion, il est évident qu'un nombre plus important de chiens injectés à différentes activités spécifiques est nécessaire pour déterminer par imagerie quantitative la dose optimale d'anticorps à administrer à un animal malade. Il est probable que chaque chien soit un cas particulier (importance de la masse tumorale et répartition de cette dernière dans les organes). Deux paramètres semblent cependant déterminants vis à vis de la dose déposée aux organes : l'accessibilité des sites tumoraux à partir du flux sanguin et la quantité d'anticorps injectée. **CHAPITRE 5. DISCUSSION**

1. LE MODELE SPONTANE CANIN DE DLBCL

La valeur préclinique du modèle canin de DLBCL

Les animaux de compagnie sont des espèces qui bénéficient, comme l'Homme, d'un suivi médical tout au long de leur vie. Tout comme nous, ces animaux développent fréquemment des cancers et bénéficient de traitements comparables à ceux mis au point pour l'Homme. A côté de l'intérêt évident des races de chiens qui constituent des isolats génétiques uniques pour l'étude des causes génétiques du cancer, le partage de nos conditions de vie et d'exposition aux polluants induit également des maladies souvent analogues à celles rencontrées chez les humains. Les animaux de compagnie, et plus particulièrement les chiens, constituent donc un modèle préclinique pertinent pour la compréhension de la physiopathologie des cancers et pour l'évaluation de thérapies antitumorales. La valeur ajoutée des cancers canins comme modèles précliniques, comparativement aux modèles murins, réside dans la spontanéité de leur apparition chez des individus immunocompétents et positionne d'emblée le chercheur dans un contexte clinique.

Notre choix a été guidé par l'incidence des DLBCL chez les chiens, l'homologie constatée entre la pathologie humaine et canine et par le fait que les DLBCL les plus représentés chez les chiens appartiennent au sous-type le plus agressif, dit GC, objet d'études cliniques chez l'Homme. Actuellement la RIT à l'aide d'un anticorps anti-CD2O radiomarqué n'est une indication que pour les patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens en consolidation d'un traitement de chimiothérapie ou en rechute d'une première ligne de traitement. L'évaluation de l'intérêt de la RIT pour le traitement des DLBCL reste au stade d'essai clinique avec notamment le ciblage de l'antigène CD22. Le succès rencontré dans ce domaine ainsi que la forte prévalence de ce cancer chez les chiens nous ont orientés vers ce type de ciblage en développement.

Chez l'Homme, les protocoles appliqués utilisent des quantités d'anticorps et des activités injectées établies en fonction de la surface corporelle ou du poids des malades indépendamment de l'extension de la maladie. Bien que l'imagerie diagnostique soit réalisée et la pharmacocinétique de l'anticorps déterminée chez les premiers patients inclus, l'imagerie quantitative permettant d'évaluer les doses déposées aux organes sains et à la tumeur n'est pas utilisée en routine pour personnaliser les traitements. La RIT anti-CD22 a été évaluée chez des patients âgés naïfs de tout traitement, en consolidation d'une première ligne de polychimiothérapie R-CHOP, lorsque la greffe de moelle osseuse n'était pas envisageable (Kraeber-Bodéré F. *et al.*, 2017). Les résultats encourageants de cet essai clinique permettent

également d'espérer un bénéfice pour des patients plus jeunes traités à un stade moins évolué de la maladie. Il nous semble donc que les chiens spontanément atteints de DLBCL constituent un modèle adapté pour répondre à ces questions.

L'oncologie vétérinaire : un contexte clinique particulier

Contrairement aux modèles de rongeurs génétiquement sélectionnés et élevés dans des conditions aseptiques spécifiquement pour l'expérimentation animale, le chien est avant tout le compagnon de son maître. Les essais thérapeutiques proposés au propriétaire pour son chien malade doivent donc permettre d'espérer un bénéfice thérapeutique. Les thérapies explorées doivent avoir fait la preuve d'une certaine efficacité chez l'Homme pour être utilisées chez le chien spontanément malade. De la même façon, les protocoles appliqués au chien (activité injectée, type de vecteur, quantité de vecteurs) doivent être suffisamment proches des protocoles appliqués à l'Homme pour conserver leur valeur préclinique. Cependant, à l'inverse de chez l'Homme, il n'existe pas ou peu de protocoles de référence (gold standard) en oncologie vétérinaire, ce qui permet, chez les chiens spontanément malades, d'aborder des questions difficilement explorables dans les essais cliniques menés en médecine humaine. C'est le cas, par exemple, du positionnement du traitement à l'étude dans le schéma général de prise en charge des malades, des modalités d'associations thérapeutiques ou encore du développement de méthodologies permettant la personnalisation d'un traitement.

Nous nous sommes placés dans ce contexte pour cette première étude de ciblage du CD22 chez le chien spontanément atteint de DLBCL. Cette approche a fait l'objet de plusieurs essais cliniques chez l'Homme avec des résultats satisfaisants. Nous souhaitions, forts de ces résultats, proposer une thérapie comparable chez les chiens tout en envisageant, quand cela est possible, d'utiliser la RIT en première ligne de traitement après une courte phase de cytoréduction par chimiothérapie (L-asparaginase).

Positionnement de la médecine nucléaire dans le parcours de soin des chiens malades

La médecine nucléaire avec ces deux versants, diagnostique pour l'imagerie et thérapeutique pour la radioimmunothérapie, se prête bien à un travail préclinique chez l'animal spontanément malade. En effet, les techniques d'imagerie TEMP/TDM et TEP/TDM sont des méthodes non invasives qui utilisent les mêmes vecteurs que ceux utilisés pour la RIT. La quantification du signal détecté en imagerie permet d'extrapoler la dose qui serait reçue par les organes sains et les sites tumoraux au cours d'une RIT. Sans préjuger de l'efficacité thérapeutique parfois difficilement corrélable à l'activité injectée, l'évaluation des doses déposées aux organes d'intérêt doit permettre de prévenir les risques toxiques. Ces derniers, liés à l'irradiation des organes sains pour une activité injectée donnée, peuvent en effet être appréciés en se référant aux travaux effectués en radiothérapie. Concernant les sites tumoraux, l'imagerie permet également de calculer des doses déposées qui peuvent être comparées aux résultats observés chez l'Homme. Ainsi, grâce à l'imagerie, il est possible de valider ou d'invalider de façon simple un vecteur sans mise en danger des animaux concernés, que ce soit sur des chiens expérimentaux sains dans les premières phases d'évaluation de ces risques toxiques ou sur des chiens malades pour l'évaluation de la qualité du ciblage tumoral.

Ces étapes d'imagerie préclinique permettent également d'évaluer la pertinence de nouveaux ciblages préalablement validés in vitro, sur modèles de rongeurs ou en clinique humaine pour d'autres applications. C'est le cas par exemple de l'évaluation du ciblage de l'antigène Syndecan I (CD138) dans les cancers du sein triple-négatifs (TN). Ce travail, effectué au sein du laboratoire, utilise un anticorps reconnaissant le CD138 exprimé par les cellules de myélome multiple (MM) et ayant déjà fait l'objet d'un essai clinique de RIT de phase I/II chez des patients atteints de ce type de cancer (Rousseau C. et al., 2012). Cet anticorps a été utilisé avec succès dans un modèle murin xénogénique de cancer TN humain exprimant cet antigène (Rousseau C. et al., 2011). Ainsi, des anticorps monoclonaux spécifiques du CD138 canin ont été générés et leur fixation a été vérifiée en IHC sur des lignées de carcinomes mammaires canins TN (Diab M. et al., 2017). Par la suite, l'imagerie TEMP avec l'anticorps anti-CD138 qui aura été sélectionné devrait permettre d'évaluer l'efficacité du ciblage tumoral ainsi que les risques toxiques en situation de RIT. Par ailleurs, cette imagerie corps entier, même si elle n'est pas suivie d'une thérapie, reste un examen pertinent à réaliser lors du diagnostic afin d'évaluer précisément l'extension de la maladie. En médecine vétérinaire, le traitement de choix des tumeurs mammaires étant d'ordre chirurgical, un tel bilan d'extension corps entier pourrait se révéler être une aide à la décision, plus performante que les examens d'imagerie actuellement prescrits (radiographies thoraciques et échographie abdominale). Il serait alors possible de proposer aux propriétaires des chiens non éligibles à une chirurgie (bilan d'extension positif avec identification de sites métastatiques) une radioimmunothérapie en alternative à l'euthanasie si une chance raisonnable d'amélioration de l'état de l'animal est envisageable. La RIT peut également être proposée aux chiennes développant dans un second temps des métastases. L'obtention d'une preuve de concept de l'efficacité d'un tel traitement pour ce type agressif de cancer est un argument fort pour promouvoir un transfert vers la clinique humaine de cette option thérapeutique.

Positionnement des chiens spontanément malades dans la recherche préclinique en médecine nucléaire

Ainsi, les chiens spontanément malades présentent un grand intérêt pour mettre au point de nouvelles modalités de prise en charge dans le cadre d'un traitement ayant fait la preuve d'une certaine efficacité chez l'Homme, ou encore pour valider de façon pertinente une nouvelle approche thérapeutique explorée avec succès a minima par imagerie dans un modèle préclinique de rongeurs. Le modèle de tumeur canine spontanée se positionne donc dans la chaine d'évaluation d'une approche thérapeutique entre les modèles précliniques de rongeurs et les essais cliniques proprement dits menés chez l'Homme.

Les réactifs validés au cours de ces essais chez le chien pourraient être utiles en médecine vétérinaire mais n'ont pas d'intérêt direct pour l'Homme dans la mesure où les anticorps utilisés sont spécifiques des antigènes canins. Si la validation du concept de thérapie est pertinente chez le chien, ce dernier est de peu d'utilité pour valider un radiopharmaceutique destiné à être utilisé chez l'Homme. Ce n'est pas le cas des modèles murins de tumeur xénogénique pour lesquels le vecteur utilisé est celui que l'on souhaite administrer par la suite à des patients humains. C'est probablement la raison qui fait préférer les modèles de tumeurs xénogéniques, en dépit de leur carence en pertinence physiopathologique, aux modèles de tumeurs murines syngéniques.

A l'avenir, un effort devra être accompli pour sélectionner des anticorps présentant une réaction croisée chien/Homme. Des solutions techniques réalistes sont applicables pour augmenter la fréquence de ces anticorps. Il est possible par exemple, lors de la production d'anticorps, d'effectuer une immunisation avec un antigène d'une espèce et de faire un rappel, une semaine avant le prélèvement des splénocytes, avec l'antigène de la seconde espèce. L'utilisation de deux antigènes pour le criblage des hybridomes devrait permettre d'isoler des anticorps présentant une réaction croisée.

Il reste cependant peu envisageable, dans les premières étapes d'évaluation d'une approche thérapeutique innovante, de travailler directement chez le chien pour des raisons pratiques de coût des réactifs à produire, de la lourdeur de mise en œuvre d'un essai de RIT chez le chien et d'absence de signification statistique des résultats obtenus sur un nombre limité d'animaux. Les modèles murins conservent donc tout leur intérêt pour valider une stratégie de ciblage sur modèle xénogénique de cancer humain et pour évaluer l'intérêt d'associer une RIT à des traitements de chimiothérapie ou d'immunothérapie dans le cas des modèles de tumeurs murines syngéniques. En revanche, la réalisation d'essais cliniques de médecine nucléaire chez des chiens spontanément malades permet de se positionner dans un contexte clinique identique à celui des essais cliniques menés chez l'Homme. En effet, les mêmes caméras sont utilisées pour le chien et pour l'Homme, alors que ces outils sont miniaturisés et nécessitent des méthodes d'analyse spécifiques lorsque le travail s'effectue dans des modèles murins. Les nouvelles méthodologies d'imagerie quantitative développées en clinique vétérinaire seront donc directement transférables à l'Homme. Enfin, la souplesse de la réglementation encadrant la mise en œuvre d'essais cliniques chez les animaux de compagnie ainsi que la disponibilité d'animaux d'expérimentation sains permettent d'investiguer plus facilement de nouvelles méthodes d'imagerie quantitative dans une optique de personnalisation des traitements.

Plus prosaïquement, le travail sur chiens spontanément malades est limité par le nombre de chiens enrôlés. Ceci tient au faible nombre de structures vétérinaires aptes à effectuer une imagerie en médecine nucléaire. A notre connaissance, en France, seules les structures Oniris (Nantes) et Micen Vet (Créteil) sont équipées de caméra TEMP/TDM. Nous avons envisagé de traiter des chiens sur ces deux sites afin d'augmenter nos capacités de recrutement. Cela suppose de mettre en place une chaîne de production des radiopharmaceutiques (couplage de l'anticorps, radiomarquage, contrôle de qualité et transport) apte à répondre aux besoins des cliniciens dans un délai compatible avec le traitement de l'animal malade, sans que son confort de vie ne soit altéré ni que ses chances de survie ne diminuent. Nous collaborons pour cela avec la pharmacie à usage interne (APUI) implantée dans les locaux du Cyclotron ARRONAX de Saint-Herblain, habilitée à délivrer des radiopharmaceutiques. Il est certain que le recrutement d'un grand nombre de chiens malades sera d'autant plus aisé que nous aurons obtenu des résultats cliniques chez les premiers chiens inclus : les vétérinaires référents et les propriétaires de chiens malades seront d'autant plus convaincus de l'intérêt de notre démarche si un bénéfice thérapeutique est obtenu chez les animaux traités. A cet égard, un premier chien échappant au traitement de chimiothérapie a bénéficié d'une RIT anti-CD22 à l'yttrium-90 et mis en rémission au premier palier d'activité (185 MBq.m-2). Il reste bien évidemment à confirmer ce résultat sur d'autres chiens malades pour convaincre la communauté des vétérinaires de l'intérêt de ce traitement peu contraignant pour le propriétaire puisqu'une seule injection de radiopharmaceutique est nécessaire, contrairement aux traitements répétés de chimiothérapie.

En conclusion, il convient de préciser que notre objectif principal, en travaillant sur des chiens spontanément malades, reste d'améliorer les traitements appliqués en clinique humaine plutôt que de développer un médicament à usage vétérinaire. Bien que nous nous placions dans un schéma d'essai clinique vétérinaire, l'approche thérapeutique développée dans l'espèce canine conserve une valeur de transfert et s'effectue dans un contexte préclinique pour l'Homme. Notre objectif est de démontrer la validité d'un traitement sur un nombre limité d'animaux au regard des résultats obtenus dans des cohortes de cas historiques. Nous pensons que cette démonstration d'efficacité permettra de progresser vers une inclusion de la médecine nucléaire dans la pratique vétérinaire pour le bénéfice des chiens et des Hommes.

2. VALIDATION DE L'ANTICORPS 10C6 POUR LA THERAPIE DES CHIENS ATTEINTS DE DLBCL

Le choix du vecteur et des isotopes radioactifs pour l'imagerie et la RIT constitue en lui même un sujet de recherche. Classiquement, des anticorps monoclonaux sont utilisés, plus rarement des fragments de ces anticorps ou, quand cela est possible, des peptides spécifiques d'un récepteur membranaire exprimé par les cellules tumorales. Les essais de ciblage du CD22 ont été réalisés avec des anticorps et plus rarement des fragments F(ab)'2 d'anticorps.

Nous avons choisi d'utiliser un anticorps monoclonal comme vecteur de radioactivité par souci de cohérence avec les essais cliniques menés chez l'Homme, ainsi que pour conserver un potentiel de transfert vers la médecine humaine des méthodes d'imagerie et de traitement mise en place chez le chien en cas de succès. De plus, seuls les anticorps sont utilisés aujourd'hui dans les techniques d'immunohistochimie (IHC) de routine : il était important, dans le projet global au sein duquel s'inscrit notre travail de thèse, que l'expression du CD22 canin puisse être objectivée sur des biopsies à l'aide d'un des anticorps produits par le laboratoire (aucun anticorps anti-CD22 canin n'est disponible à la vente, ni pour l'IHC ni pour aucune autre technique diagnostique).

Lorsque ce projet a été initié, il n'existait pas, à notre connaissance, de molécule ciblant le CD22 canin, qu'il s'agisse d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de molécule de plus petite taille. Sept anticorps spécifiques du CD22 canin, produits par la méthode des hybridomes, ont été isolés. La sélection de ces clones d'intérêt a été réalisée par criblage des surnageants d'hybridomes en cytométrie en flux sur des cellules CH0 transfectées avec le CD22 canin et confirmée sur une lignée cellulaire de lymphome B diffus à grandes cellules de chien exprimant cet antigène. Cette méthode de sélection permet de s'assurer que tous les hybridomes retenus produisent des anticorps monoclonaux reconnaissant la forme native du CD22 canin.

La première étape de ce travail de thèse a donc consisté à caractériser ces anticorps et à sélectionner celui qui serait le plus adapté au diagnostic en IHC ainsi qu'à une utilisation en médecine nucléaire.

Capacités internalisantes des anticorps anti-CD22 canin produits

Dans un premier temps, nous avons cherché à tirer parti de ce panel d'anticorps monoclonaux pour étudier le phénomène d'internalisation du complexe antigène-anticorps et les variations possibles selon l'anticorps utilisé. Une des caractéristique du CD22 est son endocytose clathrine-dépendante après fixation d'un anticorps (John B. et al., 2003). Dans le contexte spécifique du ciblage du CD22 en médecine nucléaire, le comportement intracellulaire du radiopharmaceutique est d'une importance primordiale puisqu'il a un impact sur la répartition de l'activité injectée. La qualité de l'imagerie phénotypique et l'efficacité de la radioimmunothérapie en dépendent. Les isotopes internalisés et séquestrés dans la cellule après dégradation de leur vecteur, tels les isotopes métalliques chélatés, conservent une activité résiduelle augmentant le dépôt de dose. A l'inverse, le catabolisme des anticorps radiomarqués à l'iode aboutit à la production de iodo-tyrosine rapidement excrétée dans le milieu extracellulaire (Naruki Y. et al., 1990; Geissler F. et al., 1992). Cette propriété d'internalisation détermine également l'efficacité des conjugués anticorps-médicament (ADC) en agissant sur la libération intracellulaire de la molécule transportée par l'anticorps. Le devenir de l'anticorps après sa fixation sur le CD22 a été largement étudié mais reste controversé. Certains auteurs privilégient son cheminement vers une voie de recyclage à la membrane cellulaire via les endosomes, tandis que d'autres plaident en faveur d'une dégradation lysosomale (O'Reilly MK. et al., 2011 ; Shan D. and Press OW., 1995). Le plus souvent, le processus d'internalisation du CD22 a été évalué à l'aide d'un unique anticorps sur plusieurs lignées cellulaires de lymphome B, soulignant les capacités variables d'internalisation de ces lignées d'origines différentes.

En ce qui concerne notre travail, l'internalisation a été évaluée en mesurant la liaison des anticorps à 4°C et à 37°C sur les cellules de la lignée CLBL-1 et à différentes concentrations en anticorps correspondant à des niveaux comparables de saturation de l'antigène CD22 pour tous les anticorps. Il apparaît clairement qu'à une concentration saturante (10 fois la constante d'affinité relative K_D de l'anticorps), une internalisation est observée pour tous les anticorps avec des différences de cinétique et d'intensité. Cependant, à une concentration non saturante, des différences flagrantes apparaissent entre les anticorps. Certains d'entre eux, tels le 5C2, le 10C6 et le 2D1, conservent leur capacité d'internalisation. D'autres, tels le 1E3, le 5F8, le 6B7, et dans une plus grande mesure le 5C3, ont une action de stabilisation à la surface cellulaire à l'origine d'une expression membranaire plus élevée à 37°C qu'à 4°C. Ces observations indiquent que l'internalisation dépendrait non seulement de la liaison de l'anticorps sur sa cible mais également de la quantité d'anticorps liés à la surface de la cellule. Un seuil d'occupation de l'antigène, caractéristique de chaque anticorps, doit être dépassé pour que l'internalisation ait lieu au cours des six heures du test. Il est intéressant de noter que ces différences de propriétés d'internalisation sont concordantes avec la nature de l'épitope reconnu. L'anticorps 2D1 est une exception : il reconnaît un épitope chevauchant avec les anticorps 5F8, 1E3 et 6B7, mais présente un profil d'internalisation très différent.

Les différentes capacités du fragment d'anticorps monovalent et divalent, ou encore de l'anticorps natif, à induire une internalisation du récepteur de la transferrine (TfR), généralement considéré comme un paradigme d'internalisation dépendant de la clathrine et de son recyclage à la membrane, ont déjà été étudiées. La saturation du récepteur de la transferrine avec le fragment monovalent F(ab)' n'a aucun effet sur l'internalisation du TfR, contrairement au fragment bivalent F(ab)'2 et à l'IgG complète (Lesley J et al., 1989). Nous émettons l'hypothèse que la capacité de chaque anticorps à réticuler deux antigènes CD22 canins peut-être soit énergétiquement favorable, soit défavorable, en fonction de la topologie de l'interaction antigène-anticorps (épitope-paratope). Dans le cas des anticorps 10C6 et 5C2, la liaison de la première valence de l'anticorps au CD22 canin pourrait favoriser la liaison de la deuxième valence, aboutissant à la réticulation du CD22 canin membranaire et à son internalisation lorsque la concentration en anticorps est non saturante. Inversement, dans le cas des anticorps monoclonaux 1E3, 5F8, 6B7 et 5C3, une charge importante en anticorps serait nécessaire pour compenser un « cross linking » du CD22 canin énergétiquement moins favorable afin qu'elle se produise à une fréquence et/ou pendant une durée suffisantes pour induire une internalisation du complexe antigène-anticorps.

Ainsi nous émettons l'hypothèse que l'internalisation est dépendante de l'épitope reconnu sur l'antigène et des contraintes thermodynamiques que cela impose pour permettre le pontage des antigènes CD22 nécessaire au mécanisme d'internalisation. Ce panel de sept anticorps est donc une opportunité pour étudier les mécanisme moléculaires de l'internalisation. Ce travail reste à faire, les outils que constituent ces anticorps permettant de l'aborder en microscopie et en cytofluorimétrie pour une évaluation quantitative des capacités d'internalisation et de résidence dans le compartiment intracellulaire, ou de recyclage à la membrane.

Comportement in vivo de l'anticorps 10C6 après radiomarquage

Bien que l'objectif premier de ce travail de thèse n'était pas de disséquer en détails le mécanisme et la régulation de l'internalisation du CD22 canin, les résultats obtenus et discutés ci-dessus nous ont permis de démontrer qu'il est possible d'identifier des anticorps monoclonaux anti-CD22 canin fortement et faiblement internalisants. Dans un contexte de radioimmunothérapie, il est possible que ces différences de comportement modifient la dose déposée aux organes.

Pour répondre à cette question, une étude de biodistribution des anticorps 5C2 et 10C6 d'une part (fortement internalisants), et 1E3 et 6B7 d'autre part (moyennement internalisants),

a été réalisée dans un modèle murin xénogreffé avec la lignée CLBL-1 et après radiomarquage des anticorps à l'iode-125. Même si le pourcentage d'activité par gramme dans la tumeur reste assez faible, ces résultats sont conformes à ce qui est décrit dans la littérature après injection de l'anticorps monoclonal anti-CD22 humain hLL2 dans un modèle murin comparable (Mattes MJ. *et al.*, 1997). Aucune différence significative n'a été observée concernant la biodistribution dans les différents organes sains. Les activités hépatiques et rénales pourraient être expliquées par la cinétique sanguine et sembleraient correspondre à une absence de liaison des anticorps dans ces organes, ainsi que nous pouvions nous y attendre avec une IgG₁ murine spécifique d'un antigène canin. La fixation tumorale de l'anticorps monoclonal radiomarqué est également similaire pour les quatre anticorps étudiés. La seule différence notable mais non significative est la tendance des anticorps 10C6 et 5C2 à s'accumuler plus rapidement dans la tumeur. Par exemple, 4 h après l'injection, l'activité dans la tumeur pour l'anticorps 10C6 est proche de celle observée à 16 h (4,3 ± 0,6 et 4,7 ± 1,0 % d'Al.g⁻¹, respectivement), contrairement à l'anticorps 6B7 (3,4 ± 0,2 et 4,7 ± 1,2 % d'Al.g⁻¹ respectivement).

L'anticorps 10C6 ayant la plus haute affinité et la meilleure capacité de reconnaissance du CD22 canin en IHC à visée diagnostique chez le chien, nous avons investigué plus avant ses propriétés de radiopharmaceutique afin de réaliser des imageries phénotypiques et une prise en charge par radioimmunothérapie de chiens spontanément malades. En effet, ces applications nécessitent l'utilisation de l'anticorps 10C6 radiomarqué avec des isotopes métalliques : le cuivre-64 pour l'imagerie TEP/TDM, l'indium-111 pour l'imagerie TEMP/TDM et enfin l'yttrium-90 ou le lutétium-177 pour la RIT.

L'utilisation de l'agent chélatant DOTA nous paraissant un bon choix de chélate bifonctionnel permettant le radiomarquage avec les quatre isotopes cités précédemment, nous avons contrôlé que l'affinité de l'anticorps n'était pas affectée par le couplage au DOTA. Ce contrôle a été effectué en réalisant une imagerie TEP/TDM à l'aide du radiopharmaceutique ⁶⁴Cu-DOTA-10C6 dans un modèle murin xénogreffé avec la lignée canine CLBL-1. Malgré le faible niveau d'accumulation de l'anticorps radiomarqué dans ce modèle tumoral, la tumeur souscutanée est clairement détectée au temps 16 h après injection, validant ainsi la préservation de l'affinité du vecteur DOTA-10C6. Une étude de biodistribution effectuée en parallèle a montré des résultats similaires à ce qui avait été décrit lors de l'étude de biodistribution réalisée avec les anticorps anti-CD22 canin radiomarqués à l'iode-125. Toutefois, des différences mineures sont relevées. Nous notons par exemple que le pourcentage d'activité injectée par gramme dans le foie est supérieur avec le ⁶⁴Cu-DOTA-10C6 du fait de l'élimination du cuivre par les voies biliaires. Notre choix de radioisotope s'est porté sur cuivre-64 pour cette imagerie en raison de sa production locale par le Cyclotron ARRONAX ainsi que pour la disponibilité de la machine µTEP/TDM sur Oniris. Nous savons cependant que le DOTA n'est pas le meilleur chélate du cuivre (Rylova SN. *et al.*, 2018). Ceci peut expliquer la forte absorption hépatique constatée 16 h après l'injection et la rapide cinétique sanguine de l'anticorps marqué au cuivre-64, entrainant un pourcentage d'activité injectée par gramme de cœur, essentiellement lié à la présence de l'anticorps circulant, inférieur à celui observé à l'aide de l'anticorps marqué à l'iode-125.

Il a été décidé de réaliser des imageries phénotypiques de type immuno-TEMP/TDM chez le chien en radiomarquant les anticorps à l'indium-111 et d'effectuer un radiomarquage à l'yttrium-90 pour la RIT, leurs complexes formés avec le DOTA étant plus stables. Ce choix de radioélément (yttrium-90) devrait permettre un dépôt de dose plus élevé dans les sites tumoraux, comme le montre l'équipe de Sharkey en comparant un anticorps anti-CD22 iodiné ou marqué à l'indium-111 dans leur étude de biodistribution dans un modèle murin xénogreffé avec la lignée cellulaire humaine RL (lymphome B non-hodgkinien) (Sharkey RM. *et al.*, 1997).

En conclusion, nous disposions au départ de sept anticorps monoclonaux, tous dirigés contre la forme native du CD22 canin exprimée par les cellules de la lignée CLBL-1 de DLBCL canin. Chacun de ces anticorps correspond à un clone unique, leur originalité dépendant de leur isotype, de leur affinité relative, de l'épitope reconnu et de leur capacité à être utilisé pour des techniques d'immunohistochimie. La mise à disposition d'un tel panel d'anticorps nous a donné l'opportunité de sélectionner l'anticorps monoclonal le plus adapté à la fois pour une utilisation à visée diagnostique en immunohistochimie et en imagerie, ainsi que pour une utilisation à visée thérapeutique en médecine nucléaire (radioimmunothérapie). En effet, pour faciliter la démarche générale et limiter les coûts, il était important de pouvoir disposer d'un unique anticorps pour une utilisation en IHC et dont l'affinité pour sa cible serait conservée après couplage au DOTA et radiomarquage à l'indium-111 et à l'yttrium-90.

3. IMAGERIE QUANTITATIVE : PROBLEMATIQUE ET METHODE DE QUANTIFICATION DES IMAGES

Cette partie du travail fait appel à des compétences en physique plus qu'en biologie. Il s'agit en effet d'extraire, à partir des fichiers images, la quantité de signal contenue dans un volume donné en s'affranchissant des erreurs induites par les processus d'atténuation, de diffusion des rayonnements et d'imprécision de la localisation des lieux d'émission des rayonnements qui donnent lieu à un halo autour des organes irradiés, autrement appelé effet de volume partiel.

Pertinence des doses calculées

L'étude dosimétrique que nous avons présentée a été réalisée à partir de la détermination des pourcentages d'activité injectée par kilogramme d'organe calculés selon une méthode relative : l'activité détectée dans un organe à un point-temps donné a été rapportée à l'activité détectée dans l'organisme entier 1 h après le début de l'injection intraveineuse du radiopharmaceutique, la valeur absolue de l'activité injectée étant connue par mesure à l'activimètre de la solution de radiopharmaceutique avant injection. Cette approche se base sur l'évaluation de la quantité de vecteurs radiomarqués présente dans l'organe d'intérêt à un moment donné. Il est ensuite possible de se projeter dans un contexte de RIT et de calculer, pour l'émetteur bêta ou alpha considéré, les doses déposées aux organes. A aucun moment il n'est nécessaire de connaître la valeur absolue de l'activité présente dans les organes. Ainsi cette approche nous permet de travailler directement à partir des imageries quantitatives immuno-TEMP/TDM, contrairement à ce qui a été décrit par exemple par l'équipe d'Adnan qui disposait, à coté des patients imagés, une source radioactive calibrée permettant par un simple calcul de connaître la valeur absolue de l'activité présente dans un temps donné (Adnan A. *et al.,* 2018).

Cette méthode de calculs relatifs largement utilisée dans les modèles de rongeurs a également été décrite pour la dosimétrie de gros animaux par Lassman et son équipe à l'occasion d'une étude de dosimétrie effectuée chez des cochons après injection d'un antagoniste de la somatostatine radiomarqué au lutetium-177 (Beykan S. *et al.*, 2016). Les pourcentages d'activité injectée par kilogramme d'organe ont été déterminés en prenant pour référence l'activité détectée dans le corps entier des animaux lors de la première imagerie TEMP/TDM

(100%) et en délimitant manuellement les volumes d'intérêt sur les coupes TDM à chaque acquisition. L'activité cumulée de chaque organe a été calculée en intégrant la fonction représentant l'activité d'un organe en fonction du temps entre 0 et l'infini. Dans leur étude, les auteurs acceptent une imprécision systématique de 10% concernant leur calcul de doses absorbées en utilisant cette méthode.

Dans notre travail, les résultats de calcul des doses absorbées sont présentés avec une erreur correspondant à l'erreur effectuée lors de la détermination de l'activité cumulée (c'est à dire lors de l'intégration de la fonction représentant l'activité dans un organe en fonction du temps et ajustée par une régression non linéaire de type exponentielle simple ou double). Ainsi ces calculs ne tiennent pas compte de l'erreur faite lors de la détermination de l'activité présente dans un volume d'intérêt : l'activité détectée dans une région d'intérêt à un temps donné est déterminée par le logiciel 3D Slicer d'après les informations de contourage fournies par l'utilisateur. Or le contourage des régions d'intérêt peut être réalisé de plusieurs manières. En effet, nous avons choisi de réaliser un contourage à partir des images TDM en respectant les limites anatomiques des organes. Cependant, l'activité pouvant être attribuée à un volume « déborde » de ce dernier : il s'agit de l'effet de « spill-out » (cf Figure 41 et Figure 44). Dans leur étude, Lassman et son équipe délimitent également les organes d'intérêt à partir des images TDM, en rajoutant une zone périphérique de deux voxels de largeur afin de s'assurer de prendre en compte toute l'activité pouvant être attribuée au volume d'intérêt. Cette méthode leur permet ainsi de prendre en compte les effets de « spill-out ». Toutefois, cette méthode ne prend pas en compte les effets de « spill-in » qui correspondent à l'attribution de l'activité en provenance d'un volume adjacent au volume étudié. Dans le cas des chiens imagés dans notre étude, les organes d'intérêt sont anatomiquement proches : le foie n'est séparé des poumons que par le diaphragme sur toute sa face crâniale, le rein droit est enchâssé dans le foie sur près de 50% de sa longueur et la rate, en plus de longer le rein gauche, peut également être accolée à une portion des lobes hépatiques. Cette proximité anatomique est d'autant plus importante que les animaux sont maigres : le tissu adipeux intra-abdominal présent autour et entre les différents organes n'est pas ou peu présent, rendant même parfois difficile la visualisation des limites anatomiques des organes. Afin que les effets de « spill-out » puissent être pris en compte de manière adéquate avec une erreur d'attribution de l'activité détectée la plus faible possible, il faudrait donc que les organes d'intérêt soit écartés les uns des autres d'une distance équivalente à quatre fois la largeur d'un voxel, soit 16 mm environ. Chez l'ensemble des chiens imagés au cours de ce travail, la distance existant entre le foie et les poumons, entre le foie et le rein droit ou encore entre la rate et le foie, est bien inférieure.

Afin de s'affranchir de ces effets de « spill-in » et de « spill-out », nous avons réalisé une étude préliminaire de détermination des doses absorbées déposées dans les organes d'intérêt en basant nos calculs à partir de l'activité détectée dans des volumes restreints au sein de ces mêmes organes. Nous avons fait l'hypothèse qu'en s'intéressant à un petit volume de l'organe, l'effet de « spill-out » serait compensé par l'effet de « spill-in ». Nous devrions donc obtenir,par cette méthode de calcul, une dose déposée dans l'organe supérieure à celle calculée en contourant l'organe entier selon ses limites anatomiques. Les résultats obtenus sont très variables d'un organe à un autre et selon le volume restreint étudié, il y a parfois sur-estimation ou sous-estimation de la dose par rapport à la valeur de référence obtenue par contourage de l'organe entier.

L'équipe de Sandström a réalisé une étude comparable chez des patients atteins de tumeurs neuro-endocrines (TNE) après injection de DOTATATE radiomarqué au lutetium-177 (Sandström M. *et al.*, 2015). Les doses absorbées calculées à partir de l'activité détectée dans la totalité de l'organe (délimitation anatomique d'après les images TDM) ont été comparées à celles obtenues en déterminant l'activité présente dans un volume restreint de 4 mL centré sur la région de l'organe présentant le plus fort signal. Cette étude a été réalisée pour les reins et la rate. En ce qui concerne les reins, la dose calculée à partir de la détermination de l'activité présente dans une petite région au sein de ce même organe sous-estime les doses calculées par la méthode de délimitation d'un volume d'intérêt en respectant les limites anatomiques de l'organe. Ces résultats sont surprenants, d'autant plus que le volume restreint était centré sur la région présentant le plus fort signal : l'inverse était attendu. Les auteurs proposent comme explication que ces volumes étant réellement petits, un effet de volume partiel non négligeable intervient et induit une erreur importante sur la dose absorbée ainsi calculée.

Dans notre étude, les volumes restreints contourés dans les reins étant de 15,7 mL, le volume de chacun des reins d'un chien beagle de 11 kg environ se situant aux alentours de 40-50 mL (en ce concerne les chiens inclus dans notre étude). Nous avons comparé les pourcentages d'activité injectée par kilogramme d'organe selon les deux méthodes de contourage explicitées précédemment. Les résultats obtenus pour le rein droit et le rein gauche des trois chiens concernés par ce travail sont similaires entre eux : la méthode dite « des volumes restreints » sous-estime très légèrement les valeurs obtenues avec la méthode dite « de l'organe entier », comme ce qui est décrit dans l'étude de Sandström (Sandström M. *et al.*, 2015).

Pour les autres organes, notamment la rate et le foie, il est cependant beaucoup plus difficile de conclure. En effet si, d'une manière générale, le pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe est supérieur lorsque la méthode de contourage employée est celle dite « de l'organe entier », les résultats sont variables d'un animal à l'autre et d'un volume restreint à un autre pour un même animal. Il serait intéressant d'évaluer ces variations selon le volume de la région restreinte contourée ainsi que selon sa localisation, car il est fort probable que l'activité au sein d'un organe de grande taille ne soit pas uniformément répartie. De plus, plus le volume contouré est de grande taille, plus l'effet de volume partiel est négligeable (effet de « spill-out »). Enfin, le calcul des cross-doses pour chacun des organes d'intérêt a montré que ces dernières étaient négligables (effet de « spill-in »).

Notre étude reste cependant très préliminaire. Le nombre d'échantillons de volumes d'organe de différentes tailles que nous avons quantifiés reste insuffisant pour conclure sur les paramètres permettant d'obtenir de façon fiable et reproductible des valeurs de doses aux organes. Les résultats contre-intuitifs de sous estimation des doses dans des volumes restreints mériteraient une modélisation mathématique pour mieux comprendre les phénomènes en jeu et définir l'erreur associée à une méthode donnée. Cette étude pourrait dans un premier temps être effectuée sur fantôme. L'observation d'une moindre erreur de l'opérateur sur le calcul de dose à partir des volumes restreints par Sandström M. *et al.* est intéressante. Il est en effet évident qu'une erreur entache chacune de nos mesures tant les paramètres à contrôler sont nombreux et variables d'un patient à l'autre (taille, âge, etc....) et d'un centre d'investigation à l'autre (opérateur, calibration des appareils de mesure et des caméras, type de caméra utilisé et algorithme d'analyse d'image associé, erreur volumétrique à l'injection, etc...).

Tout comme l'utilisation de la valeur relative de pourcentage de dose injectée par gramme limite l'erreur effectuée dans l'évaluation de l'activité injectée et donc sur les mesures de valeurs absolues d'activité détectée dans les images, il nous semble important, dans une approche pragmatique, de limiter autant que faire ce peut toute source d'erreur. L'échantillonnage des volumes d'organe, dans la mesure où il limite les variations liées à l'opérateur et facilite la quantification des images, est une option à retenir pour une pratique clinique. En d'autres termes il nous apparaît plus important de définir des méthodes de mesure en se focalisant sur la fidélité plutôt que sur la justesse de la mesure.

Dans notre étude, toutefois, nous avons décidé de réaliser les calculs de doses absorbées déposées aux organes en nous basant sur l'activité détectée dans les organes entiers : une erreur existe, difficilement évaluable, mais probablement du même ordre de grandeur d'un chien à l'autre, au moins pour les animaux de même gabarit.

Evaluation de la biodistribution de l'anticorps 10C6 et pharmacocinétique

L'imagerie nucléaire permet d'accéder à l'activité déposée dans un organe donné de façon non invasive. Ce n'est pas le cas pour les médicaments qui ne sont pas traçables et où la seule valeur aisément accessible est leur concentration sanguine.

Dans le cas d'un anticorps radiomarqué injecté, c'est la radioactivité qui est le principe actif. L'anticorps immunoréactif permet le ciblage mais n'a généralement pas d'action antitumorale proprement dite. Ainsi l'anticorps radiomarqué immunoréactif a une activité antitumorale du fait du ciblage et est toxique du fait de sa circulation sanguine, alors que l'anticorps radiomarqué non-immunoréactif, les produits de dégradation de cet anticorps ainsi que les isotopes libres ont une activité essentiellement toxique. Il est notable que la quantification des images donne accès à une activité sans permettre de distinguer si elle correspond à un isotope libre, est associée à un fragment d'anticorps dégradé et non immunoréactif ou associée à un anticorps immunoréactif.

De ce fait la notion de dose ne recouvre pas la même réalité en pharmacocinétique d'un médicament où elle représente une quantité de produit, alors que la dose radioactive représente une quantité d'énergie. Dans le second cas la valeur est dissociée de la quantité de vecteurs puisque les activités spécifiques ainsi que l'immunoréactivité du radiopharmaceutique peuvent varier d'un patient à l'autre ou d'un centre d'investigation à un autre.

Le calcul de dose à partir des données de biodistribution extraites des images de l'anticorps radiomarqué avec un isotope adapté à l'imagerie constitue également une source d'erreur. Dans notre cas l'imagerie est effectuée à l'aide d'indium-111 et la RIT à l'aide d'ytrium-90. Le tropisme de chacun de ces isotopes pour un organe donné, les voies de détoxification de l'indium et de l'yttrium, la stabilité de ces deux éléments au sein du chélate sont autant de sources d'incertitude lorsque l'on extrapole à l'anticorps marqué à l'yttrium-90 les données d'imagerie obtenues avec un anticorps marqué à l'indium-111.

Autant que faire ce peut, il est donc souhaitable d'utiliser différents isotopes d'un même élément pour effectuer l'imagerie puis la thérapie, dans un souci de justesse des valeurs extrapolées de l'imagerie. Un certain nombre de couples d'isotopes peuvent être utilisés dans une approche dite « théranostique ». C'est le cas du cuivre-64 émetteur de positons pour l'imagerie TEP et du cuivre-67 émetteur bêta pour la thérapie, ou du couple iode-123 émetteur gamma pour l'imagerie TEMP et iode-131 émetteur bêta pour la thérapie. Dans la pratique, certains de ces isotope sont en cours de développement et peu disponibles en fréquence et en quantité (⁶⁴Cu/⁶⁷Cu) ou de qualité médiocre, limitant leur utilisation.

Dans notre cas nous devrions donc en toute rigueur parler de dose calculée apparente à un organe donné plutôt que de la dose à l'organe qui n'est pas accessible à la mesure. Là encore une erreur est attachée au calcul de la dose qu'il convient d'apprécier. L'utilité de la dose calculée pour anticiper un effet toxique et thérapeutique n'est cependant pas à remettre en cause tant que les méthodes de mesure et de calcul appliquées sont reproductibles. Ainsi il est possible que nous ne soyons pas capables de documenter précisément la dose à un organe entrainant une toxicité ou une réponse tumorale, mais plutôt la relation qui lie ces effets à l'activité injectée, définie à partir des données de dosimétrie extraites de l'imagerie TEMP pour chaque patient. De façon similaire il est possible au niveau expérimental d'étudier les conséquences de la variation d'un paramètre liée au radiopharmaceutique sans définir précisément la dose déposée aux organes. C'est ce que nous avons voulu réaliser en étudiant sur quelques chiens la part de la dose attribuable au volume sanguin ou au compartiment extravasculaire de l'organe et en évaluant l'influence de l'activité spécifique du radiopharmaceutique sur sa pharmacocinétique.

Evaluation du volume sanguin des organes

Nous avons souhaité faire une distinction entre l'activité présente dans un volume d'intérêt liée à la circulation du radiopharmaceutique dans le sang circulant et l'activité liée à la présence du radiopharmaceutique dans le compartiment extravasculaire (CEV) de ce même volume. L'objectif de cette distinction est d'identifier les modalités d'accumulation des anticorps, saturables ou non, au sein des organes. Des caractéristiques de métabolisme et de fixation spécifique peuvent être ainsi mises en évidence. En effet, habituellement, les modèles de pharmacocinétique utilisés ne prennent en compte qu'un compartiment central (le sang) et un compartiment périphérique (les organes et les masses tumorales). Les informations obtenues permettent de déterminer la pharmacocinétique du radiopharmaceutique étudié dans le sang mais pas d'affiner la biodistribution tissulaire dans les organes et les tumeurs (Fronton L. et al., 2014). Il semble donc pertinent de s'intéresser au devenir du radiopharmaceutique dans les organes de manière plus précise et d'identifier les accumulations de ce dernier dans le compartiment extravasculaire des organes. Morschhauser et son équipe ont réalisé une approche similaire à la notre mais en déterminant le volume sanguin des organes d'intérêt lors d'une première acquisition TEMP/TDM programmée précocement après l'administration d'111In-ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN[©]) chez des patients atteints de lymphomes folliculaires (Morschhauser F. et al., 2018). Les auteurs ont fait l'hypothèse que l'activité détectée dans les organes 1 h après l'injection du radiopharmaceutique est liée à la présence de ce dernier dans le sang uniquement. En ayant accès à l'activité présente dans un volume sanguin déterminé par comptage d'un volume de sang périphérique au compteur gamma, ainsi qu'à l'activité détectée dans les organes d'intérêt par quantification des images, ils en déduisent le volume sanguin de chaque organe et le volume total de sang du patient. Ces informations de volume sanguin spécifique de chaque organe et de chaque patient leur ont permis de construire un modèle pharmacocinétique plus précis. Ils ont ainsi pu évaluer l'évolution de la concentration en anticorps radiomarqué présente dans le parenchyme des organes d'intérêt au cours du temps.

Notre travail de détermination des volumes sanguins des différents organes d'intérêt a été réalisé à la même période et notre choix s'est porté sur une méthode différente. Nous avons administré par voie intraveineuse de l'albumine humaine de synthèse radiomarquée au technetium-99m (VASCULOCIS®) spécifiquement dédiée aux mesures de volumes sanguins. Ainsi en réalisant une acquisition TEMP/TDM à un temps très précoce (moins de 1 h) après l'injection de ce radiopharmaceutique, nous pouvons faire l'hypothèse que la totalité de l'activité détectée dans un volume d'intérêt peut-être directement reliée à la présence du radioconjugué dans le compartiment vasculaire de l'organe. Pour ces images, nous avons réalisé un prélèvement sanguin quelques minutes avant le début de l'acquisition TEMP/TDM et un tube contenant un volume de sang connu a été placé sur le flanc gauche de l'animal dans le lit de la TEMP. La détermination de l'activité détectée dans les organes d'intérêt par exploitation des imageries quantitatives a permis de déterminer le volume sanguin de chacun des organes étudiés.

Ainsi, en connaissant le volume sanguin des organes d'intérêt et l'activité présente dans un volume connu de sang imagé aux côtés de l'animal, il est possible de déterminer, quel que soit la nature du radiopharmaceutique administré, par exploitation des imageries quantitatives, la part d'activité liée à la présence de ce dernier dans le sang circulant et la part d'activité liée à sa présence dans le compartiment extravasculaire des organes considérés.

En admettant l'hypothèse que l'anticorps radiomarqué permet bien de tracer les quantités totales d'anticorp fixées dans un organe, ce type d'approche permet, en corrigeant les pourcentages d'activité injectée par kilogramme de la décroissance de l'isotope utilisé pour l'imagerie, d'accéder à la quantité d'anticorps fixée dans le compartiment extra-vasculaire (CEV) d'un organe donné et de la mettre en relation avec la quantité d'anticorps injectée. L'observation des quantités d'anticorps dans le CEV des organes rapportées à la quantité d'anticorps injectée par kilogramme de poids total devrait également permettre de définir si la quantité d'anticorps présents dans le CEV est proportionnelle à la quantité d'anticorps injectée, ou si le CEV est saturable. Dans les essais d'imagerie que nous avons réalisés sur chiens sains et malades en faisant varier l'activité spécifique du radiopharmaceutique injecté (variation de la quantité d'anticorps froid co-injectée avec le radiopharmaceutique par kilogramme de poids total), il semble que la fixation dans le CEV du foie et des poumons est proportionnelle à la quantité d'anticorps injectée, alors qu'un phénomène de saturation est observé pour la rate, les reins et la moelle osseuse hématopoïétique. Ces résultats doivent être validés sur un plus grand nombre de chiens sains et pour une gamme plus large de quantités d'anticorps injectées. La confirmation de ces résultats permettrait d'établir sur chiens expérimentaux les quantités saturantes d'anticorps à injecter. La comparaison de la fixation des anticorps dans le CEV des organes ou des sites tumoraux des chiens malades comparativement aux standards établis sur chiens sains permettrait de calculer la quantité d'antigènes présents dans l'organe considéré et ainsi de choisir, pour chaque chien malade, la quantité totale d'anticorps à injecter ainsi que l'activité du mélange administré pour optimiser le ciblage des tumeurs, tout en réduisant la toxicité systémique liée à l'anticorps radiomarqué circulant.
4. CO-INFUSION ET VARIATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE

Les protocoles de RIT anti-CD22 chez l'Homme font intervenir une co-injection, encore appelée co-infusion, d'anticorps froid : le vecteur froid et le vecteur radiomarqué sont administrés par voie intraveineuse au patient de manière concomitante. A cet effet, une petite quantité d'epratuzumab (1,5 mg) couplé avec du DOTA et radiomarqué à l'yttrium-90 est mélangée dans la seringue d'injection avec de l'epratuzumab froid pour une dose totale d'anticorps de 1,5 mg.kg⁻¹.

Toutefois, la détermination de la quantité optimale d'anticorps froid co-injectée avec le radiopharmaceutique reste empirique. Le <u>Tableau 44</u> récapitule les informations relatives aux quantités d'anticorps injectées, à l'activité spécifique du mélange radioactif dans la seringue d'injection, aux isotopes utilisés ainsi qu'aux doses absorbées calculées pour les organes d'intérêts et les sites tumoraux, pour les différentes études cliniques de RIT anti-CD22 menées jusqu'à aujourd'hui.

Les résultats de la première étude clinique menée chez des patients avec un anticorps murins anti-CD22 radiomarqué à l'iode-131 ont été portés à la connaissance de la communauté scientifique en 1991 par Goldenberg et son équipe (Goldenberg DM. *et al.*, 1991). Les auteurs émettent l'hypothèse que l'activité injectée n'influe pas sur la dose déposée aux organes et aux tumeurs : la dose calculée est identique pour une activité injectée de 296 MBq et de 1195,1 MBq. Or les quantités d'anticorps ne sont pas fixes, et sont de 0,58 mg et 2,38 mg respectivement, ce qui équivaut à des activités spécifiques comparables de 510 MBq.mg⁻¹ et 502,1 MBq.mg⁻¹.

La seconde étude clinique de RIT anti-CD22 a été menée chez des patients afin de comparer, dans une première étape, l'efficacité du ciblage à l'aide de l'anticorps murin LL2 (Juweid M. *et al.*, 1995). Parmi les 6 patients traités (deux injections espacées d'une semaine), tous ont reçu une première injection de 2 mg de radiopharmaceutique (activité spécifique variant de 444 à 592 MBq.mg⁻¹) alors que la quantité de protéines administrée lors de la seconde injection a varié : co-injection de 2 mg de ¹³¹I-LL2 et de 18 mg d'anticorps froid (activité spécifique < 55,5 MBq.mg⁻¹) pour 4 patients, co-injection de 2 mg de ¹³¹I-LL2 et de 48 mg d'anticorps froid (activité spécifique < 22,2 MBq.mg⁻¹) pour 1 patient et pré-dose de 18 mg d'anticorps froid 20 minutes avant l'administration de 2 mg de ¹³¹I-LL2 chez le dernier patient. Les résultats de cette étude montrent que la demi-vie sanguine du radiopharmaceutique varie selon la quantité d'anticorps totale injectée : 12,7 ± 5,1 h à 2 mg versus 20,1 ± 3,2 h à 50 mg. En

situation de pré-dose, la demi-vie sanguine du radiopharmaceutique s'élève à 52,5 h (26 h pour la quantité 2 mg). De plus, l'augmentation de la quantité en anticorps s'accompagne d'une diminution des doses déposées à la moelle osseuse hématopoïétique et à la rate ainsi que d'une augmentation du rapport de dose tumeur/moelle osseuse hématopoïétique (MOH). Cependant, pour le patient ayant reçu une pré-dose de 20 mg d'anticorps froid, les doses déposées aux tumeurs et à la MOH sont plus faibles (diminution de 54% et 34% respectivement). De plus, l'évolution du rapport de dose tumeur/MOH varie selon la taille du site tumoral étudié.

La seconde étape de cet essai clinique a consisté à réaliser une étude d'escalade de dose avec une première phase d'imagerie (injection de 10 mg d'anticorps) suivi une semaine plus tard d'une RIT potentiellement myéloablative (100 mg d'anticorps). Pour l'un des patients chez qui il n'a pas été objectivé de modification significative de la taille des sites tumoraux entre les deux injections, il a été montré que, lorsque la quantité d'anticorps injectée est de 100 mg comparé à l'injection de 10 mg d'anticorps, la dose déposée aux tumeurs était de 25-60% inférieure et que les ratios de dose tumeur/organe étaient de 20-70% inférieurs.

Enfin, la dernière étape de cette étude clinique a reposé sur l'évaluation des différences de biodistribution entre l'anticorps chimérique cLL2 et l'anticorps humanisé hLL2, encore appelé epratuzumab (injection de 2 mg de protéines). La demi-vie sanguine du cLL2 est de 17,2 ± 14,3 h. La demi-vie sanguine de l'epratuzumab est de 18,4 ± 6,8 h et les valeurs des doses absorbées sont comparables à celles calculées pour le mLL2 et présentées dans le <u>Tableau 44</u>.

A l'aide de l'ensemble de ces résultats, les auteurs concluent en expliquant que la biodistribution d'un anticorps anti-CD22 radiomarqué dépend de la charge antigénique portée principalement par la rate et la moelle osseuse, le CD22, à l'inverse du CD20, n'étant que faiblement exprimé au niveau des cellules sanguines circulantes. Ils proposent de se baser sur une quantité totale en protéines injectée de 0,75 mg.kg⁻¹ (ce qui correspond à une quantité totale en anticorps de 52,5 mg pour un individu de 70 kg), en co-injectant l'anticorps radiomarqué avec le même anticorps froid. La pré-dose d'anticorps froid n'est pas une modalité qui a été retenue, puisqu'elle semble bloquer l'accès du radiopharmaceutique à un certain nombre de molécules cibles, limitant ainsi l'efficacité d'une RIT anti-CD22. En effet, l'anticorps froid pré-injecté à une concentration saturante conduit à une internalisation rapide de l'antigène et donc à une modification de la densité antigénique des sites tumoraux au moment de l'injection de l'anticorps radiomarqué réalisée en deuxième intention. Ainsi, la pré-dose d'anticorps froid, souvent importante comparativement à la quantité d'anticorps radiomarqué injectée après un certain laps de temps, n'est pas assimilable à la co-injection de l'anticorps froid et de l'anticorps radiomarqué, cette dernière correspondant à une variation de l'activité spécifique.

La troisième étude clinique portant sur la RIT anti-CD22 a concerné la comparaison de l'efficacité anti-tumorale d'une injection de 131I-epratuzumab à celle d'une injection de 90Yepratuzumab (Juweid ME. et al., 1999). La RIT est précédée d'une injection pré-thérapeutique de 222 MBq de ¹³¹I-epratuzumab ou de ¹¹¹In-epratuzumab respectivement, à des fins de dosimétrie. Chacune de ces injections a consisté en l'administration d'une quantité totale en anticorps de 0,75 mg.kg⁻¹. La demi-vie sanguine de l'anticorps radiomarqué ⁹⁰Y-epratuzumab est plus longue que celle du ¹³¹I-epratuzumab probablement du fait d'une stabilité supérieure (processus de déiodination du radiopharmaceutique ¹³¹I-epratuzumab) et les doses déposées aux organes et aux sites tumoraux sont significativement plus élevées lors de la RIT à l'yttrium-90 (Tableau 44). Soulignons également que le pourcentage d'activité injectée par gramme de tumeur augmente de manière plus intense et sur une plus longue période lorsqu'il s'agit de la RIT à l'yttrium-90, en comparaison avec la RIT à l'iode-131. Par ailleurs, cette étude montre qu'il existe une corrélation inversement proportionnelle entre la taille des tumeurs et la dose déposée aux tumeurs avec le radiopharmaceutique 90Y-epratuzumab, notamment pour les masses tumorales dont le diamètre est inférieur à 3 cm. Enfin, les doses déposées aux organes et aux sites tumoraux sont plus favorables à la balance bénéfice/risque de la RIT anti-CD22 avec l'epratuzumab radiomarqué à l'yttrium-90 qu'à l'iode-131.

La quatrième étude clinique de RIT anti-CD22 à l'aide du radiopharmaceutique ⁹⁰Yepratuzumab a reposé sur l'administration par voie intraveineuse d'une quantité totale en anticorps égale à 0,75 mg.kg⁻¹ (Sharkey RM. *et al.*, 2003(a)). Cette étude a porté sur 26 patients et l'étude de dosimétrie effectuée sur les masses tumorales n'a pas pu mettre en évidence de lien entre la taille des masses tumorales, la dose absorbée reçue et la réponse thérapeutique. Les doses déposées aux organes et aux tumeurs sont présentées dans le <u>Tableau 44</u> : les valeurs sont similaires aux doses calculées pour les patients de l'étude de Juweid ME. *et al.*, 1999.

Par la suite, les études cliniques de RIT anti-CD22 menées chez l'Homme se basent sur l'administration d'une quantité totale en anticorps égale à 1,5 mg.kg⁻¹, sans que le rationnel ayant conduit à cette prise de décision ne soit explicite et en l'absence d'études comparatives transparentes portant sur un nombre suffisant de patients.

Un essai clinique de RIT fractionnée combinant l'administration d'un anticorps anti-CD20 appelé veltuzumab à J1, J8, J15 et J22 avec l'injection du radiopharmaceutique ⁹⁰Yepratuzumab à J15 et J22 a comparé la biodistribution de ce dernier en présence et en l'absence de co-injection d'épratuzumab froid (Witzig TE. *et al.*, 2014). Il ressort de cette étude que la coinjection d'epratuzumab froid (dose totale en anticorps de 1,5 mg.kg⁻¹) augmente modestement la demi-vie du radiopharmaceutique (114 ± 11,8 h versus 84,4 ±17,1 h) et diminue modérément la dose déposée à la rate (3,2 ± 3,1 mGy.MBq⁻¹ versus 10,0 ± 5,2 mGy.MBq⁻¹). Cependant, les doses déposées dans les autres organes sont comparables, quelle que soit la quantité d'anticorps anti-CD22 administrée. Les doses absorbées calculées pour les organes d'intérêt sont présentées dans le <u>Tableau 44</u>, qui regroupe également les calculs effectués pour un second essai clinique de RIT fractionnée proposé à des patients atteints de leucémie lymphoblastique aiguë (dose totale en anticorps de 1,5 mg.kg⁻¹) (Chevalier P. *et al.*, 2015).

Etude clinique sur patients atteints de lymphome				Dose en mGy/MBq					
Auteurs	Radiopharmaceutique	Activité spécifique	Corps entier	мон	Foie	Rate	Poumons	Reins	Tumeur
Goldenberg DM. <i>et al.</i> , 1991	¹³¹ I-LL2 (murin) : 0,2 à 3,9 mg	$503,9 \pm 43,9 \text{ MBq.mg}^{-1}$ (411,1 à 570,4 MBq.mg ⁻¹)	0,16	0,51	0,35	1,29 (normale), 1,22 (splénomégalie)	0,35	0,76	1,24
Investid ME at	¹³¹ I-LL2 (murin) : 2 mg	444 à 592 MBq.mg ⁻¹	0,22	0,95	0,81	-	0,85	1,16	1,62
al., 1995	¹³¹ I-epratuzumab (humanisé) : 2 mg	$148 a 277,5 MBq.mg^{-1}$	0,27	0,89	0,54	3,21	0,84	0,81	-
Iuweid ME <i>et</i>	¹³¹ I-epratuzumab (humanisé) : 0,75 mg.kg ⁻¹	10 à 50 MBq.mg ⁻¹ (approximation*)	-	0,65	0,84	3,11	0,89	0,78	< 3 cm : 1,11 ; > 3 cm : 0,65
al., 1999	⁹⁰ Y-epratuzumab (humanisé) : 0,75 mg.kg ⁻¹	< 15 MBq.mg ⁻¹ (approximation*)	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	2,57	2,57	< 3 cm : 19,30 ; > 3 cm : 5,81			
Sharkey RM. <i>et</i> al., 2003	⁹⁰ Y-epratuzumab (humanisé) : 0,75 mg.kg ⁻¹	< 21 MBq.mg ⁻¹ (moyenne : 11,9)	0,7	1,9	3,8	8	2,1	2,8	11/14 < 15 (médiane : 7,15)
Witzig TE. <i>et al.,</i> 2014	⁹⁰ Y-epratuzumab (humanisé) : 1,5 mg.kg ⁻¹	-	0,7	1	3,6	3,2	3	3,5	-
Chevallier P. <i>et</i> <i>al.</i> , 2015	⁹⁰ Y-epratuzumab (humanisé) : 1,5 mg.kg ⁻¹	-	0,5	1,1	2,8	2,7	2,8	1,8	-

* approximation pour un homme de 70 kg

<u>Tableau 44 :</u> Revue de la littérature des doses absorbées aux organes en mGy.MBq⁻¹ calculées chez l'Homme dans le cadre d'une radioimmunothérapie anti-CD22 : corps entier, moelle osseuse hématopoïétique, foie, rate, poumons, reins et sites tumoraux.

Ainsi, en passant en revue les données de la littérature, il apparaît que la question de la quantité totale en anticorps à injecter reste ouverte.

Press et son équipe ont probablement été l'un des premiers groupes à examiner le ciblage des lymphomes non-hodgkiniens (LNH) en fonction de la dose de protéines, en utilisant un anticorps anti-CD137 radiomarqué à l'iode-131 (Press OW. *et al.*, 1989). Lorsque des essais cliniques ont été menés pour la première fois avec l'anticorps murin anti-CD20 B1, Press et son équipe ont continué à utiliser l'approche consistant à définir une quantité optimale de protéines spécifique pour chaque patient en se basant sur plusieurs techniques d'imagerie pré-thérapeutiques (Press OW. *et al.*, 1993). Kaminski et son équipe ont confirmé l'importance de la quantité d'anticorps injectée pour la qualité du ciblage tumoral en déterminant qu'une pré-dose

de 135 mg de B1 froid chez des patients atteints de LNH améliorait la biodistribution du radioconjugué ¹³¹I-B1 : l'absorption tumorale augmente de 20% chez 2/8 patients (Kaminski MS. et al., 1993). D'autres études ont montré qu'une pré-dose de 475 mg d'anticorps limitait la fixation splénique du radiopharmaceutique tout en augmentant sa demi-vie sanguine (Wahl RL. et al., 1998). Des résultats similaires ont été obtenus en étudiant la biodistribution de l'anticorps anti-CD20 2B8 radiomarqué à l'indium-111 : une pré-dose de 1 à 2,5 mg.kg-1 diminue la fixation splénique, augmente la concentration sanguine du radiopharmaceutique correspondant et diminue son élimination rénale. La conséquence directe de ces observations est une augmentation du nombre de sites tumoraux visualisés ainsi que l'obtention d'un meilleur rapport signal/bruit (Knox SJ. et al., 1996). Enfin, Scheidhauer et son équipe ont rapporté les résultats d'une étude de pharmacocinétique de l'anticorps chimérique anti-CD20 appelé rituximab et radiomarqué à l'iode-131 : la quantité en anticorps injectée se situait entre 20 et 40 mg seulement. La variation considérable de la clairance sanguine parmi les patients suggère qu'une étude de dosimétrie individuelle est requise bien qu'il est incertain, selon les auteurs, qu'une augmentation de la quantité d'anticorps injectée en pré-dose soit justifiée. Cependant, les anticorps froids anti-CD20 comme le rituximab possèdent une activité biologique anti-tumorale, ce qui est en faveur de l'utilisation de la plus forte quantité d'anticorps possible dans un contexte de pré-dose (Scheidhauer K. et al., 2002).

Plus récemment, Muylle et son équipe ont étudié la biodistribution du rituximab radiomarqué au zirconium-89 (anticorps anti-CD20) avec ou sans pré-dose de rituximab non radiomarqué, chez des patients atteints de LNH en rechute (Muylle K. et al., 2015) : 5 patients n'ayant reçu aucun anticorps anti-CD20 depuis au moins 6 mois ont reçu une première injection de 111 MBq de ⁸⁹Zr-rituximab (quantité totale en anticorps : 10 mg) puis une deuxième injection trois semaines plus tard de 111 MBq de ⁸⁹Zr-rituximab précédée d'une pré-dose de 250 mg.m⁻² de rituximab froid (1 à 3 h avant). Après chaque administration de radiopharmaceutique, des prélèvements sanguins ont été réalisés 10 minutes, 1 et 2 h et 1, 3 et 6 jours après l'injection. Des acquisitions TEP/TDM ont également été réalisées 1, 72 et 144 h après l'injection. Chacun des patients a de plus fait l'objet d'une numération des lymphocytes CD20 positifs circulants : 2/5 des patients n'étaient pas déplétés en lymphocytes circulants positifs pour le CD20 tandis que les trois autres ont été considérés comme déplétés en lymphocytes circulants positifs pour le CD20. L'étude de la pharmacocinétique sanguine a montré que la clairance sanguine est diminuée pour tous les patients lorsqu'une dose de charge (ou prédose) est administrée (demivie égale à 2,4 à 3,7 jours versus 0,1 à 2,5 jours sans dose de charge), et que, en l'absence de prédose, la clairance sanguine des patients déplétés en lymphocytes CD20 positifs est diminuée par rapport à celle des patients non déplétés (demi-vie égale à 0,1 et 1 jour versus 2,5, 2,5 et 1,7 jours respectivement). L'étude de dosimétrie montre également une différence dans le calcul de la dose absorbée reçue par la rate : aucune différence significative n'est mise en évidence en présence ou en l'absence de dose de charge pour les patients déplétés en lymphocytes B, alors que la dose reçue par la rate des patients non déplétés en lymphocytes CD20 positifs est près de 15 fois supérieure en l'absence de dose de charge. Cette observation est également valable pour la dose calculée pour la moelle osseuse hématopoïétique, dans une moindre mesure. De plus, les auteurs montrent que la visualisation des sites tumoraux sur les acquisitions TEP/TDM est meilleure en l'absence de dose de charge pour les patients déplétés en lymphocytes CD20 positifs, tandis que c'est l'inverse pour certaines lésions tumorales des patients non déplétés, notamment pour les lésions profondes (œsophage, estomac).

Ainsi, la charge antigénique semble être un paramètre incontournable à prendre en compte dans la détermination de la dose d'anticorps devant être administrée : l'efficacité de la RIT, dans le cas du ciblage CD20, et probablement du ciblage CD22, devrait pouvoir être améliorée en tenant compte de paramètres individuels objectivés à l'aide d'une imagerie phénotypique pré-thérapeutique du fait de l'hétérogénéité de la distribution des radiopharmaceutiques d'un patient à un autre, mais également d'une lésion à l'autre, et de la charge tumorale.

Ces résultats éclairent alors sous un autre angle les résultats présentés par Knox et son équipe, abordés précédemment (Knox SJ. et al., 1996). Dans cette étude, des patients atteints de LNH sont traités par RIT anti-CD20 à l'aide de deux anticorps radiomarqué à l'yttrium-90, dont l'ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN®). Une imagerie pré-thérapeutique est réalisée au préalable avec une dose de charge de 1 ou 2,5 mg.kg⁻¹ d'anticorps froid, ou encore en l'absence de prédose. A l'époque de cette étude clinique, le rituximab ne faisait pas encore partie de l'arsenal thérapeutique en routine clinique. Les patients inclus dans cette étude peuvent donc être considérés comme étant non déplétés en lymphocytes CD20 positifs, ce qui est concordant avec les résultats obtenus : seuls 18% des sites tumoraux sont visualisables en l'absence de dose de charge, 56% le sont avec une prédose de 1 mg.kg⁻¹ contre 92% avec une prédose de 2,5 mg.kg⁻¹. De plus, la dose déposée à la rate est divisée par trois lors de l'administration d'une prédose de 1 mg/kg⁻¹ en comparaison avec l'absence de dose de charge, tandis que la dose aux sites tumoraux extra-spléniques est multipliée par 2,4. Enfin, les imageries phénotypiques du patient n°9 portées à notre connaissance, réalisée avant la première RIT et avant la seconde RIT, soulève la question de la captation massive du radiopharmaceutique en situation de splénomégalie. En effet, les sites tumoraux envahis n'étaient pas visualisables avant la première RIT alors que la rate avait un volume anormalement augmenté (prédose de 1 mg. kg⁻¹). Ce n'est plus le cas avant la seconde RIT, la rate ayant retrouvé une taille normale malgré la progression de la maladie. Ces résultats semblent donc confirmer que la charge antigénique joue bien un rôle majeur dans la biodistribution du radiopharmaceutique étudié.

Dans les résultats que nous avons présentés, le ciblage tumoral à l'aide de l'anticorps anti-CD22 10C6 a été validé chez deux chiens spontanément malades, l'un avec une co-injection d'anticorps froid (AMI.NIC) et l'autre en l'absence de co-injection (FAX.FRE). Les données obtenues chez ces deux animaux sont peu comparables en raison de la qualité du radiopharmaceutique utilisé (immunoréactivité de 52 et 85% respectivement). Notre étude repose donc essentiellement sur les doses déposées aux organes calculées chez des animaux sains, à l'aide de radiopharmaceutiques de qualité comparable, en l'absence (forte activité spécifique) et en présence (faible activité spécifique) d'une co-injection d'anticorps froid (1,5 mg.kg⁻¹, quantité totale en anticorps administrée chez l'Homme). En accord avec les données de la littérature, nous observons que les doses déposées à la rate et à la moelle osseuse hématopoïétique sont plus élevées en l'absence de co-injection. Les animaux malades imagés dans ce travail, et a fortiori les animaux sains, présentent une charge antigénique CD22 non négligeable. Lorsque le radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 est injecté seul par voie intraveineuse, il est très rapidement capté par les sites antigéniques facilement accessibles de la rate et de la moelle osseuse hématopoïétique. Cette fixation massive dans des organes riches en CD22 en l'absence d'envahissement tumoral (chiennes saines) explique la courte demi-vie sanguine du radiopharmaceutique. Ce phénomène est d'autant plus intense lorsque l'animal recevant le radiopharmaceutique est atteint d'un DLBCL de stade clinique V (envahissement splénique et médullaire), comme c'est le cas de la chienne FAX.FRE.

Afin de réduire l'exposition des organes sensibles comme la moelle osseuse hématopoïétique, il est intéressant de co-injecter de l'anticorps froid de manière concomitante au radiopharmaceutique dans un contexte de RIT anti-CD22 chez des patients atteints de DLBCL. Cette co-injection d'anticorps froid permet d'augmenter la demi-vie sanguine du radiopharmaceutique et favorise son accès aux sites tumoraux moins vascularisés et donc moins accessibles au radiopharmaceutique. Toutefois, il faut garder à l'esprit que la quantité optimale d'anticorps froid à injecter n'est pas obligatoirement 1,5 mg.kg-1, et surtout qu'elle peut varier d'un individu à l'autre, ainsi que d'une situation clinique à l'autre chez un même patient. Il serait intéressant d'exploiter le modèle spontané canin de DLBCL à notre disposition pour optimiser la détermination de la quantité d'anticorps froid à co-injecter, notamment en exploitant la notion de densité antigénique des sites tumoraux : une imagerie après administration de 99mTc-VASCULOCIS, en supplément de celle réalisée après l'injection de ¹¹¹In-DOTA-10C6, renseignerait à la fois sur le volume sanguin des tumeurs et des organes sains de chaque individu, ainsi que sur les doses déposées aux organes. Il serait ainsi possible de distinguer la part de la dose déposée à un organe apportée par les anticorps circulants, de celle résultant de l'accumulation spécifique ou non spécifique de l'anticorps radiomarqué dans le compartiment extravasculaire de l'organe considéré.

Il serait ainsi possible de savoir si la quantité totale d'anticorps injectée doit être augmentée ou diminuée afin de garantir le meilleur ciblage tumoral, la plus faible toxicité au niveau des organes sains ainsi qu'une consommation optimisée des anticorps anti-CD22.

L'ensemble de ces résultats peut nous aider à répondre, dans le modèle spontané canin de DLBCL, à certaines questions sans réponse à ce jour en médecine humaine.

La première concerne l'évaluation de la charge antigénique non tumorale chez les patients traités et les conséquences de sa variation sur la biodistribution d'un anticorps anti-CD22 radiomarqué. Comme il est fort probable que la totalité des cellules sanguines exprimant le CD22 dans l'espèce canine expriment également le CD20 à la surface de leur membrane, il serait envisageable de provoquer une déplétion en cellules CD22 positives circulantes à l'aide d'un anticorps froid anti-CD20 et de documenter, dans un effectif conséquent d'animaux, les différences de biodistribution du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 selon la charge antigénique à l'échelle de l'organisme entier, à l'image de ce qui se passe chez l'Homme.

Une autre approche thérapeutique pourrait également être explorée dans l'espèce canine : une première RIT anti-CD22 à forte activité spécifique suivie d'une seconde RIT à faible activité spécifique devrait permettre d'irradier à la fois les sites tumoraux facilement accessibles ainsi que ceux dont la densité antigénique est élevée, mais également, dans un second temps, les sites tumoraux dont le ciblage nécessite que le radiopharmaceutique circule plus longtemps dans le compartiment sanguin avant de garantir une dose efficace à ces tumeurs. Aujourd'hui, cette combinaison thérapeutique n'a pas encore été explorée en recherche clinique chez l'Homme.

CONCLUSION GENERALE

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à fournir au modèle spontané canin de DLBCL les outils nécessaires à la conduite d'un essai clinique vétérinaire de radioimmunothérapie anti-CD22, selon les critères de la recherche clinique en médecine humaine. La première partie de notre travail a porté sur le choix de l'anticorps monoclonal murin le plus adapté à une utilisation en médecine nucléaire parmi les sept hybridomes produits dans le laboratoire d'accueil. Ce choix a été motivé par le comportement fortement ou faiblement internalisant des anticorps étudiés, par leur potentiel d'utilisation en immunohistochimie, ainsi que par leur biodistribution et leur capacité de ciblage du CD22 *in vivo* après couplage au DOTA et radiomarquage au cuivre-64 ou à l'indium-111. L'anticorps monoclonal murin 10C6 présente une constante d'affinité, un pouvoir internalisant et un comportement *in vivo* comparables à ceux de l'epratuzumab, l'anticorps humanisé utilisé chez l'Homme dans les protocoles de RIT anti-CD22 : le 10C6 a été sélectionné pour la poursuite de noter travail dans le modèle canin de DLBCL.

Une deuxième partie de notre travail a consisté en l'évaluation de la biodistribution du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 chez des chiens d'expérimentation sains. La sécurité de l'administration de l'anticorps radiomarqué associé à une co-infusion de l'anticorps 10C6 froid (dose totale en protéine de 1,5 mg.kg⁻¹) a été évaluée et l'extrapolation des doses correspondantes dans une situation de RIT avec le radiopharmaceutique 90Y-DOTA-10C6 a permis de conclure à sa faisabilité au regard des doses toxiques décrites chez l'Homme. Il a également été possible de déterminer la durée minimale durant laquelle les animaux recevant l'injection de radiopharmaceutique doivent, pour des raisons de radioprotection des personnes les côtoyant, rester hospitalisés : l'activité détectée dans les urines et les selles des chiens ne dépasse pas la valeur tolérée pour le public 72 h après l'administration par voie intraveineuse de l'anticorps radiomarqué ¹¹¹In-DOTA-10C6. La méthodologie d'exploitation des imageries quantitatives a été validée, permettant de réaliser une étude de dosimétrie à partir des acquisitions TEMP/CT successives en prévision d'une RIT avec le radiopharmaceutique 90Y-DOTA-10C6 : la moelle osseuse hématopoïétique est l'organe identifié comme étant le plus sensible. Ainsi comme chez l'Homme, la toxicité limitante risque d'être hématologique. Enfin, la détermination des volumes sanguins de chaque organe suite à l'injection d'albumine humaine radiomarquée au technetium-99m nous a permis de mettre en relation le comportement in vivo des radiopharmaceutiques avec leur immunoréactivité : lorsque cette dernière baisse, le pourcentage d'activité injectée par kilogramme de foie augmente et l'élimination rénale du radioconjugué est plus importante dans les premières 48 h post-injection.

La troisième partie de notre travail a reposé sur l'étude des conséquences sur la biodistribution de la variation de l'activité spécifique du radiopharmaceutique injecté. L'activité spécifique varie selon que l'anticorps radiomarqué est injecté seul ou associé à une co-injection d'anticorps froid. Nous avons montré qu'en augmentant l'activité spécifique, le pourcentage d'activité injectée par kilogramme d'organe augmente fortement dans la rate et la moelle osseuse hématopoïétique, en l'absence de maladie. Les conséquences dosimétriques, dans un contexte de RIT anti-CD22 à l'yttrium-90, sont les suivantes : augmentation de la dose absorbée reçue par ces deux organes, associée à un risque toxique plus élevé, bien qu'il s'agisse de sites classiquement envahis par le lymphome et pouvant bénéficier d'un tel traitement.

La quatrième partie de notre travail a consisté en la préparation d'un essai clinique vétérinaire à visée préclinique chez des chiens spontanément atteints de DLBCL. Un protocole détaillé a été rédigé selon les critères de la recherche clinique en médecine humaine. Y figurent notamment les critères d'inclusion, les critères de non-inclusion, les critères d'exclusion, le déroulé de l'étude de la consultation d'inclusion à la fin du suivi, les bénéfices attendus et les éventuels effets secondaires pouvant survenir. Des documents spécifiques ont été élaborés à destination des propriétaires des animaux inclus : une lettre d'information, un consentement éclairé et un document stipulant avec précision la nature des soins pris en charge financièrement. Un livret a également été préparé afin d'y consigner en détails tous les soins apportés aux animaux concernés par l'étude : fiche d'inclusion, protocole d'injection des radiopharmaceutiques ¹¹¹In-DOTA-10C6 et ⁹⁰Y-DOTA-10C6, fiches d'hospitalisation en animalerie radioprotégée et formulaires de déclaration des évènements indésirables. En parallèle, la mise en évidence, à l'aide d'une étude de cytométie en flux, de la positivité pour le CD22 de prélèvements biopsiques de nœuds lymphatiques de chien malade a été validée. Une technique d'ELISA sandwich a également été mise au point afin de surveiller l'apparition d'anticorps canins anti-souris chez les animaux recevant une ou plusieurs injections d'anticorps murin 10C6. Enfin, la promotion de cette étude clinique a été réalisée auprès des vétérinaires exerçant dans un rayon de 200 km : envoi de plaquettes informatives destinées au vétérinaire traitant habituel et au propriétaire de l'animal, présentation des objectifs de l'étude et de son déroulé à l'occasion de réunion sur site et relances téléphoniques.

La cinquième et dernière partie de notre travail est le fruit des quatre parties précédentes et concerne l'inclusion dans l'étude clinique de deux chiens spontanément atteints de DLBCL. Ces deux animaux ont reçu une administration intraveineuse du radiopharmaceutique ¹¹¹In-DOTA-10C6 : seul l'un d'entre eux a reçu de manière concomitante une co-injection d'anticorps froid (quantité totale en protéines de 1,5 mg/kg⁻¹). Nous avons ainsi

pu valider le ciblage du CD22 *in vivo* dans deux contextes d'activité spécifique différents. L'étude de biodistribution réalisée chez ces deux animaux a soulevé deux points méritant d'être explorés plus avant :

- il semble possible d'objectiver des infiltrations tumorales à l'aide de l'imagerie quantitative passées inaperçues à l'imagerie conventionnelle et difficilement objectivables visuellement sur les acquisitions TEMP/TDM
- la charge antigénique joue un rôle important dans la détermination de la quantité totale en anticorps devant être administrée en vue d'assurer un ciblage tumoral satisfaisant d'un point de vue thérapeutique dans un contexte de RIT, sans augmenter de manière inconsidérée le risque toxique : l'imagerie quantitative préthérapeutique semble être un bon moyen de mettre en évidence des variations individuelles et de personnaliser les doses d'anticorps froid à co-injecter.

Ce travail sur chiens expérimentaux et atteints de DLBCL reste à compléter et à achever sur un plus grand nombre d'individus. Le recrutement des chiens est en effet un aspect limitant non négligeable de la recheche clinique en médecine nucléaire dans la pratique véterinaire. Néanmoins, ces inconvénients sont en partie compensés par la possibilité d'utiliser des chiens expérimentaux en imagerie qui permettent d'extrapoler les calculs de dose en situation de RIT et de développer une approche expérimentale pertinente : il est possible, chez les chiens expérimentaux, de faire varier des paramètres du traitement appliqué en médecine humaine, comme les quantités d'anticorps injectées, et d'obtenir un corpus de données cohérentes contrairement aux résultats issus des essais cliniques qui restent difficiles à comparer les uns au autres tant les protocoles diffèrent entre eux (nature du vecteur, quantité de radiopharmaceutique injecté, injection unique ou mutiple, pré-dose ou co-injection d'anticorps froids, etc...). Au cours des évaluations dans des essais cliniques de phase I/II des protocoles de RIT, les données générées sont homogènes mais les contraintes imposées de protocole de traitement ne permettent pas de modifier les paramètres d'entrée pour analyser leur influence sur l'efficacité du traitement. Les chiens, comme modèles précliniques pour l'Homme, offrent donc la possibilité d'investiguer de facon rationnelle de nouvelles méthodes de traitement avec un fort potentiel de transfert vers la clinique humaine. Le développement de ces modèles en utilisant des anticorps présentant une réaction croisée homme-chien devrait permettre de mieux valoriser le modèle spontané canin en validant les réactifs pour l'Homme de façon plus pertinente que ce qui est actuellement réalisé à partir de modèles murins xénogéniques.

PERSPECTIVES

Le travail de thèse présenté dans ce document avait pour objectif ultime de proposer la RIT anti-CD22 à des chiens spontanément atteints de DLBCL, afin de faire la preuve de principe qu'une telle prise en charge thérapeutique est envisageable en oncologie vétérinaire et qu'un bénéfice thérapeutique peut être attendu pour l'animal, mais également afin d'adresser des questions d'optimisation des protocoles de RIT anti-CD22 chez l'Homme passant par l'exploitation des imageries quantitatives, notamment pour adapter la quantité totale d'anticorps et l'activité injectées à chaque patient.

Une première chienne atteinte de DLBCL a bénéficié d'une RIT anti-CD22. Une inclusion dans cette étude clinique de médecine nucléaire a été proposée à la propriétaire de cette chienne Berger Allemand de 4,5 ans suite au diagnostic clinique d'échappement au protocole de polychimiothérapie mis en place 9 mois auparavant (protocole COPLA). En effet, la chienne présentait, lors de la consultation d'inclusion, une polyadénomégalie modérée de l'ensemble des nœuds lymphatiques périphériques. A ce moment, les séances de chimiothérapie étaient espacées de trois semaines et une réponse partielle était observée dans les deux premières semaines avant que les ganglions n'augmentent de taille au cour de la dernière semaine.

Après une étape d'imagerie phénotypique n'ayant pas révélé d'infiltration de la moelle osseuse hématopoïétique, cette chienne a été traitée au premier palier de dose décrit dans le protocole, soit 185 MBq.m⁻² : 205 MBq du radiopharmaceutique ⁹⁰Y-DOTA-10C6 ont été injectés pour une masse totale en anticorps de 42 mg (quantité totale en protéines de 1 mg.kg⁻¹). La dose absorbée reçue par la moelle osseuse hématopoïétique a été estimée au préalable à 1 Gy (injection de 71,2 MBq de ¹¹¹In-DOTA-10C6 et de 42 mg d'anticorps au total : activité spécifique de 1,7 MBq.mg⁻¹).

La RIT a été réalisée quatre semaines après la dernière séance de chimiothérapie. La corticothérapie a été arrêtée à 24 h post-RIT. Le suivi clinique, associé à des analyses biochimiques et hématologiques, a été réalisé toutes les semaines pendant les deux premiers mois qui ont suivi la RIT. Une thrombopénie modérée a été objectivée à J14 post-RIT : cette toxicité hématologique transitoire était attendue et la numération plaquettaire était de nouveau dans les valeurs usuelles à J28 post-RIT.

Une réponse clinique a été objectivée dès J14 post-RIT avec la diminution de taille de certains groupes de nœuds lymphatiques. Un examen tomodensitométrique a été réalisé à M1 post-RIT : aucun signe d'envahissement tumoral n'a été objectivé et la chienne peut être déclarée en rémission. La chienne est toujours en rémission clinique 3 mois après la RIT anti-CD22, réalisée au premier palier de dose : seuls les nœuds lymphatiques poplités sont palpables et de taille normale.

Nous avons ainsi démontré qu'il est techniquement possible de réaliser une RIT chez des animaux de compagnie spontanément malades et que des essais cliniques vétérinaire à visée préclinique, dont l'objectif est de répondre à des questions non encore résolues en médecine humaine, sont légitimes. **ANNEXES**

<u>Annexe 1 :</u> Synopsis du protocole détaillé de l'essai clinique de médecine nucléaire proposé aux chiens spontanément atteints de DLBCL surexprimant le CD22.

SYNOPSIS – Protocole Immuno-SPECT ¹¹¹In-DOTA-10C6

Titre	Etude préclinique prospective multicentrique de ciblage de l'antigène					
	CD22 canin pour l'imagerie phénotypique (immuno-SPECT) suivie de					
	radiomimmunothérapie (RIT) chez les chiens spontanément atteints de					
	lymphomes B.					
Mots clés	Immuno-SPECT, Radioimmunothérapie, CD22, Lymphome B canin,					
	Indium-111, Yttrium-90					
Investigateurs	Dr Catherine IBISCH, AMaROC, Oniris, Nantes					
Principaux	Dr Patrick DEVAUCHELLE, MICEN VET, Creteil					
coordonnateur	Dr Floriane ETIENNE, AMaROC, Oniris, Nantes					
Centres	CHUV d'Oniris, Nantes					
	MICEN VET, Créteil					
Planning de	Durée de l'étude : 2017-2021					
l'étude	Periode de recrutement : 2017-2019					
	Duree du traitement : 4 semaines					
Tuno do l'ótudo	Feriode de suivi des animaux inclus : jusqu'à la progression du la recliute					
Type de l'étude	rétrospective)					
Objectif principal	• Déterminer la dose maximale tolérée (DMT) de 90Y-DOTA-10C6					
Objectifs	Etudier la pharmacocinétique la biodistribution et la dosimétrie					
secondaires	de l'anticorns 1006 radiomarqué en utilisant la					
becondumes	nharmacocinétique sanguine et la dosimétrie quantitative corns					
	entier					
	• Evaluer la biodistribution de ¹¹¹ In-DOTA-10C6 en utilisant une					
	imagerie SPECT					
	• Evaluer la toxicité de ⁹⁰ Y-DOTA-10C6					
	• Evaluer la pertinence de l'imagerie immuno-SPECT utilisant le					
	radiopharmaceutique ¹¹¹ In-DOTA-10C6 pour le bilan d'extension					
	des chiens spontanément atteints de lymphome B					
	• Evaluer l'efficacité thérapeutique de la radioimmunothérapie avec 90Y-DOTA-10C6					
Critères	 Lymphome non hodgkinien de phénotype B CD22+ 					
d'inclusion	 Au moins une masse tumorale mesurable 					
	• Stades I à V					
	• Statut de 0 – 2 dans l'échelle de Karnofsky modifiée pour les					
	chiens					
	Créatininémie < 12 mg/mL					
	 Protéinémie > 55 g/L et albuminémie > 25 g/L 					
	• Bilirubinémie < 2 mg/L, ALAT < 160 UI/L et PAL < 600 UI/L					
	• Leucocytes > $3.000 / \mu L$ et granulocytes neutrophiles > $1.500 / \mu L$					
	 Plaquettes > 100.000 /µL Company to the information of the property of the information of the informa					
Critànas	Consentement eclaire signe par le proprietaire					
d'exclusion	Lymphome a immunophenotype 1					
u exclusion	 Lymphome CD22 negatil Absonce de ciblage à l'imagerie immune SDECT 					
	Ausenice de cibilage à l'inflager le liffillullo-SPECT Attainta máningáa ou cárábrala					
	Attentie mennigee ou cerebrate Envahissement médullaire					
	 Bivallissement incutiane Rénonse complète à l'injection de L-acharaginase 					
	Antácádants da radiothárania					

	Défaillance organique non liée au lymphome			
	Contre-indication à la réalisation d'une anesthésie générale			
	Femelle gestante allaitante ou reproductrice active			
	Darticipation dans la même temps à une étude incluent un			
	• Participation dans le meme temps à une étude incluant un			
	traitement en cours d'investigation			
	Problème psychologique, social, familial ou géographique laissant			
	craindre que le propriétaire ne suivra pas les consignes de			
	traitement de son animal ni la surveillance protocolaire			
	Consentement éclairé non signé			
Examens à	Examens nécessaires à l'inclusion :			
programmer	• Tout examen nécessaire pour caractériser le lymphome du chien			
	(biopsie chirurgicale ou au pistolet à biopsie pour cytométrie de			
	flux et pour phénotypage)			
	• Examen clinique : évaluation des masses ganglionnaires			
	périphériques, évaluation de l'état général			
	• Analyse d'urine (bandelette, examen cytologique du culot,			
	électrophorèse des protéines si protéinurie)			
	Radiographies thoraciques (3 incidences)			
	Fchographie abdominale			
	Macura da pracsion artárialla			
	Mesure de pression ai terrene			
	• Numeration formule et frottis sanguin, numeration plaquettaire			
	Creatininemie, uremie, kaliemie, phosphatemie			
	PAL, ALAT, protéinémie, albuminémie, bilirubinémie			
	Calcémie			
	Myélogramme pour les stades III et IV et lors d'anoma			
	hématologique en faveur d'un envahissement tumoral de la			
	moelle osseuse (à réaliser le jour de l'immuno-SPECT au plus			
	tard)			
	• Examen tomodensitométrique corps entier (au plus tard le jour de			
	la SPECT)			
	Echocardiographie si anomalie à l'auscultation			
	Tout examen jugé nécessaire pour évaluer l'état de santé de			
	l'animal			
	Bilan à réaliser avant chaque injection d'anticorps radiomarqué :			
	Numération formule sanguine			
	Frottis sanguin			
	Numération plaquettaire			
Traitamonto	Numeration plaquettane			
Traitements				
	• Corticotherapie			
	Chimiotherapie avant recidive ou progression			
	m ·· · · 1 11/2 1			
	Traitement de l'étude :			
	Lette etude est une etude de radioimmunotherapie (RIT) qui utilise un			
	anticorps (10C6) reconnaissant l'antigène CD22 exprimé par une majorité			
	de lymphomes B canins, chez des chiens naïfs de tout traitement (bras 1)			
	et chez des chiens en rechute (bras 2).			
	• La phase d'imagerie pré-thérapeutique est précédée d'une			
	injection intramusculaire de L-asparaginase à 400 UI/kg (S1)			
	associée à une corticothérapie à 1 mg/kg <i>per os</i> .			
	• Phase d'imagerie pré-thérapeutique (S2) injection de ¹¹¹ In-			
	DOTA-10C6 radiomarqué et injection concomitante de l'anticorps			

	complet froid, pour une quantité totale de 1,5 mg/kg d'anticorps. La fraction d'anticorps chaud représente au maximum 1,5 mg, pour une activité injectée de 3,7 MBq/kg.
	 Phase thérapeutique (S4): injection de ⁹⁰Y-DOTA-10C6 radiomarqué et injection concomitante de l'anticorps complet froid pour une quantité totale de 1,5 mg/kg d'anticorps. La fraction d'anticorps chaud représente au maximum 1,5 mg, pour une activité injectée croissante (paliers prévus, donnés par m²: 5 mCi – 185 MBq, 7,5 mCi – 277,5 MBq, 10 mCi – 370 MBq, 12,5 mCi – 462,5 MBq et 15 mCi – 555 MBq).
Critères	Evaluation du critère principal :
d'évaluation	 La sécurité et la tolérance seront évaluées sur la base de l'analyse des évènements indésirables, des analyses standard de laboratoire (numération et formule sanguine, numération plaquettaire, biochimie sanguine et urinaire), des examens cliniques et des signes vitaux. La gravité des évènements indésirables et des anomalies biologiques sera classée selon les critères VCOG-CTCAE version 1.1.
	Evaluation des critères secondaires :
	 Pour l'évaluation de la biodistribution et de la dosimétrie aux organes, des images quantitatives scintigraphiques (SPECT) corps entier seront réalisées. La pharmacocinétique sera évaluée à partir de prélèvements sanguins par comptages. Les résultats seront caractérisés par des paramètres standards de pharmacocinétique incluant les pics, les valeurs résiduelles, l'aire sous la courbe, la concentration maximum (C_{max}) et si possible la demi-vie (T_{1/2}) du radiopharmaceutique. L'évaluation de la pertinence de l'immuno-SPECT avec l'anticorps anti-CD22 marqué à l'indium-111 (¹¹¹In-DOTA-10C6) sera effectuée par la détermination de sa sensibilité. Le gold standard sera les résultats des méthodes d'imagerie et de biologie standard utilisées pour le bilan d'extension (échographie abdominale, radiographies thoraciques, examen tomodensitométrique, myélogramme, imagerie par résonnance magnétique). La réponse tumorale (réponse complète, réponse partielle, stabilisation de la maladie, progression de la maladie) sera évaluée selon les critères cRECIST 1.0. La survie sans progression et la survie globale seront analysées.
Suivi	Surveillance post-thérapeutique pendant les deux premiers mois :
	 Bilan clinique à J3 (jour de la fin d'hospitalisation), J7, S3, S4, S5, S6, S7, S8 Numération et formule sanguine toutes les semaines pendant 8 semaines ou jusqu'à obtention de plaquettes > 100.000/µL, hémoglobine > 10 g/dL, et leucocytes > 2.000/ µL Examen tomodensitométrique à S4 Tout examen jugé nécessaire pour évaluer l'état de santé de l'animal Surveillance post-thérapeutique à partir de 3 mois : Examen clinique et analyse d'urine tous les mois
	Radiographies thoraciques et échographie abdominale tous les 3 mois

	 Examen tomodensitométrique à M3; puis tous les 3 mois seulement si présence d'anomalie radiographique ou échographique Bilan biochimique (sanguin et urinaire) et hématologique tous les 3 mois Tout examen jugé nécessaire pour évaluer l'état de santé de l'animal
Considérations statistiques	Il s'agit d'une étude d'escalade de dose.
Calendrier	Début de l'essai en novembre 2017 – Fin des inclusions en novembre 2019

<u>Annexe 2 :</u> Lettre d'information au propriétaire (étude clinique de médecine nucléaire proposé aux chiens spontanément atteints de DLBCL surexprimant le CD22).

------ « Protocole Immuno-SPECT et RIT anti-CD22 des lymphomes B canins » -------

LETTRE D'INFORMATION AU PROPRIETAIRE

Etude préclinique prospective multicentrique de ciblage de l'antigène CD22 canin pour l'imagerie phénotypique (immuno-SPECT) suivie de radioimmunothérapie (RIT) chez les chiens spontanément atteints de lymphome B.

<mark>Version 14 du 10/04/2019</mark>

Merci de compléter et d'envoyer ce formulaire par mail dans les 24 heures à l'investigateur coordonnateur : **contact.essai-lymphome@oniris-nantes.fr**

Cadre réservé à l'investigateur coordonnateur	Date de réception :
---	---------------------

Madame, Monsieur,

Votre chien est atteint d'une maladie appelée lymphome de type B. Ce cancer est caractérisé par la prolifération de cellules malignes dans les ganglions, mais aussi la rate, le foie, et parfois la moelle osseuse.

Il est possible que les cellules malignes du cancer de votre chien expriment une molécule à leur surface appelée antigène cCD22. Si cette hypothèse est vérifiée, nous vous proposons de tester un traitement qui est un anticorps (ou encore protéine) anti-cCD22, capable de se fixer sur l'antigène cCD22 à la surface des cellules tumorales. Cet anticorps, couplé à différents éléments radioactifs, permet d'une part de réaliser une nouvelle méthode d'imagerie pouvant compléter le bilan d'extension, d'autre part de détruire les cellules tumorales.

COMMENT VOUS DECIDER ?

Le vétérinaire qui vous a proposé l'étude vous a donné des explications. Elles sont résumées dans ce document intitulé « LETTRE D'INFORMATION AU PROPRIETAIRE ». Nous vous invitons à le lire attentivement avant de vous décider : vous disposez d'un délai de réflexion de plusieurs jours avant de donner votre réponse.

Si vous décidez de faire participer votre animal à cette recherche, il vous sera demandé de signer une attestation de consentement, qui sera également signée par le vétérinaire qui vous a proposé l'étude. Cette signature confirmera que vous êtes d'accord pour que votre animal participe à la recherche.

Même après avoir signé pour donner votre accord de participation, vous garderez le droit d'interrompre à tout moment la participation de votre animal sans avoir à vous justifier.

QUEL EST LE BUT DE CETTE RECHERCHE ?

Le degré d'extension d'un lymphome est une donnée clinique primordiale pour établir le pronostic, c'est-à-dire le devenir du chien malade, et suivre l'efficacité du traitement. A l'heure actuelle, ce degré d'extension du lymphome chez le chien est évalué par un « bilan d'extension »

« Protocole Immuno-SPECT et RIT anti-CD22 des lymphomes B canins »

qui repose sur des données cliniques, sanguines, radiographiques, échographiques et histologiques. Chez l'Homme en revanche, un type d'imagerie particulier appelé « imagerie phénotypique » à l'aide d'anticorps ciblant les cellules tumorales, est un outil majeur du bilan d'extension de certains protocoles de recherche clinique. Le protocole de recherche dans lequel votre chien va participer vise à développer cette méthode d'imagerie phénotypique pour les chiens atteints de lymphome de type B.

L'étude dans laquelle nous vous proposons d'inclure votre chien devrait également permettre, lors de cette étape d'imagerie, d'évaluer le risque toxique de l'étape thérapeutique détaillée ci-dessous. Les calculs alors réalisés correspondent à ce que l'on appelle une étude de dosimétrie.

En effet, les anticorps utilisés pour cette imagerie phénotypique sont les mêmes que ceux utilisés pour une forme de traitement innovant des lymphomes chez l'Homme, traitement appelé « radioimmunothérapie ». Cette approche thérapeutique permet de détruire les cellules tumorales par irradiation en utilisant le même anticorps que celui utilisé pour le bilan d'extension, mais associé à une molécule radioactive toxique pour les cellules. Cette approche thérapeutique sera proposée à votre animal s'il remplit tous les critères d'inclusion ainsi qu'il vous l'a été expliqué (certains des critères d'inclusion seront vérifiés lors de la phase d'imagerie phénotypique).

Enfin, les avancées obtenues chez le chien pourraient permettre d'améliorer les protocoles d'imagerie phénotypique et de radioimmunothérapie chez l'homme atteint de lymphome B.

Au cours de la première étape de cette étude, nous souhaitons tester l'anticorps anticCD22 couplé à un produit radioactif appelé indium-111 afin de réaliser une imagerie phénotypique (immuno-SPECT). L'imagerie immuno-SPECT est une méthode d'imagerie diagnostique se basant sur le principe de la scintigraphie : elle permet la réalisation du bilan d'extension du lymphome à l'échelle de l'organisme entier, sans geste invasif. L'élément radioactif fixé sur l'anticorps anti-cCD22 injecté dans l'animal envoie des rayonnements gamma détectés par une caméra SPECT. Au final, nous localisons sur l'image les anticorps dirigés contre le cCD22 et pouvons en déduire quels sont les organes envahis par le lymphome. Cette technique d'imagerie est en phase de développement en médecine humaine, mais n'est pas encore utilisée chez l'animal, notamment pour des raisons de coût et d'équipement.

Au cours de la deuxième étape de cette étude, si les résultats de l'imagerie phénotypique sont favorables, votre animal recevra une dose de radioactivité thérapeutique. Tous les animaux inclus ne seront pas traités avec la même quantité de radioactivité : les premiers recevront une faible dose de radioactivité alors que les derniers en recevront une plus élevée. Les risques d'effets secondaires seront plus élevés pour les doses les plus fortes. Cependant, toutes les doses se situent dans un ordre de grandeur que nous pensons efficace et tolérable. Nous pensons que l'éventuelle toxicité devrait être contrôlable médicalement et nous la suivrons pour mieux la déceler et la prendre en charge.

Quinze à trente animaux seront inclus dans cette étude qui est mise en place dans deux établissements en France (étude multicentrique).

Les critères d'inclusion et d'exclusion du protocole :

Tous les chiens présentant un lymphome B exprimant la protéine cCD22 et qui ne sont pas en rémission complète, avec un bon état général et des fonctions rénale, hépatique et cardiaque correctes, peuvent participer à cette étude. « Protocole Immuno-SPECT et RIT anti-CD22 des lymphomes B canins »

Les animaux ne présentant pas les critères ci-dessus, ou présentant un lymphome de type T, ou étant en rémission clinique complète, ou participant déjà à un autre protocole, ne pourront pas être inclus dans ce protocole.

A l'issue de l'étape 1, les animaux qui présenteront une atteinte méningée, cérébrale ou médullaire seront également exclus de l'étude.

Il vous sera accordé un délai de réflexion n'excédant pas 15 jours pour décider si votre animal participera au protocole.

QU'ARRIVERA-T-IL PENDANT LA RECHERCHE ? QU'AUREZ-VOUS A FAIRE ?

Les étapes décrites ci-dessous interviennent après que votre animal ait reçu une injection de L-asparaginase par voie intramusculaire. Ce médicament est utilisé en médecine vétérinaire pour réduire les masses tumorales des chiens atteints de lymphome et qui commencent une chimiothérapie.

Cette injection doit intervenir au maximum une semaine avant le début de la recherche. Elle doit permettre de soulager votre animal qui peut être gêné mécaniquement par ses masses tumorales. Elle devrait également permettre d'optimiser la phase thérapeutique décrite dans l'étape 2.

La première étape

L'étape d'imagerie/dosimétrie permet d'une part de confirmer que les tumeurs de votre chien captent la radioactivité et d'autre part de calculer la dose de radioactivité que les tumeurs devraient recevoir lors de la deuxième étape. Dans un premier temps, votre animal recevra une première injection intraveineuse de l'anticorps 10C6 qui a la propriété de reconnaître le cCD22 à la surface des cellules tumorales. L'anticorps sera marqué avec de l'indium-111, molécule radioactive servant à l'acquisition des images scintigraphiques (la scintigraphie dure en moyenne 40 minutes). Quatre scintigraphies seront réalisées : l'une immédiatement après l'injection de l'anticorps et les autres à J1 ou J2, J3, et enfin J6 ou J7 post-injection.

Votre animal sera anesthésié pendant toute la durée de l'injection de l'anticorps et pour la réalisation des images scintigraphiques, afin d'assurer son immobilité complète.

Cette première étape nécessite une hospitalisation de 4 jours. Des prélèvements sanguins seront réalisés régulièrement pendant au maximum 8 jours pour suivre l'élimination sanguines de l'anticorps.

Le vétérinaire qui vous a proposé de participer à l'étude vous remettra un planning précis des jours auxquels vous devrez déposer et venir chercher votre animal pour procéder à ces examens.

Dans de rares cas, à l'issue de cette première étape, votre animal ne pourra poursuivre cette étude soit parce que ses tumeurs ne fixent pas l'anticorps et donc la radioactivité, soit parce que la scintigraphie révèle une accumulation importante de l'anticorps dans un organe susceptible de présenter une toxicité à l'irradiation par le radiopharmaceutique de la deuxième étape.

La deuxième étape

L'étape thérapeutique est réalisée une seule fois au cours de l'étude et est organisée 2 semaines après la première étape.

Cette étape consiste à injecter par voie intraveineuse le même anticorps que celui utilisé dans la première étape, mais associé à une autre molécule radioactive qui permet de détruire les cellules tumorales, l'yttrium-90.

« Protocole Immuno-SPECT et RIT anti-CD22 des lymphomes B canins »

Cette deuxième étape nécessite également une hospitalisation de 4 jours. Des prélèvements sanguins seront réalisés régulièrement pendant au maximum 8 jours pour suivre l'élimination sanguine de l'anticorps.

Le vétérinaire qui vous a proposé de participer à l'étude vous remettra un planning précis des jours auxquels vous devrez déposer et venir chercher votre animal pour procéder à ces examens.



La durée de l'étude

Suite à cet essai thérapeutique, votre animal bénéficiera d'un suivi jusqu'à la progression de sa maladie et au maximum pendant 3 ans (36 mois). Votre accord pour le faire participer à cette étude demandera de votre part que vous vous engagiez pendant toute la durée de la recherche à vous rendre à toutes les visites prévues dans le protocole :

La visite d'inclusion

Au maximum 4 semaines avant la réalisation de l'imagerie immuno-SPECT, votre animal aura un examen clinique complet, des prélèvements sanguins pour connaître sa numération formule sanguine de base, s'assurer de la bonne fonction rénale et hépatique, une échocardiographie si nécessaire pour s'assurer de la bonne fonction du cœur et une biopsie d'un ganglion atteint de lymphome pour s'assurer de l'expression de la protéine cCD22 par les cellules cancéreuses. Une échographie abdominale, des radiographies thoraciques et un myélogramme seront également réalisés, afin d'établir le stade du lymphome de votre animal.

- S1 : Une injection de L-asparaginase

Cette injection a pour objectif de réduire la taille des masses tumorales de votre animal. Selon le stade d'évolution de la maladie, votre chien pourra être hospitalisé et perfusé pendant 24 à 48 heures pour prévenir un syndrome de lyse tumorale aiguë. Un traitement par corticoïdes par voie orale sera également mis en place.

- S2 : Un séjour de 4 jours pour l'imagerie (injection de l'anticorps et images immuno-SPECT)
- S4: Un séjour de 4 jours pour l'essai thérapeutique (injection de l'anticorps radioactif et surveillance)
- Les visites de suivi

Pour évaluer l'efficacité et l'éventuelle toxicité tardive du traitement, la surveillance régulière indispensable comprendra des examens cliniques et sanguins (une fois par semaine pendant 2 mois puis tous les 3 mois pendant 3 ans après le traitement) avec à certaines de ces visites des examens d'imagerie par scanner, radiographie et échographie.

Cependant, si le vétérinaire qui suit votre animal le juge nécessaire, notamment en cas de toxicité, il pourra augmenter la fréquence de la surveillance.

Au-delà de la période de suivi de 3 ans, nous vous contacterons régulièrement (tous les 6 mois) par téléphone afin de connaître l'état de santé de votre animal.

QUELS SONT LES RISQUES ?

Les effets secondaires attendus :

Les effets secondaires attendus lors des injections de l'anticorps anti-cCD22 peuvent être les suivants : hypotension, bronchospasme, douleur thoracique, abdominale et dorsolombaire, fièvre et frissons, démangeaisons et érythème (rougeur), diarrhée, nausée, réactions allergiques et anaphylactiques. Pour prévenir ces effets, votre animal recevra un traitement anti-allergique adapté avant l'injection de l'anticorps.

De plus, dans les premières semaines après la phase thérapeutique, il existe pour votre animal un risque de diminution du nombre de globules blancs et de plaquettes. Si elle est observée, cette diminution nécessitera une surveillance régulière (examens cliniques et analyses sanguines). Des traitements visant à prévenir les hémorragies et les infections peuvent être mis en place, et le vétérinaire pourra hospitaliser votre animal en cas de besoin. Des risques de toxicité rénale ou hépatique peuvent également être envisagés : ces risques sont directement liés à l'utilisation de produits radioactifs. A long terme, le traitement pourrait induire une dysfonction rénale, une dysplasie de la moelle osseuse, une pneumopathie, une stérilité ou des mutations génétiques.

Consignes de radioprotection

Après les 4 jours d'hospitalisation de votre animal, ce dernier sera une source d'irradiation négligeable pour son entourage ou le personnel soignant.

Il n'y a pas de consigne particulière à suivre. Seul le contact étroit et prolongé avec les jeunes enfants et les femmes enceintes, plus sensibles aux rayonnements ionisants, sera à proscrire pendant une quinzaine de jours. De plus, en cas de salissures pendant les 48 premières heures (urinaires, fécales, vomissements), il vous est conseillé de porter des gants pour nettoyer la surface concernée.

En cas de problème et à tout moment de la recherche, vous devrez contacter le vétérinaire investigateur dont les coordonnées figurent dans le formulaire de consentement éclairé que vous allez signer.

QUELS SONT LES BENEFICES QUE VOUS POUVEZ ESPERER POUR VOTRE ANIMAL ?

Le vétérinaire vous a proposé de faire participer votre animal à cette étude parce qu'il pense que cela peut lui être bénéfique : une diminution ou une stabilisation de ses tumeurs pourraient être observées.

La participation à cette recherche est pour votre animal une alternative aux traitements disponibles qui sont très couteux et qui ne permettent généralement pas d'obtenir la guérison des lymphomes. Cette étude offre la possibilité à l'animal d'accéder à un traitement expérimental dans de bonnes conditions de sécurité.

QUE SE PASSERA-T-IL A LA FIN DE LA RECHERCHE, SI LA RECHERCHE S'ARRETE OU SI VOUS DECIDEZ D'INTERROMPRE LA PARTICIPATION DE VOTRE ANIMAL ?

La recherche peut s'interrompre à tout moment :

- du fait des autorités de santé
- du fait du chargé de coordination : si un élément nouveau survient, le vétérinaireinvestigateur en sera informé et il vous transmettra alors les éléments susceptibles de modifier votre participation

– « Protocole Immuno-SPECT et RIT anti-CD22 des lymphomes B canins » -

- du fait du vétérinaire investigateur, pour des raisons médicales concernant votre chien : il peut décider à tout moment d'arrêter l'administration du produit à l'étude (par exemple à cause d'un effet secondaire ou d'une évolution de l'état de santé de votre animal) et vous en informera
- par vous-même : si vous décidez de faire participer votre animal à cette recherche, il s'agira d'un acte volontaire. Vous pourrez à tout moment décider d'arrêter la participation de votre animal sans pénalité ni préjudice. Dans ce cas, vous devez informer le vétérinaire-investigateur de votre décision.

Quelle que soit la raison de l'interruption, le vétérinaire investigateur vous informera alors des mesures à suivre.

QUELLE EST LA PRISE EN CHARGE FINANCIERE DE LA RECHERCHE ?

Le diagnostic du lymphome étant déjà effectué au démarrage de l'étude, les frais déjà engagés restent à votre charge.

Le traitement habituel du lymphome du chien repose sur de la chimiothérapie. L'injection de L-asparaginase, qui doit être réalisée en complément de l'injection du traitement à l'essai (début du traitement habituel par chimiothérapie du lymphome chez le chien) est prise en charge à 50% par l'essai, les 50% restants étant à votre charge. Une estimation précise des coûts vous sera proposée en supplément de ce document pour cette partie.

Les frais liés à la première et à la deuxième phase de la recherche (imagerie puis thérapie) sont intégralement pris en charge par l'essai (hospitalisation, soins, anesthésies, injection de l'anticorps pour l'image, réalisation des images, injection du traitement, suivi sur place pendant 4 jours, visites hebdomadaires de suivi pendant 2 mois avec analyses diverses).

Les frais liés au suivi de votre animal au-delà de 3 mois après la phase thérapeutique sont pris en charge au-delà de 50 euros par visite.

QUELS SONT VOS DROITS PENDANT LA RECHERCHE ?

Le personnel impliqué dans la recherche est soumis au secret professionnel.

<u>Accès aux données vous concernant et concernant votre animal – Traitement des</u> <u>données</u>

Les données médicales concernant votre animal feront l'objet d'un traitement informatique dans les conditions garantissant leur confidentialité, traitement qui sera effectué dans le respect de l'objectif de cette étude. Conformément à la loi « Informatique et Libertés », vous disposez du droit d'accès et de rectification de toute information vous concernant ou concernant votre animal auprès du vétérinaire investigateur.

Si vous retirez votre animal de l'étude, les données le concernant recueillies avant le retrait seront traitées avec les autres données recueillies dans le cadre de l'étude.

Si vous en donnez votre accord, le vétérinaire habituel de votre animal sera informé de la participation de votre chien à l'étude.

Les résultats de cette étude pourraient faire l'objet de présentations lors de congrès ou de publications ou être utilisés à des fins d'enseignement. Dans tous les cas, votre anonymat et celui de votre animal seront préservés et le secret médical sera respecté.

– « Protocole Immuno-SPECT et RIT anti-CD22 des lymphomes B canins » –

Accès aux résultats de la recherche

Par analogie avec ce qui est fait en médecine humaine et ainsi qu'il l'est prévu dans le Code de la Santé Publique, si vous le souhaitez et à votre demande auprès du vétérinaire investigateur, les résultats globaux de l'étude pourront vous être communiqués lorsqu'ils seront disponibles.

QUEL EST LE CADRE REGLEMENTAIRE ?

Cette étude a été approuvée par un comité d'éthique indépendant, le Comité d'Ethique en Recherche Clinique et Epidémiologique Vétérinaire d'Oniris (CERVO-2016-21-V).

Les centres investigateurs ne seront pas tenus responsables des préjudices corporels ou de toute incapacité que pourrait entrainer l'administration de l'anticorps radiomarqué (en tenant compte des sédations/anesthésies nécessaires), en conformité avec le protocole approuvé de l'étude.

QUEL EST LE DEVENIR DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES PRELEVES AU COURS DE LA RECHERCHE ?

A la fin de la recherche, les échantillons biologiques résultant de la prise en charge de votre animal seront conservés dans une biocollection si vous en êtes d'accord. Ces échantillons pourront être utilisés lors de recherches ultérieures. Un formulaire de consentement (différent de celui portant sur la recherche expliquée dans la présente note) va vous être soumis. Le vétérinaire vous fournira toutes les explications nécessaires et répondra à toutes vos questions.

Si vous êtes d'accord pour que les échantillons biologiques de votre animal soient conservés dans cette biocollection, vous devrez signer le formulaire et vous pouvez toujours vous opposer à leur utilisation à n'importe quel moment.

Vous êtes libre de décider si vous voulez que votre animal participe ou non à cette étude. Vous disposez d'un délai de réflexion n'excédant pas 15 jours. Vous êtes libre de retirer votre animal quand vous le voulez et sans donner de raison. La qualité des soins qui lui seront dispensés ne sera pas affectée si vous décidez de retirer votre animal de l'étude ou de ne pas le faire participer.

PROPRIETAIRE :	VETERINAIRE INVESTIGATEUR
Date :	Date :
Lieu :	Lieu :
Nom – prénom :	Nom – prénom :
Signature :	Signature :

<u>Annexe 3 :</u> Consentement éclairé ((étude clinique de médecine nucléaire proposé aux chiens spontanément atteints de DLBCL surexprimant le CD22).

------ « Protocole Immuno-SPECT et RIT anti-CD22 des lymphomes B canins » ------

DECLARATION DE CONSENTEMENT ECLAIRE

Etude préclinique prospective multicentrique de ciblage de l'antigène CD22 canin pour l'imagerie phénotypique (immuno-SPECT) suivie de radioimmunothérapie (RIT) chez les chiens spontanément atteints de lymphomes B.

Version 7 du 10/04/2019

Merci de compléter et d'envoyer ce formulaire par mail dans les 24 heures à l'investigateur coordonnateur : **contact.essai-lymphome@oniris-nantes.fr**

Cadre réservé à l'investigateur coordonnateur	Date de réception :
---	---------------------

Nom – Prénom du propriétaire : Prénom de l'animal : Identification de l'animal :

Je reconnais avoir reçu et lu le document « LETTRE D'INFORMATION AU PROPRIETAIRE » concernant le protocole sus-cité qui est un protocole de recherche.

Je reconnais avoir été informé par le Docteur , et avoir eu la possibilité de lui poser toutes les questions nécessaires à mon information.

J'accepte de faire participer mon animal dans les conditions décrites par la lettre d'information qui m'a été remise. La décision de faire participer mon animal à cette étude relève de mon libre choix, sans que puisse être exercée aucune pression morale ou physique. Je pourrai à tout moment interrompre la participation de mon animal à cette étude sans que cela ne modifie la qualité des soins qui lui seront apportés. De même, je sais que le vétérinaire investigateur peut à tout moment décider d'arrêter la participation de mon animal à cette étude s'il le juge nécessaire.

Les données recueillies durant cette étude resteront confidentielles. J'accepte toutefois que les résultats de cette étude puissent être publiés à visée médicale et scientifique pourvu que mon identité ne soit pas révélée. Je n'autorise la consultation des données me concernant et concernant mon animal que par les vétérinaires investigateurs et les responsables de cet essai, sans violer la confidentialité et dans les limites autorisées par les lois et régulations. En signant la feuille de consentement, j'autorise un tel accès au dossier médical de mon animal.

J'ai été informé(e) que le CHUV d'Oniris, Nantes et la clinique MicenVet se déchargeaient de tout préjudice ou de toute incapacité que pourrait entrainer l'administration de l'anticorps étudié en conformité avec le protocole approuvé de l'étude, ainsi que les sédations/anesthésies nécessaires.

Je reconnais avoir pu disposer d'un délai de réflexion avant de donner mon accord.

Je sais qu'en cas de besoin et pendant tout le déroulement de cette étude, nous pouvons moimême ou le vétérinaire habituel de mon animal, contacter l'un des vétérinaires responsables du protocole, le Dr au numéro suivant :

Je reconnais avoir reçu un exemplaire du présent document. J'ai également bien pris note que mon consentement ne dégageait en rien les organisateurs de cette recherche et conserve tous mes droits garantis par la loi.

Fait à, le Signature du propriétaire

Signature de l'investigateur

<u>Annexe 4 :</u> Cross-doses calculées pour les organes sains des chiens sains et des chiens malades dans un contexte de RIT anti-CD22 à l'yttrium-90.

	5-facteurs des cross-doses					
	du foie vers	du RD vers	du RG vers	de la rate vers	des poumons vers	
Foie		1,7E-15	2,6E-18	1,7E-18	1,8E-15	
Rein droit	1,7E-15		9,5E-18	3,7E-18	2,6E-18	
Rein gauche	2,6E-18	9,5E-18		1,5E-17	2,1E-18	
Rate	1,6E-18	3,6E-18	1,5E-17		9,7E-19	
Poumons	1,8E-15	2,6E-18	2,1E-18	9.8E-19		

BAC.ALI

	Calcul des cross-doses (mGy.MBq ⁻¹)					
	du foie vers	du RD vers	du RG vers	de la rate vers	des poumons vers	
Foie		9,4E-02	7,2E-05	1,8E-05	1,6E-01	
Rein droit	4,2E-01		2,6E-04	3,9E-05	2,3E-04	
Rein gauche	6,4E-04	5,4E-04		1,6E-04	1,9E-04	
Rate	3,9E-04	2,0E-04	4,0E-04		8,6E-05	
Poumons	4,5E-01	1,5E-04	5,8E-05	1,0€-05		

DOR.ALI

	Calcul des cross-doses (mGy.MBq ⁻¹)					
	du foie vers	du RD vers	du RG vers	de la rate vers	des poumons vers	
Foie		9,9E-02	1,3E-04	1,2E-04	9,6E-02	
Rein droit	1,8E-01		4,6E-04	2,6E-04	1,4E-04	
Rein gauche	2,8E-04	5,7E-04		1,0E-03	1,2E-04	
Rate	1,7E-04	2,1E-04	7,0E-04		5,3E-05	
Poumons	2,0E-01	1,6E-04	1,0E-04	6,9E-05		

NOR.ALI

	Calcul des cross-doses (mGy.MBq ⁻¹)					
	du foie vers	du RD vers	du RG vers	de la rate vers	des poumons vers	
Foie		9,1E-02	8,4E-05	2,5E-05	1,4E-01	
Rein droit	2,4E-01		3,1E-04	5,6E-05	2,1E-04	
Rein gauche	3,6E-04	5,2E-04		2,2E-04	1,7E-04	
Rate	2,2E-04	2,0E-04	4,7E-04		7,9E-05	
Poumons	2,5E-01	1,4E-04	6,9E-05	1,5E-05		

NIA.ALI

	Calcul des cross-doses (mGy.MBq ^{-L})					
	du foie vers	du RD vers	du RG vers	de la rate vers	des poumons vers	
Foie		1,1E-01	1,1E-04	3,0E-05	1,8E-01	
Rein droit	2,7E-01		3,9E-04	6,5E-05	2,7E-04	
Rein gauche	4,1E-04	6,2E-04		2,6E-04	2,1E-04	
Rate	2,5E-04	2,3E-04	5,9E-04		9,9E-05	
Poumons	2.9E-01	1.7E-04	8.6E-05	1.7E-05		

DAI.ALI

	Calcul des cross-doses (mGy.MBg ⁻¹)					
	du foie vers	ers du RD vers	du RG vers	de la rate vers	des pournons vers	
Foie		8,9E-02	8,6E-05	7,0E-05	1,1E-01	
Rein droit	2,46-01		3,1E-04	1,5E-04	1,7E-04	
Rein gauche	3,7E-04	5,1E-04		6,2E-04	1,3E-04	
Rate	2,2E-04	1,9E-04	4,8E-04		6,2E-05	
Poumons	2,68-01	1,4E-04	7,0E-05	4,1E-05		

FAX.FRE

	Calcul des cross-doses (mGy.MBq ⁻⁶)					
	du foie vers	du RD vers	du RG vers	de la rate vers	des pournons vers	
Foie		3,9E-02	8,5E-05	1,0E-04	4,1E-02	
Rein droit	1,2E-01		3,1E-04	2,3E-04	6,2E-05	
Rein gauche	1,96-04	2,2E-04		9,0E-04	4,9E-05	
Rate	1,1E-04	8,5E-05	4,7E-04		2,3E-05	
Poumons	1,36-01	6,2E-05	6,9E-05	6.0E-05		

<u>Annexe 5 :</u> Analyse histopathologique et immunohistochimique réalisée sur le nœud lymphatique mandibulaire retiré chirurgicalement chez le chien AMI.NIC.

	CS 40706 44307 NANTES cedex 3 Téléphone : 02 40 68 76 57 - Télécopie : 02 40 18 00 02
Vétérinaire, Agroatimentaire et de l'Alimentation Dossier :: Reçu le : Vos références Propriétaire : Madame NIC Animal : AMI Chien Cavalier King Charles Mâle Age : 10 Ans. Suivi par : /	Service ONIRIS - Site de la Chantrerie 44307 NANTES
Sous couvert : AMaROC /	
Nature des prélèvements : Noeud	lymphatique.
L'examen histopathologique provenant du chien	a porté sur plusieurs sections de nœud lymphatique mandibulaire Cavalier King Charles âgé de 10 ans.

Les différentes sections présentent un aspect histologique comparable. L'architecture ganglionnaire est considérablement modifiée par le développement marginal devenu diffus d'une tumeur à cellules rondes indépendantes, de très grande densité cellulaire, avec effraction de la capsule ganglionnaire, compression du cortex résiduel et comblement des régions médullaires et des sinus.

La population néoplasique est composée de cellules lymphoïdes monomorphes, associées à de rares petits lymphocytes matures et typiques et un grand nombre de macrophages à corps tingibles conférant à la coupe un aspect « en ciel étoilé ».

Les cellules tumorales sont rondes et disjointes, de 15 à 18 micromètres de diamètre moyen, au noyau volumineux (12 à 15 micromètres de moyenne), rond à ovalaire et vésiculeux, contenant 2 à 4 nucléoles généralement situés sous la membrane nucléaire. Le rapport nucléocytoplasmique est très élevé et le cytoplasme basophile modérément abondant, réparti une couronne périnucléaire.

Les atypies cytonucléaires sont modérées. L'activité proliférative est élevée, supérieure à 5 mitoses par champ au grossissement x400 du microscope. La tumeur est remaniée par hémorragie multifocale modérée.

Par immunohistochimie, le lymphome d'Amidou est très fortement positif pour CD20 (signal membranaire) et Pax5 (signal nucléaire), deux marqueurs pan-B, mais négatif pour CD3 (marqueur pan-T). Environ 80% des cellules lymphomateuses expriment CD22 (clone 10C6), avec une intensité modérée et en localisation membranaire. Environ 90% des cellules expriment très intensément CD138 (signal membranaire, clone 8A1).

CONCLUSION

Lymphome malin ganglionnaire B diffus à grandes cellules de type centroblastique (par transformation d'un lymphome de la zone marginale), groupe des lymphomes malins de haut grade de malignité, positif pour CD20, CD22 (marqueurs B) et CD138 (marqueur de lymphocytes B activés).

<u>Annexe 6</u> : Myélogramme et analyse histopathologique et immunohistochimique réalisée les biopsies de nœud lymphatique préscapulaire chez la chienne FAX.FRE.



CS 40706 44307 NANTES cedex 3 Téléphone : 02 40 68 76 57 - Télécopie : 02 40 18 00 02 Adresse email : sec-lha@oniris-nantes.fr



Dossier :	Reçu le
Vos références /	
Propriétaire : Madame FRE	
Animal : FAX Chien Labrador Femelle Ace : 4 ans 5 mois	

Suivi par :

ONIRIS 44307 NANTES

Nature des prélèvements : Myélogramme(s), Biopsie(s) de noeud(s) lymphatique(s).

MYELOGRAMME :

Nombre de lam	ies obse	rvées : 9			
Qualité Cellularité Mégacaryocyte Fer	2/4 s 1/4	2-3/4 2/4	NE : Non évalu	é	
Nombre de cell	ules nuc	léées comptées	6	300	%
Proérythroblast Erythroblastes Erythroblastes Erythroblastes	es basophil polychro acidophi	les omatophiles iles		4 11 22 41	1,3 3,7 7,3 13,7
Myéloblastes Promyélocytes Myélocytes Métamyélocyte Band cell Granulocytes n Granulocytes é Granulocytes b	s eutrophi osinophi asophile	les iles is		3 11 13 27 69 48 18 0	1,0 3,7 4,3 9,0 23,0 16,0 6,0 0,0
Lymphocytes Plasmocytes Macrophages Mastocytes				10 11 0 0	3,3 3,7 0,0 0,0
Cellules X				12	4,0

M/E = 2,42

Observation du myélogramme :

Prélèvement de très bonne qualité technique révélant une moelle osseuse hématopoïétique hypercellulaire pour un chien âgé et assez pauvre en fer.

Présence d'un contingent de cellules atypiques, de taille moyenne à grande, avec une rapport nucléocytoplasmique élevé. Leur noyau est ovoïde central, avec une chromatine irrégulière et nucléolée. Leur cytoplasme est basophile avec parfois un archoplasme. Leur morphologie rappelle celle des cellules envahissant les ganglions lymphatiques et celle des cellules lymphoïdes atypiques circulantes.

ADENOGRAMME :

Nombre de lames : 3

Observation de l'adénogramme :

Prélèvement richement cellulaire présentant un fond seulement très légèrement hémodilué et présentant de nombreux corps



lymphoglandulaires. Présence de rares petits lymphocytes et cellules inflammatoires (GNN matures non dégénérés, mastocytes) parmi un très large contingent de cellules de taille moyenne à grande, présentant un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Leur noyau est rond irrégulier et excentré, avec une chromatine finement réticulée présentant 1 ou plusieurs nucléoles ovoïdes paracentraux parfois difficiles à distinguer (renforcements chromatiniens seuls). Leur cytoplasme est modérément à fortement basophile, avec ébauche d'archoplasme. Ces cellules présentent des atypies : anisocytose et anisocaryose marquée, volume nucléolaire, basophilie du cytoplasme, figures mitotiques.

Conclusion : Lymphome ganglionnaire de haut grade de malignité.

CONCLUSION GENERALE : Lymphome ganglionnaire de haut grade de malignité avec envahissement médullaire et sanguin.

EXAMEN HISTOLOGIQUE :

L'examen histopathologique a porté sur quatre petites biopsies de nœud lymphatique préscapulaire gauche provenant de la chienne Labrador Retriever âgés de 5 ans.

Trois des biopsies concernent presque exclusivement du tissu conjonctivo-adipeux péri-ganglionnaire ; la quatrième concerne un tissu tumoral à cellules rondes indépendantes, de très grande densité cellulaire, masquant totalement l'architecture ganglionnaire préexistante. Les cellules tumorales sont rondes et disjointes, de 15 à 18 micromètres de diamètre moyen, au noyau volumineux (plus d'une hématie et demi de diamètre en moyenne), rond à ovalaire, contenant 2 à 4 nucléoles. Le rapport nucléocytoplasmique est très élevé et le cytoplasme basophile modérément abondant, réparti une couronne périnucléaire. Les atypies cytonucléaires sont modérées. L'activité proliférative est supérieure à 5 mitoses par champ au grossissement x400 du microscope. La tumeur est remaniée par hémorragie multifocale légère.

Par immunohistochimie, le lymphome de est très fortement positif pour CD20 (signal membranaire), marqueur pan-B, mais négatif pour CD3 (marqueur pan-T). L'index de prolifération Ki-67 est d'environ 70% (très élevé). L'index c-Myc est d'environ 95% avec un signal nucléaire très intense (surexpression de c-Myc). Les cellules lymphomateuses expriment CD22 (clones 10C6, 5A3 et 5F8), avec une forte intensité et en localisation membranaire. Elles expriment également CD138 (signal membranaire, clone 8A1), très intensément.

Conclusion: Lymphome malin ganglionnaire diffus à grandes cellules B de type centroblastique, groupe des lymphomes malins de haut grade de malignité, d'index Ki-67 estimé à 70%, positif pour CD20, CD22 (marqueurs B) et CD138 (marqueur de lymphocytes B activés) et surexprimant c-Myc.
Annexe 7 : Article " SPECT-CT imaging of dog spontaneous diffuse large B-cell lymphoma targeting CD22 for the implementation of a relevant preclinical model for human " soumis dans le journal Frontiers in immunology.



SPECT-CT imaging of dog spontaneous diffuse large B-cell lymphoma targeting CD22 for the implementation of a relevant preclinical model for human

- Floriane Etienne^{1,2a}, Maxime Berthaud^{1a}, Frédérique Nguyen^{1,2}, Karine Bernardeau^{1,3}, Catherine Maurel¹, Caroline Bodet-Milin^{1,4}, Maya Diab¹, Jérôme Abadie^{1,2}, Valérie Gouilleux-1
- 2
- Gruart⁵, Mickaël Bourgeois^{1,6}, Nicolas Chouin^{1,2}, Catherine Ibisch^{1,2}, François Davodeau^{1*} 3
- ¹CRCINA, INSERM, CNRS, Université de Nantes, Université d'Angers, Nantes, France 4
- ²AMaROC, Oniris (Nantes Atlantic College of Veterinary Medicine, Food Science and 5
- Engineering), Nantes, France 6
- 7 ³ P2R "Production de Protéines Recombinantes", CRCINA, SFR-Santé, INSERM, CNRS, UNIV
- 8 Nantes, CHU Nantes, Nantes, France
- 9 ⁴ Nuclear Medicine, University Hospital, Nantes, France
- 10 ⁵ EA7501, GICC, Université de Tours, CHRU de Tours, Tours, France
- ⁶ Groupement d'Intérêt Public ARRONAX cyclotron, Saint-Herblain, France 11
- 12 ^a Both authors contributed equally
- 13 * Correspondence:
- 14 François Davodeau
- 15 francois.davodeau@inserm.fr
- Keywords: comparative oncology₁, dog₂, diffuse large B-cell lymphoma₃, monoclonal antibody₄, 16 17 SPECT-CT imaging₅ CD22₆, internalization₇
- 18 Number of words: 8590
- 19 Number of figures: 7
- 20 Abstract

21 Antibodies directed against CD22 have been used in radioimmunotherapy (RIT) clinical trials to treat 22 patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) with promising results. However, relevant 23 preclinical models are needed to facilitate the evaluation and optimization of new protocols. 24 Spontaneous DLBCL in dogs is a tumor model that may help accelerate the development of new 25 methodologies and therapeutic strategies for RIT targeting CD22. Seven murine monoclonal 26 antibodies specific for canine CD22 were produced by the hybridoma method and characterized. The 27 antibodies' affinity and epitopic maps, their internalization capability and usefulness for diagnosis in 28 immunohistochemistry were determined. Biodistribution and PET imaging on a mouse xenogeneic 29 model of dog DLBCL was used to choose the most promising antibody for our purposes. PET-CT results confirmed biodistribution study observations and allowed tumor localization. The selected 30 31 antibody, 10C6, was successfully used on a dog with spontaneous DLBCL for SPECT-CT imaging in 32 the context of disease staging, validating its efficacy for diagnosis and RIT. This first attempt at 33 phenotypic imaging on dogs paves the way to implementing quantitative imaging methodologies that

would be transposable to humans in a theranostic approach. Taking into account the feedback of existing human radioimmunotherapy clinical trials targeting CD22, animal trials are planned to investigate protocol improvements that are difficult to consider in humans due to ethical concerns.

37 1. INTRODUCTION

38 Radioimmunotherapy (RIT) using an anti-CD20 antibody radiolabeled with yttrium-90 (ibritumomab 39 tiuxetan / Zevalin®) is approved for the treatment of patients with relapsed or refractory follicular 40 lymphoma (FL) or in consolidation after a front-line induction chemotherapy (Casadei et al., 2016; 41 Morschauser et al., 2008; Rizzieri, 2016; Tomblyn, 2012). Other clinical trials in the field of B-cell 42 lymphoma RIT aim at demonstrating the value of RIT in front-line treatment (Kaminski et al., 2001; 43 Scholz et al., 2013), high-dose treatment (Ferrucci et al., 2007; Gopal et al., 2007), and fractionated 44 RIT protocol with humanized monoclonal antibody (MAb) (Illidge et al., 2009; Illidge et al., 2014) 45 or using new monoclonal antibodies (MAbs) specific for lymphoma antigens (Hoelzer, 2011; Juweid, 2002). Recently, antibodies directed against CD22 have been used in RIT clinical trials to treat 46 patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-47 48 ALL) with encouraging results (Chevallier et al., 2015; Kraeber-Bodere et al., 2017). But performing 49 RIT protocols in first-line treatment is ethically difficult to consider in a clinical context because 50 patients should receive the conventional approach. For these reasons, relevant preclinical models are 51 needed to facilitate the evaluation and optimization of new protocols. The relevance of rodent models 52 of lymphoma is limited to the small number of lymphoma cell lines that are able to grow *in vivo*. 53 Indeed, these few cell lines do not represent the large physiopathological diversity of human tumor 54 subtypes and the inter-individual heterogeneity of patients (Macor et al., 2008; Zullo et al., 2012).

55 To improve the relevance of the preclinical approaches, pet dogs with spontaneous lymphomas 56 diagnosed in veterinary practice would be an asset. Most of the B-cell lymphomas diagnosed in dogs 57 are DLBCLs (Zandvliet, 2016). Among NHLs, DLBCLs are more aggressive than FL and new 58 therapeutic approaches are needed for relapsing patients. In humans, phase I/II clinical trials targeting 59 CD22 for DLBCL therapy are promising. Spontaneous DLBCL in dogs is therefore a tumor model 60 that may help to accelerate the development of new methodologies and therapeutic strategies with 61 enhanced probability of success when transferred to the clinic (LeBlanc et al., 2016; Saba et al., 62 2016).

63 Whole-body molecular imaging of dogs with SPECT (single-photon emission computed 64 tomography) or PET (positron emission tomography) using radiolabeled antibody specific for tumor 65 antigens is noninvasive and enables to more accurately evaluate the disease extension at diagnosis 66 before setting conventional treatment of dogs with DLBCL. In a theranostic approach, molecular quantitative imaging enables the calculation of the actual dose deposition to organs within the course 67 68 of RIT performed with the same anti-CD22 antibody. This personalization of treatment requires 69 defining specific methods such as population pharmacokinetics to evaluate the individual 70 pharmacokinetic profiles of the patients treated (Kletting et al., 2015; Maass et al., 2015). Setting up 71 these approaches requires sequential imaging, which is difficult to impose on human patients, but is 72 realistic in the veterinary clinic. Since spontaneous tumor imaging in humans and dogs is performed 73 using the same camera, the transfer from veterinary to human clinical trials will be facilitated. Based 74 on the most promising phase I/II clinical trial of DLBCL RIT targeting CD22 in humans (Kraeber-75 Bodere et al., 2017), it is relevant to perform clinical trials on sick dogs focusing on the rationale of 76 dosing or treatment schedule with the hope of therapeutic benefit compared to conventional palliative 77 chemotherapy. Finally, the less limiting ethical constraint in veterinary medicine and the possibility 78 of proposing clinical trials for dogs assigned to palliative corticosteroid therapy may facilitate the

evaluation of RIT in front-line treatment, while offering the animals and owners the opportunity to benefit from cancer treatment unavailable in the veterinary clinic, but currently in validation for

81 human patients.

To develop the model of spontaneous DLBCL in dogs for molecular imaging and RIT, we isolated seven mouse monoclonal antibodies directed against the canine CD22 (CD22c) antigen. Here we describe the characterization and selection strategy of these antibodies for future molecular imaging and RIT in dogs. A dog with spontaneous DLBCL was subjected to a SPECT-CT imaging with an indium-111-radiolabeled anti-CD22 antibody as part of disease staging in order to obtain the proof of concept of the relevance of this antibody in a veterinary clinical trial.

88 2. MATERIALS AND METHODS

89 **2.1. Cell lines**

90 The Chinese Hamster Ovary dihydrofolate reductase-deficient cell line (CHO DHFR) purchased 91 from ECACC (European Collection of Cell Cultures, ref 94060607) was transfected for stable 92 expression of soluble membranous canine CD22 (CD22c). CHO WT and DHFR⁻ cells were cultured 93 in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) medium (Gibco BRL) containing 10% fetal bovine 94 serum (Gibco BRL, ref 10270106), 1% glutamine (L-glutamine 200 mM; Gibco BRL, ref 25030149), and 1% antibiotic (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 U/mL; Gibco BRL, ref 95 96 15140148), and supplemented with 10 µg/mL of adenosine-deoxyadenosine-thymidine (ADT) 97 (Sigma-Aldrich, ref T-1895). The CLBL-1 cell line is a canine diffuse large B-cell lymphoma cell 98 line kindly supplied by Barbara C. Rütgen (Rütgen et al., 2010). All cell lines were incubated at 37°C 99 in a humidified atmosphere in 5% CO₂.

100 **2.2. Antibodies**

101 The 6H4 MAb, a mouse IgG_1 specific for human beta-2-microglobulin (β 2m) produced and 102 characterized in the laboratory, was used to screen and purify the canine CD22-human β 2m fusion 103 protein (CD22- β 2m) as previously described (Diab et al., 2017).

A mouse anti-GFP monoclonal antibody (GFP Antibody (B-2); Santa Cruz Biotechnology, ref sc9996) was used for Western blots using cell lysates of CD22c-GFP transfected CHO clones to detect
the expression of the fusion protein CD22-β2m.

107 **2.3. Vectors and genes**

108 The pKCR6 vector was used as an expression vector for CHO cell transfection (Matrisian et al., 109 1986). The soluble CD22c fused to human β 2m as well as the entire canine CD22c-GFP coding 110 sequences were synthesized by GeneCust (Dudelange, Luxembourg). These sequences were received 111 in a pBluescript II SK⁺ vector with a *Xho I* and *Xba I* enzyme restriction sites at their 5' end and 3' 112 end, respectively.

113 **2.4.** Production and purification of CD22c-β2m recombinant protein

114The soluble CD22c was produced as a fusion protein consisting of the ectodomain of CD22c (amino115acids 1–683) fused to the human Beta-2-microglobulin (β 2m) without the peptide signal (amino acids11621–119) via a linker of 15 amino acids constituted of three repeated (SerGlyGlyGlyGly)₃ motifs. The

117 coding sequence of the soluble form of CD22c merged to $\beta 2m$ (CD22c- $\beta 2m$) was cloned into the pKCR6 vector and transfected into CHO cells using Lipofectamine[™] LTX Reagent with PLUS[™] 118 119 Reagent (Invitrogen, ref 15338030) according to the supplier's instructions. Cells were then cultured 120 in 96-well plates in ADT-free RMPI medium to select transfected cells. The supernatant of the wells 121 with surviving cells 2–3 weeks post-transfection were tested for the expression of CD22c- β 2m with 122 an ELISA assay. Briefly, the supernatants of growing clones were diluted in PBS and coated on Nunc MaxiSorpTM plates (ThermoFisher Scientific, ref 44-2404-21). Nonspecific sites were blocked with 123 100 μL of PBS-0.5% BSA. The biotinylated anti-β2m antibody 6H4 was added to each well followed 124 125 by 50 µL of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin (R&D Systems, ref DY998) and 126 tetramethylbenzidine (TMB) substrate (R&D Systems, ref DY999). The reaction was stopped with 1 127 M of sulfuric acid (H₂SO₄). Optical density (OD) was measured at 405 and 570 nm by a 128 spectrophotometer (Multiskan EX, Thermo Scientific, Ventana, Finland). The cells from the positive 129 wells were then subcloned by limiting dilution. The supernatant of the clones was screened with the 130 same ELISA assay, in order to select high-expressing CD22c-β2m clones.

131 The transfected CHO cell clone showing the highest production of canine CD22-β2m fusion protein 132 was selected and expanded to produce 1 L of culture supernatant. The recombinant protein was then 133 purified by affinity chromatography using HiTrap NHS-activated HP affinity column (GE 134 Healthcare, ref 17071701) coated with the 6H4 antibody according to the supplier's instructions. 135 Eluted canine CD22- β 2m protein was further purified by size-exclusion chromatography (Superdex 136 200 10:300GL, GE Healthcare) and the fractions containing high CD22- β 2m were pooled, 137 concentrated using an ultrafiltration Amicon Ultra-15 membrane (30K - Millipore). Purified canine 138 CD22-β2m fusion protein was then sterilized by filtration over a 0.22-μm Minisart® Syringe Filter 139 (Sartorius, ref 16534) and stored in PBS at -20°C.

140 **2.5. Gel electrophoresis and Western blotting**

141 The purity of the CD22c- β 2m protein produced was monitored by sodium dodecyl 142 sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with 5 µg of purified CD22c- β 2m and 143 human β 2m (Sigma-Aldrich, ref M4890) used as a control. After electrophoresis on a 12% 144 acrylamide gel under nonreducing conditions in 1x Tris Glycine SDS running buffer, the proteins 145 were stained using Coomassie brilliant blue (National Diagnostics, ref HS-604) and the gel was 146 scanned using a Bio-Rad scanner.

147 The SDS-PAGE gel was then transferred onto pore polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane 148 (Roche, ref 03010040001) in tris-glycine blotting buffer (Bio-Rad, ref 1610771). Nonspecific sites 149 were blocked using a TBS-0.1%-Tween-5% milk buffer, and PVDF membrane was incubated with 150 the primary antibody 6H4 directed against human β 2m for 2 h at room temperature. After washing, 151 the membrane was incubated with a peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody 152 (Jackson ImmunoResearch, ref 115-035-003) (1:1000 dilution) for 90 min. Target proteins were 153 visualized with the Bio-Rad camera after revelation with the 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) substrate.

154 2.6. Production of CHO cells expressing membranous canine CD22 fused to GFP

The full-length CD22c coding sequence (aa 1–848) with a *Xho I* restriction site at the 5' end and a *Bgl II* restriction site at the 3' end was produced by GeneCust laboratories (Luxembourg) and cloned into the pCRTM2.1-TOPO^R plasmid using the TOPOTM TA CloningTM Kit (Invitrogen, ref K456001).

The *Xbo I-Xba I* CD22c coding sequence was then inserted in pEGFP-N3 (Clontech) and digested by

Xho I and *Bgl II* in order to merge the CD22c and EGFP coding sequences. The CD22c-EGFP coding

sequence in pEGFP-N3 and the expression vector pKCR6 were then digested with *Xho I* and *Xba I*.
 The fragments of interest were purified and ligated. The pKCR6/CD22c-EGFP construct was then
 transfected into Chinese hamster ovary (CHO) cells using the LipofectamineTM LTX Reagent with

163 PLUSTM Reagent (Invitrogen, ref 15338030).

164 The transfected cell line was subcloned by limiting dilution and the clones with positive green 165 fluorescence were selected by flow cytometry analysis. Cell lysates from the highest expressing 166 clones were further analyzed with Western blot using an anti-EGFP antibody (B-2). The clones with 167 a positive band at the expected size corresponding to CD22c-EGFP were amplified and used 168 thereafter for hybridoma supernatant screening.

169 **2.7. Mice immunization procedure**

170 Three BALB/c JRj mice obtained from JANVIER laboratories (France) were immunized with the 171 purified canine CD22- β 2m recombinant protein. For each mouse, two immunizations 3 weeks apart 172 were administered intraperitoneally with a constant amount of 50 μ g of CD22c- β 2m protein in PBS. 173 These injections were performed with an equivalent volume of Freund's complete adjuvant (first 174 injection) or incomplete adjuvant (second injection) (Sigma-Aldrich, ref F5881 and F5506) according 175 to the supplier's instructions. One week after the second injection, blood was collected and antibody 176 titers were assessed by flow cytometry analysis on the selected CD22c-EGFP expressing the CHO 177 clone. The best responding mouse was selected and received a last intravenous boost of 50 µg of 178 canine CD22c-62m protein in PBS without adjuvant. Five days later, the mouse was sacrificed by 179 cervical dislocation, the spleen was collected and splenocytes were harvested in RPMI 1640 medium 180 for fusion. All experiments were conducted according to the National Institutes of Health (NIH) 181 guidelines for handling experimental animals.

182 **2.8. Hybridoma cell production**

183 Hybridomas were generated by the fusion of spleen cells from the immunized mouse with murine 184 myeloma cells SP2/0 (ATC, ref PTA-5817) at a 5/1 ratio using 50% polyethylene glycol (PEG 1500) (Roche, ref 10783641001) according to the supplier's instructions. Hybridomas were grown in RMPI 185 186 culture medium containing 20% fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 187 U/mL) and supplemented with interleukin-6 (50 U/mL) and 2% hypoxanthine-aminopterinthymidine (HAT) (ATCC) for the selection of hybridomas. This medium was replaced after 1 week 188 189 with 2% hypoxanthine-thymidine supplemented medium (ATCC). Ten to 15 days after fusion, 190 hybridomas were established in the wells and culture supernatants were screened.

191 **2.9. Hybridoma supernatant screening**

192 The production of CD22c-specific antibodies was determined by flow cytometry analysis using the 193 selected CHO cell clone expressing canine CD22c-EGFP. Hybridoma supernatants diluted in PBS-194 BSA 0.1% (1:1) were incubated with the canine CD22c-EGFP-positive CHO clone for 1 h at 4°C. A 195 phycoerythrin-conjugated anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, ref 115-116-071) was used as 196 a secondary antibody. Data acquisition and analysis were performed in a Becton Dickinson 197 FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) using FlowJo software (FlowJo LLC). The 198 specificity of hybridomas for canine CD22c was confirmed using a similar flow cytometry method 199 on WT CHO cells used as a negative control.

200 **2.10.** Monoclonal antibody (MAb) purification and isotype determination

Selected cloned hybridomas were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% IgG-201 202 depleted fetal bovine serum in a 1-L Erlenmeyer flask (Corning®) with stirring at 80 rpm for 4 days 203 at 37°C and 5% CO₂ in an agitator. Clone supernatant cultures were collected and canine CD22-204 specific antibodies were purified over a HiTrap Protein G HP column (GE Healthcare, ref 29-0485-205 81). Briefly, supernatants from hybridoma cultures were diluted in phosphate buffer (1:1) to adjust 206 the pH to 7. After passage through the column, antibodies were eluted using a glycine-HCl buffer pH 207 2.7 and dialyzed overnight against PBS pH 7.4 using 30,000 MWCO dialysis cassettes (Thermo 208 Scientific). Purified antibodies were filtered through 0.2-µm filters and stored at 4°C and their 209 production yields were determined.

Isotypes and light chains of purified antibodies were characterized using the IsoStripTM Mouse
 Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche, ref 11493027001) according to the kit instructions.

212 **2.11.** Determination of MAb equilibrium dissociation constant (Kd)

The affinity of MAbs was determined by flow cytometry as described above. For each antibody, a series of concentrations from 4.10^{-7} M to 3.10^{-11} M was tested with a constant number of 2×10^{5} of the canine CD22c-EGFP-positive CHO cells. IgG1/K and IgG2b/K antibodies were used as control isotypes. Mean fluorescence intensities (MFI) were plotted against their corresponding antibody concentrations. Antibody dissociation constants were determined by a nonlinear regression using the Prism software package (GraphPad Software Inc.).

219 **2.12.** Epitope mapping

220 Competition tests using the indirect ELISA method were performed to evaluate the number of 221 distinct epitopes recognized by the antibodies produced. For these tests, 1 mg of each antibody was biotinylated using an EZ-LinkTM Sulfo-NHS-Biotinylation Kit (Thermo Scientific, ref 21425) 222 according to the supplier's instructions. Antibody biotinvlation was essential for revelation with 223 224 Streptavidin-HRP. An ELISA plate was coated with 250 ng/well of the anti-β2m antibody (6H4). 225 Nonspecific sites were blocked with PBS-0.5% BSA and 125 ng/well of the CD22c-β2m was added. 226 Each biotinylated antibody was separately incubated at a constant concentration, equal to its Kd, with 227 a 100-fold excess of each of the unlabeled antibodies. Then the wells were washed three times and 228 revelation was finally performed with 50 µL of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated 229 streptavidin, as described above.

For the analysis of the competition between antibodies, the wells containing biotinylated antibody with an excess of a mouse IgG control isotype were considered as controls of the absence of competition. Wells containing the same antibody in biotinylated and unlabeled forms were considered as positive controls of the competition.

234 **2.13.** Internalization

To estimate the internalization of anti-CD22 antibody, the CD22 proteins at the cell surface were quantified using the CLBL-1 cell line. We seeded 1.5×10^5 CLBL-1 cells in two 96-well plates. One plate was kept at 4°C and the other at 37°C. At 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, and 240 min after incubation, each anti-CD22 antibody produced was added to the wells of the plate at 4 and 37°C. Multiple assays were performed with antibody concentrations corresponding to 10-, 5-, 1-, and 0.1fold their own Kd. At the end of the incubation time, the plates were placed on ice, the cells were

washed twice with ice-cold PBS and stained with phycoerythrin goat anti-mouse F(ab)'2 at 4°C for 1 h. After washing in ice-cold PBS BSA 0.1%, cell fluorescence was measured using a FACSCalibur cytometer. For each incubation time, the percentage of internalization was calculated as = ((MFI at 4°C)–(MFI at 37°C))*100/(MFI at 4°C).

To evaluate the percentage of internalization as a function of the antigenic site saturation, the maximum binding of antibodies (Bmax) was evaluated for each antibody at each concentration after 240 min at 4°C at a saturating amount of antibodies using nonlinear regression (one phase exponential association equation, PRISM GraphPad software). The actual percentage of saturated CD22c antigenic sites was also calculated for each antibody concentration 240 min after incubation at 4°C. The corresponding percentage of internalization was then plotted against the percentage of saturation of cell-surface CD22c.

252 **2.14.** Immunohistochemistry

253 Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) 5-µm-thick tissue blocks from dogs were cut for anti-254 CD22 immunohistochemistry (IHC). A normal dog lymph node was used to check immunoreactivity 255 of the canine CD22-specific clones produced. Samples of canine diffuse large B-cell lymphomas 256 consisted of 30 previously diagnosed cases, of which 10 were of the germinal-center phenotype (i.e., 257 positive for CD10, or CD10-negative but positive for BCL6 expression and negative for MUM1), 258 and 20 were of the nongerminal-center phenotype (i.e., negative for CD10 and BCL6, or CD10-259 negative but positive for both BCL6 and MUM1). All histologic slides were freshly cut before IHC 260 analysis. Briefly, sections were dried at 60°C for 2 h, deparaffinized, pretreated at 95°C for 60 min in 261 a basic buffer (CC1, cell conditioning medium-1, pH 8.4; Ventana Medical Systems, ref 950-124) for 262 antigen retrieval, and stained at 37°C for 60 min. The antibody concentrations were 2 μ g/mL for the 263 CD22-specific clone 2D1, 10 µg/mL for the clones 1E3, 5C2, and 5F8, 15 µg/mL for the clones 5A3 264 and 10C6, and 20 µg/mL for the clone 6B7. All dilutions were performed in a commercially available 265 antibody diluent (Ventana Medical Systems, ref 251-018). All IHC protocols were run in a Ventana 266 BenchMark XT immunostainer (Ventana Medical Systems). Antibody incubation was followed by 267 chromogenic detection with the OptiView DAB IHC detection kit (Ventana Medical Systems, ref 268 760-700), counterstaining with 1 drop of hematoxylin-II for 4 min and post-counterstaining with 1 269 drop of Bluing Reagent for 4 min. Subsequently, slides were removed from the immunostainer, 270 washed in water with a drop of dishwashing detergent, and mounted. In each run, a negative control 271 was obtained by replacing the primary antibody with normal mouse serum (Negative Control 272 Monoclonal Ig, 1 µg/mL, Ventana Medical Systems).

273 2.15. Radiolabelling of anti-CD22c MAbs

274

2.15.1. Radiolabeling of anti-CD22c MAbs with iodine-125

Anti-CD22c MAbs were labeled with ¹²⁵I (Perkin Elmer, ref NEZ033001) using the iodogen method, as previously described (Fraker and Speck, 1978). The ¹²⁵I-labeled anti-CD22c MAbs were purified on a PD10 desalting column with sephadex G-25 (GE Healthcare, ref 17085101). Radiolabeling efficiencies, estimated by Instant Thin Layer Chromatography (ITLC), were above 95%.

279 2.15.2. Radiolabeling 10C6 MAb with copper-64 and indium-111

The 10C6 anti-CD22c clone was modified with p-SCN-Bn-DOTA (p-SCN-Bn-DOTA;
Macrocyclics, ref B-205), as previously described (Nikula et al., 1995). In brief, 10C6 MAb was

incubated with 20 equivalents (mole/mole) of p-SCN-Bn-DOTA in borate buffer (0.2 M, pH 8.7) for
1 h at room temperature. The excess p-SCN-Bn-DOTA was removed by several filtration cycles on a
centrifugal filter (Ultracel 30K, Amicon) using sodium acetate (0.2 M, pH 6). 10C6-DOTA was then
radiolabeled with ⁶⁴Cu (ARRONAX cyclotron) by adding 50 MBq ⁶⁴Cu and adjusting the pH to 5.5
with sodium acetate (0.5 M, pH 5). The resulting ⁶⁴Cu-labeled 10C6-DOTA was separated from
unbound ⁶⁴Cu by size-exclusion chromatography using a PD-10 column. Radiochemical purity,
checked by ITLC, was greater than 95%. The specific activity after purification was 216 MBq.mg⁻¹.

The 10C6 Mab was radiolabeled with indium-111 according to the same protocol as that used for radiolabeling with ⁶⁴Cu. Briefly, 1.0 mg 10C6-DOTA was mixed with indium-111 chloride adjusted to pH 5.5 with sodium acetate (0.5 M, pH 5) and incubated. The resulting ¹¹¹In-labeled 10C6-DOTA was separated from unbound ¹¹¹In by size-exclusion chromatography using a PD-10 column. Radiochemical purity, checked by ITLC, was 81%. The specific activity after purification was 128.8 MBq.mg⁻¹.

295 2.16. Xenogeneic mouse model of canine DLBCL

All experiments were conducted according to the National Institutes of Health (NIH) guidelines for
handling experimental animals (ethics committee of Pays de la Loire, CEEA 00143.01 and CEEA
2012.171).

299 **2.16.1.** Mouse tumor model

5.10⁶ CLBL-1 cells (canine B-cell lymphoma cell line) in 0.1 mL PBS were injected in the flank of
 8-week-old NMRI-nu female mice (JANVIER). Biodistribution and PET imaging were carried out
 14 days after tumor cell injection.

303 2.16.2. Biodistribution of ¹²⁵I-anti-CD22c MAbs

Biodistribution was carried out by injecting mice in the tail vein with 6 μ g of ¹²⁵I-anti-CD22c MAbs in 0.1 mL PBS (30 Bq). At each time point, three mice were sacrificed, the organs were collected and weighed, and the amount of radionuclide activity in tissues was measured using a gamma scintillation counter (PerkinElmer). The results are expressed as a percentage of injected activity per gram of tissue.

309 2.16.3. PET-CT imaging and biodistribution of ⁶⁴Cu-10C6 MAb

310 For PET-CT imaging, three mice were injected in the tail vein with 10 MBq of 64 Cu-10C6 (50 µg). 311 Images were acquired 16 h after injection using a microPET-CT scanner (Inveon Siemens Medical 312 Solutions) under anaesthesia (isoflurane-O₂). After imaging, the mice were sacrificed and 313 biodistribution was performed.

314 **2.17. SPECT-CT imaging on a dog with spontaneous DLBCL**

This experiment involved a privately owned dog and was conducted according to WSAVA Global Guidelines (World Small Animal Veterinary Association). The protocol study was validated by the CERVO Ethics Committee (Comité d'Ethique pour la Recherche clinique et épidémiologique Vétérinaire d'Oniris, Nantes, France; CERVO-2016-21-V) and the pet owner's informed consent was collected.

Prior to the initiation of this study, routine evaluation of the health status of the dog diagnosed with lymphoma was conducted, which included physical examination, complete blood count, serum biochemistry profile, urinalysis, thoracic X-ray, abdominal ultrasound and bone marrow aspirate evaluation. Overexpression of CD22 by tumor cells was assessed on a surgically removed lymph node.

325 The dog was premedicated with methylprednisolone (Solumédrol® 20, PFIZER PFE France, 1 mg.kg⁻¹ intravenously) and promethazine (Phénergan® 2.5%, UCB Pharma SA, 0.3 mg.kg⁻¹ 326 subcutaneously). The ¹¹¹In-10C6 was co-injected with naked 10C6 MAb under anesthesia for 30 min 327 328 through an intravenous saline line in a front leg at a total mean dose of 1.5 mg.kg⁻¹. The activity injected was 31.3 MBq and the specific activity in the syringe was 2.6 MBq.mg⁻¹. SPECT-CT was 329 330 performed 2 days later (Optima 640, GE Medical Systems) with a medium-energy general-purpose 331 collimator (MEGP). The acquisition time was 30 s for each of the 60 projections. Energy windows 332 (15% width) were centered on the two major peaks at 172 keV and 247 keV. The reconstruction was 333 done using the Xeleris software and the ordered subset expectation maximization (OSEM) algorithm 334 with two iterations and ten subsets. Images were corrected for attenuation, based on computed 335 tomography (120 keV, 10 mA).

336 **3.** <u>RESULTS</u>

337 **3.1.** Production and purification of canine CD22 immunogen for mice immunization

338 A soluble form of canine CD22 usable for mice immunization and for monoclonal antibody 339 characterization was produced by stable transfection into CHO cells. In its NH2 end this immunogen 340 comprises the canine CD22 extracellular domain merged to the human beta-2-microglobulin with a 341 peptide linker. Human β 2m was chosen because of the availability in the laboratory of a specific anti-342 $h\beta 2m$ monoclonal antibody (6H4) (Diab et al., 2017). This antibody enables the screening by ELISA 343 of transfected cell supernatants for the production of the canine recombinant protein. One clone of 344 transfected CHO cells (named 13E12) showing the strongest signal was amplified. One liter of 345 13E12 supernatant was produced and purified using HiTrap NHS-activated HP affinity column 346 coupled to 6H4 antibody (HiTrap-6H4). The protein obtained after one-step affinity chromatography 347 on HiTrap-6H4 was then purified by size-exclusion chromatography Superdex 200 column (Fig. 1A). 348 The purification fractions were analyzed by Western blot using the 6H4 antibody. The fractions 349 corresponding to the major peak were further analyzed by Western blot. The molecular weight of the 350 highlighted protein corresponds to the CD22- β 2m fusion protein (Fig. 1B). After purification, 2 mg 351 of the fusion protein was obtained at sufficient purity for use as an immunogen. This amount was 352 sufficient for the immunization of several mice and characterization of the MAbs produced.

353 3.2. Production of a CHO clone expressing canine CD22 at the membrane for hybridoma screening

To screen hybridomas producing antibodies specific for canine CD22 using flow cytometry analysis, we produced CHO cells expressing membranous canine CD22. Since no antibodies specific for canine CD22 were available for the screening of transfected cells, the cytoplasmic domain of CD22 was merged with EGFP in order to be able to screen transfectants with flow cytometry. The polyclonal cell line was then cloned by limiting dilution and we selected the clones with the highest green fluorescence intensity, such as clones 5.2C2 and 5G10 (Fig. 1C). Western blot analysis using an anti-EGFP antibody was performed on protein extracts from these clones and compared to CHO

362 cells transfected with EGFP alone. A major band corresponding to the CD22c-EGFP molecular 363 weight was highlighted for the 5G10 and 5.2C2 clones. However, an additional faint band (around 364 75,000 Da) and a strong band at lower molecular weight corresponding to EGFP alone were detected 365 for the clone 5.2C2 (Fig. 1D). The clone 5G10 that displayed the expected profile in Western blot 366 was therefore selected for hybridoma supernatant screening.

367 3.3. Immunization of mice against canine CD22

368 Three mice were immunized with the canine CD22c-β2m fusion protein. The serums of immunized 369 mice were assessed for anti-CD22c antibody production by flow cytometry analysis using the 370 CD22c-EGFP transfected CHO cell clone 5G10. The pre-immune serum at day 0, which was used as 371 negative control, displayed a strong background on transfected CHO cells. However, at day 29 after 372 the second antigen injection, significant labeling was obtained, attesting to the production of anti-373 CD22c by the mice immunized against the CD22c- β 2m immunogen. It also validated the CD22c-374 EGFP transfected CHO cell clone 5G10 for the screening of hybridoma supernatant (Fig. 2A). We 375 further analyzed the serum of immunized mice using the canine diffuse large B-cell lymphoma 376 (DLBCL) cell line CLBL-1. Because of the lack of available anti-CD22c antibody, we were not able 377 to determine the expression level of this antigen on the canine DLBCL cells. Here we show that, as 378 for the 5G10 clone, we detected a specific labeling of the CLBL-1 cell line at day 29 compared with 379 the pre-immune serum (day 0) attesting, as expected, that CD22 is expressed by canine B-cell 380 lymphoma and that the immunization with soluble CD22c- β 2m is efficient at generating the 381 production of antibodies able to bind the CD22c on its native form. Interestingly, the dilutions giving 382 half of the maximum binding on the CD22c-EGFP transfected CHO cells and on CLBL-1 cells were 383 very close (1:1050 and 1:976, respectively, with the best immunized mouse), attesting that the anti-384 CD22 antibodies from the serum of immunized mouse recognized CD22c with the same affinity on 385 both cell lines (Fig. 2A). Even if the signal was specific, it was lower on CLBL-1 cells as compared 386 to the 5G10 CHO clone. This is consistent with the low expression level of membrane CD22 387 described in human DLBCL (Tembhare et al., 2013). At the end of immunization process, the most 388 potent immunized mouse was sacrificed, the spleen was harvested, and the splenocytes were fused 389 with the mouse myeloma cell line SP2/0 in order to obtain hybridomas.

390 3.4. Screening of hybridoma supernatant

391 Ten to 15 days after the fusion of splenocytes, 500 hybridomas were screened to evaluate their 392 efficiency in producing the anti-canine CD22 antibodies. We used the WT CHO cell line as a 393 negative control and the CD22c-EGFP+ 5G10 CHO clone and the CLBL-1 cell line as positive 394 controls. Seven hybridomas out of the 500 tested allowed strong labeling of the CD22c-EGFP+ 5G10 395 CHO clone and no staining on WT CHO cells, as expected for antibodies specific for canine CD22. 396 The ability of the seven hybridoma supernatants to bind the CLBL-1 cell line confirmed this 397 specificity for CD22c (Fig. 2B). We confirmed the low expression level of CD22c on CLBL-1 cells 398 compared to CD22c-EGFP+ 5G10 CHO clone observed with the plasma of immunized mice. 399 Positive hybridomas were then cloned by limiting dilution. Once these clones were established, a 400 pilot production of supernatant was performed to obtain a sufficient amount of MAb by purification 401 with protein G to define their isotypes and affinity for CD22c by flow cytometry analysis. Six of the seven antibodies (5A3, 6B7, 1E3, 10C6, 5C2, 5F8) displayed an IgG_{1,K} isotype and the last, 2D1 402 403 MAb, is an $IgG_{2b,\kappa}$. The dissociation constants (Kd) of the seven MAbs were between 3.88 1E-8 M 404 and 1.21 1E-10 M (Table 1). These affinities are satisfactory for nuclear medicine applications 405 targeting tumor antigen for imaging and therapy.

406 **3.5. Epitope mapping**

407 Apart from its use for mice immunization, the canine CD22-β2m fusion protein was also useful for
408 characterizing the anti-canine CD22 antibodies. This construct was used in a sandwich ELISA assay
409 to define an epitope mapping of the sites recognized on CD22 by the seven antibodies (Fig. 3). For
410 this purpose, each MAb was biotinylated and separately incubated with an excess of the seven anti411 CD22c MAbs and a control isotype. Streptavidin HRP was used to detect antibody binding to CD22
412 in this competition assay regarding CD22 binding.

413 At least three different recognition patterns of CD22- β 2m antibodies could be distinguished. The 414 binding of the biotinylated 5A3 antibody on CD22- β 2m was only inhibited by an excess of cold 5A3 415 MAb, indicating that it recognizes an epitope distinguishable from those recognized by the other 416 MAbs on the CD22c molecule. The 10C6 and 5C2 antibodies recognized a single epitope, as 417 indicated by their mutual binding inhibition. The antibodies 1E3, 5F8, and 6B7 also displayed a 418 common pattern of cross inhibition for the binding on CD22c, indicating their specificity for a single 419 epitope or overlapping epitopes. The 2D1 antibody displayed a more complex competition pattern: its 420 binding was partially inhibited by 1E3, 5F8, and 6B7 antibodies, but 2D1 failed to impair 1E3, 5F8, 421 and 6B7 binding to their own epitope. This could be consistent with a steric hindrance or in a non-422 mutually exclusive way with different conformational shapes of CD22 recognized by 2D1 and the 423 1E3, 5F8, and 6B7 group.

424 **3.6. IHC on canine lymph node and diffuse large B-cell lymphomas**

425 First we tested the seven antibodies in immunohistochemistry (IHC) for the detection of CD22c on 426 formalin-fixed paraffin-embedded samples of normal lymph node. Whereas all these antibodies were 427 efficient at labeling CD22c in its native form on the CLBL-1 cell line by flow cytometry analysis 428 (Fig. 2B), they displayed strong differences in their ability to stain the CD22c antigen on histological 429 sections, probably because of antigen denaturation after exposure to organic solvents during the 430 process of histological preparation (Fig. 4A). The clones 2D1 and 5C2 did not yield any specific 431 staining of canine lymphocytes in the B-cell areas of normal lymph node and were therefore 432 considered improper for immunohistochemistry. The clones 5A3 and 6B7 labeled sparse B cells in 433 canine normal lymph nodes, whereas the clones 1E3, 5F8, and 10C6 were the most sensitive for IHC 434 applications, because they labeled the membrane of large B cells in the germinal centers (Fig. 4A), as 435 well as the membrane of plasma cells (not shown). The 10C6 antibody clearly gave the best staining 436 on healthy lymph node. Interestingly, even though 10C6 and 5C2 shared the same epitope on canine 437 CD22 (Fig. 3B), the 5C2 MAb was improper for IHC application, contrary to the former. This was 438 also true for the 1E3 and 5F8 clones, which share a common epitope with the 6B7 MAb: the two 439 former gave a satisfactory and comparable signal on CD22c in normal lymph node, while the 6B7 440 clone was inefficient in labeling this antigen on tissue sections. It is noteworthy that the distribution 441 pattern of CD22-positive cells observed in the normal canine lymph node indicated that CD22 is not 442 a pan-B-cell marker in dogs and is expressed by plasma cells.

Since these MAbs are the first anti-canine CD22c isolated to our knowledge, the CD22c expression status of canine DLBCLs was unknown at the beginning of the study. A canine DLBCL sample was immunolabeled with the seven anti-CD22c MAbs, showing that the 2D1 and 5C2 clones failed to react with lymphoma cells; the 5A3 and 6B7 clones gave a positive signal at the membrane of most neoplastic large B cells; and the 1E3, 5F8, and 10C6 MAbs positively labeled all of the neoplastic B cells, with the best IHC results obtained with the 10C6 clone (Fig. 4A). From this IHC assay, we

retained the 10C6 MAb for further development, for diagnosis in IHC, and for nuclear medicineapplications, i.e., SPECT imaging and radioimmunotherapy.

451 We then proceeded to a first evaluation of CD22 expression on 30 canine DLBCLs by IHC, using the 452 10C6 MAb (Fig. 4B). Among the 30 cases analyzed, 17 were strongly labeled with 10C6, 11 453 displayed intermediate CD22c membrane expression, and only two cases were negative for CD22 454 expression on DLBCL cells. There was no significant correlation between CD22 expression and the 455 germinal-center or non-germinal-center phenotype of these cases. The high frequency of membrane 456 CD22 expression by canine DLBCLs validates CD22 as a good antigen for targeted therapy of canine 457 DLBCL, in accordance with what has been described in human DLBCL.

458 **3.7. Internalization properties of anti-CD22c MAbs**

459 A characteristic of antibodies directed against human CD22 is their ability to internalize once bound 460 to the antigen. This is of particular interest in the context of phenotypic imaging or 461 radioimmunotherapy, because radiolabeled antibodies with a residualizing property would make it 462 possible to sequester radioactivity within cell compartments after internalization, allowing higher activity deposition than a simpler membrane binding of the radiolabeled antibody (Mattes et al., 463 464 1997). We thus determined the internalization ability of our CD22c-specific MAbs on the canine 465 DLBCL CLBL-1 cell line, which naturally expresses CD22. Usually, CD22 internalization is 466 evaluated on cells preloaded with saturating amounts of anti-CD22 MAb at 4°C to avoid membrane turnover. After washing, cells are placed at 37°C and internalization is evaluated at different time 467 468 points. However, in nuclear medicine applications, DLBCL cells targeted by anti-CD22 antibodies 469 are exposed to variable circulating antibody concentrations in the course of treatment, due to the 470 mobilization of antibodies on healthy B cells and DLBCL cells, and due to antibody catabolism that 471 progressively decreases the concentration of MAb in blood. We therefore wondered what the 472 antibody binding to membrane CD22 antigen could be at various concentrations at 37°C compared to 473 4°C. Four MAb concentrations corresponding to 10-, 5-, 1-, and 0.1-fold their Kd value were used to 474 compare the binding of the different anti-CD22 antibodies at comparable levels of antigen saturation. 475 At different time points after the beginning of the incubation, the cells were placed at 4°C, washed 476 with ice-cold PBS and labeled with an anti-mouse antibody to measure the mean fluorescence at each 477 time point using flow cytometry. The membrane expression level of each antibody at 10- and 1-fold 478 its Kd is shown in Figure 5A. A clear internalization of all MAbs is observed at 37°C with the 479 antibody concentration corresponding to 10-fold the antibody Kd (saturation). However, a lower 480 concentration corresponding to the Kd (half-saturation) results in higher membrane expression at 481 37°C than at 4°C of MAbs 1E3, 6B7, and 5A3, indicates that some antibodies may in some instances 482 stabilize CD22 at the cell membrane, at least for the duration of the assay (6 h). The relative 483 expression level at 37°C versus 4°C at the four concentrations investigated in this experiment is 484 summarized in Figure 5B. Only the MAbs 5C2, 10C6, and 2D1 were able to internalize at low 485 concentration (0.1-fold the MAb Kd), indicating that internalization not only depends on the antibody 486 binding on its target, but also on the density of bound antibody at the cell surface. Indeed, the 487 internalizations of the different antibodies were variously affected by saturation level, as shown in 488 Figure 5C where the percentage of expression at 37°C relative to 4°C is plotted against the 489 percentage of saturation at 4°C observed at each concentration used in the test. This graph 490 emphasizes that a threshold of antigen occupation needs to be reached for internalization to take 491 place. This threshold was low for 5C2, 10C6, and 2D1 because they were internalized at the lowest 492 MAb concentrations used in the test. Conversely, internalization was observed for MAbs 1E3, 6B7, 493 and 5F8 when the surface density reached 45-65% saturation and even more for the 5A3 MAb. It is 494 puzzling that these strong, intermediate, and low internalizing capabilities segregate with the epitopes

recognized, respectively, by 10C6 and 5C2; 6B7, 1E3, and 5F8; and 5A3 MAbs. One could
hypothesize that the topology of MAb binding to CD22 affects the efficiency of the internalization
process.

498 Finally, we evaluated the internalization property on human lymphoma cell line of the anti-Human 499 CD22 hLL-2 MAb, already used in phase I/II clinical trials for DLBCL treatment in humans, to 500 obtain an element of comparison with the internalization property of the anti-CD22c MAbs. The 501 internalization profile of hLL-2 MAb at different concentrations was similar to the profile of 6B7 or 502 1E3 MAbs. As for the 6B7 and 1E3 MAbs, membrane stabilization of CD22 was observed for 503 concentrations corresponding to 0.1- and 1-fold the dissociation constant of the antibody. This 504 indicates that our antibodies against CD22c have similar properties as compared to the anti-CD22h 505 hLL-2, and are thus suitable to perform preclinical trials in dogs with spontaneous DLBCL for new 506 imaging and therapeutic protocol testing.

507 **3.8. Biodistribution of anti-CD22c in mice xenografted with CLBL-1**

508 Because of the different internalizing behaviors of the anti-cCD22 antibodies, we wondered which 509 one would be the most appropriate MAb for imaging and radioimmunotherapy. We chose to compare 510 10C6, 5C2, 6B7, and 1E3, which displayed distinct internalization patterns and high affinities, in a 511 biodistribution assay. The 2D1 and 5A3 MAbs were excluded from this assay because of the IgG2b 512 isotype of 2D1 and the low affinity of 5A3. Eight-week-old NMRI-nu mice were subcutaneously 513 engrafted in the flank with five million CLBL-1 cells. Fourteen days after engraftment, MAbs 10C6, 5C2, 6B7, and 1E3 radiolabeled with ¹²⁵I were injected in the tail vein. Mice were sacrificed at 1, 4, 514 515 and 16 h after injection and the organs were weighed and counted in a gamma counter. The results of 516 biodistribution are shown in Figure 6. No significant differences of accumulated activity in tumors 517 and healthy organs could be objectified between the four antibodies. The cumulated activity in the 518 tumor 16 h after injection reached around 4.5% IA/g with the four antibodies tested. Although the 519 activity to the tumor was quite low, the increase over time of the cumulated activity confirmed the 520 specificity of canine CD22 targeting in this mouse model. For imaging and radioimmunotherapy 521 applications, high-affinity antibodies were favored; 5C2 and 10C6 MAbs were the anti-CD22c clones 522 with the highest affinities in our antibody panel, but 10C6 proved to be usable for diagnosis of 523 spontaneous canine DLBCL, contrary to 5C2, which was inefficient for IHC (Fig. 4A). We therefore 524 pursued our investigations with the 10C6 antibody to validate its value for further applications in 525 veterinary medicine.

526 **3.9. PET imaging in mice xenografted with CLBL-1**

527 Our primary goal, isolating anti-CD22c MAbs, was to undertake imaging and radioimmunotherapy 528 assays in dogs with spontaneous DLBCL. We wished to perform SPECT-CT with indium-111 529 radiolabeled antibody and radioimmunotherapy with yttrium-90. This requires the coupling of a 530 chelating agent, enabling radiolabeling with these isotopes. We sought to ensure that the modification 531 of the 10C6 antibody by the chelating agent DOTA-NCS did not affect its ability to bind to the CD22 532 antigen. The 10C6 MAb was coupled to DOTA using p-SCN-Bn-DOTA precursors able to 533 covalently link to the lysine side chain on the antibody. The mean number of DOTA chelators on the 534 antibody was estimated by determining the radiolabeling yield of the 10C6 MAb radiolabeled with increasing amounts of copper-64 using thin-layer chromatography. A mean number of 2.78 DOTA 535 per antibody was calculated, which is adapted for nuclear medicine applications. ⁶⁴Cu-10C6 was then 536 537 used in PET-CT imaging of nude mice 14 days after engraftment with the CLBL-1 cell line. PET-CT

images were acquired 16 h after injection of 10 MBg of ⁶⁴Cu-10C6 (Fig. 6B). Mice were then 538 sacrificed and the biodistribution of ⁶⁴Cu-10C6 was evaluated on tumor and healthy organs (Fig. 6A). 539 540 PET imaging provides clear visualization of the subcutaneous CLBL-1 xenograft in the right flank. The intense staining of the liver and the lungs with ⁶⁴Cu-10C6 MAb is based on the large volume of 541 542 these organs and their high blood contents. Although copper catabolism implies liver and biliary excretion, we only detected a slight increase in the cumulated activity of ⁶⁴Cu-10C6 MAb compared 543 to ¹²⁵I-10C6 to the liver (5.46 ± 0.35 vs. $3.55 \pm 0.44\%$ IA/g, respectively). This is consistent with the higher activity to the blood for ¹²⁵I-10C6 compared to ⁶⁴Cu-10C6. After cellular catabolism of the 544 545 546 antibody, iodine is released as an iodo-tyrosine in the interstitial space. In contrast, chelated metallic 547 isotopes display residualizing properties leading to their sequestration within the cell compartment. 548 This residualizing property may explain in part the higher activity measured to the spleen with ⁶⁴Cu-549 10C6 as compared to 125 I-10C6 (5.24 ± 0.35 vs. 2.83 ± 0.1%IA/g for 125 I-10C6), and the cumulated activity uptake to in the tumor that was also slightly higher with ⁶⁴Cu-10C6 MAb as compared to 550 125 I-10C6 (5,.45 ± 0.57 vs. 4.70 ± 1.04%IA/g, respectively). These results indicate that 10C6 can be 551 552 efficiently radiolabeled with satisfactory stability, either by iodination or with a metallic isotope 553 using the 10C6-DOTA MAb. The capacity of 10C6 antibody to specifically label canine DLBCL in 554 vivo in mouse xenograft models validates its usefulness for future clinical assays in dogs with 555 spontaneous DLBCL for diagnosis, imaging, and radioimmunotherapy.

556 **3.10.** SPECT-CT imaging with ¹¹¹In-10C6 MAb on dog with spontaneous DLBCL

The enrolled dog was a 9-year-old male Cavalier King Charles spaniel with multicentric lymphoma. 557 558 The physical examination revealed apathy, weight loss (weight at diagnosis, 8 kg), dysorexia, 559 hyperthermia, generalized lymphadenopathy (peripheral, thoracic and abdominal) and abdominal 560 ultrasound showed splenic infiltration. The histopathological analysis and immunohistochemistry 561 performed on the right mandibular lymph node removed by surgery made it possible to establish a 562 diagnosis of DLBCL with CD22 overexpression. This surgery was immediately followed by a 563 cytoreduction step using an intramuscular injection of L-asparaginase (Kidrolase® 10,000 IU, Jazz 564 Pharmaceuticals, 400 IU.kg⁻¹) to improve the animal's general condition before phenotypic imaging.

Three weeks after L-asparaginase injection, SPECT-CT acquisition was performed 49 h after radiopharmaceutical injection (0.25 mg ¹¹¹In-10C6; specific activity 128.8 MBq.mg⁻¹; co-injected with 11.75 mg naked 10C6). Radiopharmaceutical injection was well tolerated and no toxicity was observed until the animal's death. Although no lymphadenopathy could be demonstrated on CT images (Fig. 7A), SPECT images revealed tumoral infiltration of numerous lymph nodes, as shown for retropharyngeal lymph nodes (Fig. 7B and 7C).

571 **DISCUSSION**

572 Here we describe a simple method to generate monoclonal antibodies against all types of membrane 573 proteins with a single transmembrane domain. The possibility of expressing these antigens after 574 stable transfection in CHO cells as a soluble form merged to a tag (β 2m herein) enables to easily 575 identify productive CHO clones using an anti-tag antibody in a one step ELISA test. This anti-tag 576 antibody coupled to an affinity chromatography column also enables, after a one-step purification 577 process, to purify sufficient amounts of recombinant protein to immunize mice. This soluble antigen 578 is also useful as a reagent in binding assays to perform immunoreactivity quality controls of the 579 MAbs once radiolabeled. Because we wanted to use this antigen for nuclear medicine applications, 580 we chose to perform hybridoma supernatant screening by flow cytometry analysis in order to discard 581 any antibodies that would recognize epitopes on the unfold antigen in ELISA test. Furthermore, since

582 soluble CD22c was merged to the human β 2m, some hybridomas generated against β 2m will not 583 recognize CD22-transfected CHO cells. This makes it possible to rapidly perform a first screening of 584 hybridomas producing antibodies recognizing CD22-transfected CHO cells, which obviates the need for a preliminary ELISA with human β 2m used as a negative control. This screening method enabled 585 586 us to screen around 500 hybridoma supernatants and resulted in the isolation of seven monoclonal 587 antibodies reactive against CD22c in its native conformation expressed by the canine DLBCL cell 588 line CLBL-1. The isolation of numerous MAbs with the same antigen specificity gave the 589 opportunity to select the most adapted one for in vivo imaging and radioimmunotherapy applications 590 and for diagnosis using immunohistochemistry. At least three distinct epitopes on CD22c antigen 591 were defined in our competition assay with the seven anti-CD22c MAbs. Antibodies 5C2 and 10C6 592 or 1E3 and 5F8 displayed very similar competition patterns. It is likely that each antibody represents 593 distinct clones owing to their differences in affinity or reactivity by IHC assay: 10C6 gave the best 594 results in IHC, contrary to 5C2, which failed to detect CD22 despite a shared recognition pattern and close dissociation constant values. 595

596 A hallmark of CD22 is its clathrin-dependent endocytosis upon antibody binding (John et al., 2003). 597 In the specific context of CD22 targeting in nuclear medicine, the intracellular behavior of the 598 radiopharmaceutical is of primary importance, since it impacts the dose deposition and thus the 599 quality of phenotypic imaging and the efficacy of RIT. Internalized isotopes with a residualizing 600 property like chelated metallic isotopes are trapped within the cell after vector catabolism, enhancing 601 the dose deposition, while iodinated antibody catabolism produces iodo-tyrosine, which is rapidly 602 excreted from the cell (Geissler et al., 1992; Naruki et al., 1990). This internalization property also 603 determines the efficacy of antibody-drug conjugates (ADC) as it largely determines the efficiency of 604 intracellular release of the drug linked to an antibody. The fate of antibody bound on CD22 once 605 internalized has been largely investigated but remains controversial, some authors favoring its 606 routing in a recycling pathway back to the cell surface via recycling endosome while others arguing 607 for a routing to degradation in lysosome (O'Reilly et al., 2011; Shan and Press, 1995). Most often, 608 the CD22 internalization process was evaluated with one antibody on several B-cell lymphomas, 609 underlining the variable internalization capabilities of cell lines of different origins.

610 Here we sought to take advantage of our panel of antibodies to investigate the variability of the internalization process depending on the antibodies. Internalization was evaluated by measuring 611 612 antibody binding at 4°C and 37°C using the CLBL-1 cell line at different antibody concentrations corresponding to comparable CD22 antigen saturation levels for all antibodies. It clearly appears that 613 614 at saturating concentration (10-fold the dissociation constant (Kd) of the MAb), internalization was 615 observed for all antibodies with differences in kinetics and intensity. However, at a nonsaturating 616 concentration, salient differences appear between antibodies. Some of them, such as 5C2, 10C6, and 617 2D1, retain their ability to internalize, while other MAbs such as 1E3, 5F8, and 6B7 and above all 618 5C3 are stabilized at the cell surface, resulting in a higher membrane expression at 37°C than at 4°C. 619 This would indicate that internalization not only depends on antibody binding on its target but also on 620 the density of bound antibody at the cell surface. A threshold of antigen occupation, which is 621 characteristic of each antibody, needs to be surpassed for internalization to take place during the 6 h 622 of the assay. Interestingly, these differences in internalization properties segregated quite well with 623 the epitope recognized on the CD22c antigen. However, the 2D1 antibody is an exception and 624 recognizes an epitope overlapping with 5F8, 1E3, and 6B7 antibodies but displays a very different 625 internalization profile.

626 The different abilities of monovalent and divalent antibody fragment or native antibody to induce 627 internalization of the transferrin receptor (TfR) – usually taken as a paradigm of clathrin-dependent 628 internalization and recycling to the membrane - has already been investigated. Saturation of 629 transferrin receptor with the monovalent F(ab)' fragment had no effect on TfR internalization, 630 contrary to F(ab)'2 and IgG (Lesley et al., 1989). We hypothesize that the ability of each antibody to 631 crosslink two CD22c antigens can be either energetically favorable or unfavorable depending on the 632 topology of the antibody-antigen (epitope-paratope) interaction. In the case of 10C6 and 5C2 633 antibodies, the binding of the first valence of the antibody to CD22c might promote the binding of 634 the second valence, allowing for crosslinking of surface CD22c and internalization at a nonsaturating 635 antibody concentration. Conversely, in the case of 1E3, 5F8, 6B7, and 5C3 MAbs, a high antibody 636 burden would be required to offset the energetically unfavorable crosslinking of CD22c in order it 637 occurs at a frequency and/or for a sufficient time course required for initiation of the CD22 internalization. The objective of this article was not to dissect in detail the mechanism and the 638 639 regulation of CD22 internalization. However, because we were able to distinguish high, intermediate 640 and low internalizing anti-CD22c MAbs, we wondered if this property could modify the dose 641 deposition to cancer cells within a RIT assay.

642 To address this question, biodistributions were performed with 5C2 and 10C6 on the one hand and 643 1E3 and 6B7 MAbs on the other hand, which display high and medium internalization abilities, 644 respectively. For this purpose, nude mice were engrafted subcutaneously with CLBL-1 cells and 645 injected two weeks after engraftment with each of the four MAbs radiolabeled with ¹²⁵I. Even if the 646 activity to the tumor remains rather low, these results are consistent with what is described in the 647 literature after injection of anti-CD22 MAb hLL2 in nude mice bearing human lymphoma xenografts 648 (Mattes et al., 1997). No significant differences were observed regarding the biodistribution of the 649 different MAbs tested in healthy organs. Kidney and liver activities could be explained by the blood 650 kinetics and appeared consistent with an absence of antibody binding in these organs, as expected 651 with mouse IgG_1 specific for a xenogeneic antigen. The tumor uptake of the radiolabeled MAb is 652 also similar for the four MAbs tested. The only notable but nonsignificant difference is a trend for 653 10C6 and 5C2 antibodies to accumulate more rapidly in the tumor. As an example, 4 h post-injection 654 the activity into the tumor for the 10C6 antibody was close to what was observed at 16 h (4.3 ± 0.6 and $4.7 \pm 1.0\%$ IA/g, respectively), contrary to 6B7 (3.4 ± 0.2 and $4.7 \pm 1.2\%$ IA/g, respectively). 655 656 Since 10C6 is the MAb with highest affinity and the best ability to stain CD22c by immunohistochemistry for spontaneous canine DLBCL diagnosis, we wished to further evaluate it as 657 a potent radiopharmaceutical to perform phenotypic imaging and RIT. These applications require using the 10C6 MAb radiolabeled with metallic isotopes, as ¹¹¹In for SPECT-CT imaging, ⁶⁴Cu for 658 659 PET-CT imaging, and 90 Y or 177 Lu for RIT. NCS-DOTA could be used as a bifunctional chelator to 660 label immunoconjugates with these three different isotopes. It was thus necessary to control that the 661 662 coupling of the chelating agent did not affect antibody affinity.

To this end, the 10C6 MAb was coupled to DOTA and radiolabeled with the positron emitter 64 Cu in 663 664 order to perform PET-CT imaging. Despite the low level of antibody accumulation using this tumor model, we were able to clearly detect subcutaneous CLBL-1 tumor 16 h after ⁶⁴Cu-10C6 injections, 665 validating that the 10C6 antibody affinity is preserved after coupling with DOTA. Mice were 666 sacrificed after imaging and the biodistribution of ⁶⁴Cu-10C6 was evaluated. The activity to the 667 668 tumor was comparable to what was observed with the iodinated MAb. The highest activity to the 669 heart observed with the iodinated antibody was consistent with a higher dose in the blood compared 670 to ⁶⁴Cu-10C6. In addition, the highest activity within the liver was expected due to liver elimination 671 of copper. We used ⁶⁴Cu in this assay because of the availability of PET-CT for imaging. We are 672 aware, however, that DOTA is not the best chelating agent for copper (Rylova et al., 2018). This may

673 explain the high liver uptake noted 16 h after injection, the faster decay in blood and the poor 674 increase in tumor uptake that would be expected with a residualizing metallic isotope compared to 675 ¹²⁵I-10C6. For future applications in dogs, we plan to use the DOTA chelating agent to radiolabel 676 10C6 MAb with ¹¹¹In for SPECT-CT imaging and with ⁹⁰Y for RIT. These isotopes are more stably 677 chelated with DOTA than copper. This may enable a higher dose deposition to the tumor, as shown 678 by Sharkey et al. comparing iodinate and indium-labeled antibody biodistribution targeting CD22 on 679 nude mice bearing the human B-cell NHL RL cell-line (Sharkey et al., 1997).

680 The relevance of 10C6 antibody for clinical purposes in veterinary medicine was evaluated imaging a 681 dog with spontaneous DLBCL in the context of disease staging. This result validates the 10C6 anti-682 canine CD22 antibody for further applications in phenotypic imaging and radioimmunotherapy. We 683 will use this antibody to treat dogs with spontaneous DLBCL based on the encouraging results 684 previously obtained on human DLBCL in a phase I/II assay. This clinical trial in dogs with a 685 preclinical value for human patients ensures more accurate evaluation of the relevance of CD22 686 targeting for DLBCL management. It also secures the transfer to the clinic of new methods in 687 quantitative imaging and new therapeutic approaches, which are difficult to evaluate in humans.

688

Table 1. Dissociation constants and isotypes of the seven MAbs specific for canine CD22.

	2D1	5A3	6B7	1E3	10C6	5C2	5F8
Kd (M)	8.47E-10	3.88E-08	2.23E-10	9.80E-10	1.21E-10	3.08E-10	5.61E-09
Std. error	9.92E-11	9.90E-09	6.01E-11	1.35E-10	1.78E-11	3.61E - 11	5.07E-10
Isotype	IgG2b,k	IgG1,k	IgG1,k	IgG1,k	IgG1,k	IgG1,k	IgG1,k

690

691 Figures legends:

692 Figure 1: Production of soluble CD22c for mice immunization and production of CD22c 693 expressing CHO cell line for hybridoma screening. (A) The recombinant canine CD22c-Beta2M 694 protein produced by the transfected CHO cell clone showing the highest expression was purified by 695 affinity chromatography using the 6H4 MAb followed by a Superdex 200 column. The results of size-exclusion chromatography show three distinct peaks. (B) Further analysis of fractions F1 to F6 696 697 by Western blot showed high expression of CD22c-Beta2M in the major peak. (C) At the same time, 698 CHO cells were transfected with a full-length CD22c merged to GFP (CD22c-GFP) for hybridoma 699 screening using cytofluorometry. The two upper panels show FACS analysis of WT CHO (left) and 700 polyclonal transfected CHO cells (right). The transfected CHO cells were further subcloned to select 701 high-expressing clones: 5C.2 and 5G10 (bottom panels). (D) Western blot analysis allowed us to 702 select clone 5G10, which expresses a unique protein at the size corresponding to CD22cGFP for 703 hybridoma screening.

Figure 2: Mice immunization and hybridoma screening. (A) Mice were first injected with CD22c Beta2M in complete Freund adjuvant at day 0 and 15 days later with the same amount of CD22c Beta2M in incomplete Freund adjuvant. At day 29, the plasma of mice were harvested and used at
 serial dilutions in a FACS assay to label CD22-EGFP CHO clone 5G10 (grey lines, closed symbols)

708 and the canine DLBCL cell-line CLBL-1 (dashed lines, open symbols) and compared to the signal 709 obtained at the same dilution factors of the plasma before antigen injection (close and open circles). 710 A clear signal increase at day 29 attests for immunization of mice. The lower signal obtained on 711 CLBL-1 is consistent with a low CD22 expression on canine DLBCL. (B) The hybridomas obtained 712 after fusion of splenocytes of an immunized mouse were screened by FACS analysis using CD22-713 EGFP CHO cells (dark grey) as a positive control, WT CHO cells as a negative control (medium 714 grey). The specificity for the CD22 antigen was confirmed on the CLBL-1 cell line (light grey). Here 715 are shown the results obtained for the seven hybridomas specific for CD22c, isolated from the fusion 716 of the splenocytes of one mouse.

717 Figure 3: Epitope mapping of anti-CD22c antibodies. The seven MAbs selected for their 718 specificity against the CD22c antigen were biotinylated and used in an ELISA assay using the 719 CD22c-Beta2M for coating and the Beta2M antibody 6H4 for protein detection. Each biotinylated antibody was mixed with a tenfold excess of each anti-CD22c clone, in order to identify the 720 721 competing antibodies for the binding on CD22c. The results are expressed as the percentage of 722 binding in comparison to the results obtained with a control isotype. The binding inhibition of each 723 antibody by itself reflects the maximum inhibition of the test and constitutes a positive control of the 724 competition test. A schematic representation of CD22c and the different epitopes recognized by the 725 anti-CD22c MAbs is shown.

726 Figure 4: Immunohistochemistry to canine CD22 in a normal lymph node and in 30 canine 727 diffuse large B-cell lymphomas. (A) In the normal canine lymph node (upper row), the 2D1 and 728 5C2 MAbs yielded no specific signal and were considered improper for IHC. The 5A3 and 6B7 729 MAbs were of poor sensitivity. The 1E3, 5F8, and 10C6 MAbs labeled large B cells in germinal 730 centers. CD22 was expressed at the membrane of most but not all B cells. In a CD22-positive canine 731 DLBCL (lower row), the best IHC signal was obtained with the 10C6 clone. (B) In a series of 30 732 canine DLBCLs, 17 cases were strongly CD22-positive, 11 were moderately CD22-positive, and two 733 were CD22-negative.

734 Figure 5: Internalization of anti-CD22c MAbs. The CLBL-1 cell line was incubated with each of 735 the seven anti-CD22c MAbs at concentrations corresponding to 10-, 5-, 1-, and 0.1-fold their own 736 dissociation constant at 4°C and 37°C to evaluate MAb internalization at comparable levels of 737 CLBL-1 CD22 saturation. (A) Kinetic follow-up of membrane CD22c expression at 4 and 37°C: at each kinetic time point, the cells were placed at 4°C, fixed with paraformaldehyde, labeled with an 738 739 antimouse Ig Mab, and the MFI was measured by FACS. Open triangle, dashed line: 4°C, 10 × Kd; 740 close triangle, solid line: 37° C, $10 \times$ Kd; open square, dashed line: 4° C, $1 \times$ Kd; closed square, solid 741 line: 37° C, $1 \times$ Kd. For comparison, the antihuman hLL2 antibody internalization was evaluated in 742 the same conditions on the human Burkitt lymphoma cell line Daudi. Here are shown the mean 743 results +/- standard deviation of three independent assays. (B) Ratio of membrane CD22c expression 744 at 37°C vs 4°C at 240 min for each concentration of anti-CD22c MAbs: the dashed line in this 745 histogram corresponds to equal CD22 expression at 4°C and 37°C. Whereas clear internalization is 746 observed for all antibodies at saturating concentrations of $10 \times$ Kd and $5 \times$ Kd (MFI 37° C/ MFI 4° C < 100), nonsaturating amounts of antibody (1 \times Kd and 0.1 \times Kd) induced an over-expression of CD22 747 748 at the cell membrane when incubated with 1E3, 6B7, and 5A3 MAbs, and 5F8 to a lesser extent. (C) 749 Ratio of CD22c expression at 37°C vs 4°C as a function of the level of saturation of CD22c at 4°C 750 for each MAb concentration: the dashed line corresponds to an equivalent CD22c expression at 37°C 751 and 4°C. Three groups of MAbs can be distinguished: highly internalizing antibodies 5C2, 10C6, and 752 2D1; intermediary internalizing antibodies 5F8, 1E3, and 6B7; and weakly internalizing antibody 753 5A3.

Figure 6: Biodistribution of anti-CD22 antibodies and PET imaging of CLBL-1 xenografts in 754 755 nude mice. (A) Biodistribution to tumors, blood, liver, and kidney 1, 4, and 16 h after injection of 6.10⁻⁶ g of 10C6, 1E3, 5C2, and 6B7 radiolabeled with ¹²⁵I. Here are shown the mean results +/-756 standard deviation obtained on three mice. (B) PET-CT imaging 16 h after injection of ⁶⁴Cu-10C6. 757 758 The CLBL-1 cell line was engrafted in the left flank of nude mice. Left panel: CT scan of the imaged mouse. Right panel: PET imaging showing the radiolabeled tumor in the left flank of the nude 759 mouse. (C) Comparison between the biodistribution of 10C6 radiolabeled with ¹²⁵I and ⁶⁴Cu. 760 761 Immediately after imaging at 16 h post-injection of the ⁶⁴Cu-radiolabeled antibody, the mouse was sacrificed and the biodistribution in the different organs of interest was evaluated and compared to 762 the biodistribution of 125 I-10C6 at the same time point. 763

Figure 7: Tumor targeting with ¹¹¹In-10C6 MAb on a dog with spontaneous DLBCL. A 9-year-764 old male Cavalier King Charles spaniel with multicentric DLBCL overexpressing CD22 antigen was 765 injected with 31.3 MBq ¹¹¹In-10C6 (0.25 mg radiolabeled MAb coinjected with 11.75 mg naked 766 10C6 for a total dose of 1.5 mg.kg⁻¹). The specific activity of the injected ¹¹¹In-10C6 was 2.6 767 768 MBq.mg⁻¹. SPECT-CT was performed 2 days later (Optima 640, GE Medical Systems) with a 769 medium-energy general-purpose collimator (MEGP). (A) No lymphadenopathy of retropharyngeal 770 lymph nodes could be demonstrated on CT slices (sagittal cut) since a cytoreduction step had 771 drastically reduced the size of tumor masses. (B) However, SPECT acquisition revealed a strong 772 signal corresponding to the retropharyngeal lymph node area, (C) as shown on fusion images.

773 Acknowledgments:

The authors would like to thank Barbara Rütgen for supplying the CLBL-1 cell line; the Laboratory
of Animal Histopathology (Oniris, Nantes, France) for supplying paraffin blocks of canine diffuse
large B-cell lymphomas; Florence Lezin and Bernard Fernandez for technical assistance; Gildas
Vaillant (STAR, Oniris) for dog anaesthesia; Marie Roussel and Sonia Becavin for the nursing of the
dog.

779 Fundings:

This work was supported by the "Institute Thématique Multi-Organismes (ITMO) Cancer" of the "Alliance pour les sciences de la vie et de la santé (AVIESAN)" jointly with the "Institut National du Cancer (INCA)" under one grant entitled: 'Spontaneous tumour models in animals for translational research in oncology' no. Al1196NS (CANIMAB). Financial support was also provided by a 'Physics, Mathematics and Engineering sciences applied to the Cancer Research' grant (DogPPK project) awarded by INSERM and INCa.

786

787 Author's contributions:

FD participated in hybridoma production, antibody radiolabeling, biodistribution and imaging studies. He was the major contributor in writing the manuscript. MaB, KB and MD isolated and produced naked and radiolabelled antibodies. FN determined their ability to be used in immunohistochemistry and performed IHC on dog biopsy. JA provided the canine tumor tissue bank and contributed to the development of the project. FE characterized MAb internalization property, performed epitope mapping, and participated to biodistribution on mouse model. She supervised the logistics for dog inclusion in the assay and the clinical assistance at the Veterinary Teaching

Hospital. VG participated to the assays of MAb internalization. CM supervised and executed
experiments on rodents. CI participated in dog imaging. MiB radiolabeled 10C6 MAb with copper64. NC performed SPECT-CT acquisitions and CBM interpreted SPECT-CT images. All the authors
read and approved the final manuscript.

FE and MB contributed equally to this work. As such, we would like that they share the first author position of this publication.

801 Conflict of interest statement:

802 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial 803 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

804 Availability of data and materials:

805 All datasets generated and analyzed for this study are included in the manuscript.

806

807 <u>REFERENCES</u>

Casadei B, Pellegrini C, Pulsoni A, Annechini G, De Renzo A, Stefoni V, et al. 90-yttriumibritumomab tiuxetan consolidation of fludarabine, mitoxantrone, rituximab in intermediate/high-risk
follicular lymphoma: updated long-term results after a median follow-up of 7 years. *Cancer Med.*2016;5(6):1093-7. doi:10.1002/cam4.684

Chevallier P, Eugene T, Robillard N, Isnard F, Nicolini F, Escoffre-Barbe M, et al. (90)Y-labelled
anti-CD22 epratuzumab tetraxetan in adults with refractory or relapsed CD22-positive B-cell acute
lymphoblastic leukaemia: a phase 1 dose-escalation study. *Lancet Haematol.* 2015;2(3):e108-17.
doi:10.1016/S2352-3026(15)00020-4

Biab M, Nguyen F, Berthaud M, Maurel C, Gaschet J, Verger E, et al. Production and
characterization of monoclonal antibodies specific for canine CD138 (syndecan-1) for nuclear
medicine preclinical trials on spontaneous tumours. *Vet Comp Oncol.* 2017;15(3):932-51.
doi:10.1111/vco.12233

Ferrucci PF, Vanazzi A, Grana CM, Cremonesi M, Bartolomei M, Chinol M, et al. High activity
90Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin) with peripheral blood progenitor cells support in patients with
refractory/resistant B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol.* 2007;139(4):590-9.
doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06869.x

Fraker PJ and Speck JC, Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble
chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun.*1978;80(4):849-57. PMID: 637870

Geissler F, Anderson SK, Venkatesan P and Press O. Intracellular catabolism of radiolabeled anti-mu
antibodies by malignant B-cells. *Cancer Res.* 1992;52(10):2907-15. Accession Number: 1581908

829 Gopal AK, Rajendran JG, Gooley TA, Pagel JM, Fisher DR, Petersdorf SH, et al. High-dose 830 [1311]tositumomab (anti-CD20) radioimmunotherapy and autologous hematopoietic stem-cell

- transplantation for adults > or = 60 years old with relapsed or refractory B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2007;25(11):1396-402. doi:10.1200/JCO.2006.09.1215
- Hoelzer D. Novel antibody-based therapies for acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;243-9. doi:10.1182/asheducation-2011.1.243
- Illidge TM, Bayne M, Brown NS, Chilton S, Cragg MS, Glennie MJ, et al. Phase 1/2 study of
 fractionated (131)I-rituximab in low-grade B-cell lymphoma: the effect of prior rituximab dosing and
 tumor burden on subsequent radioimmunotherapy. *Blood*. 2009;113(7):1412-21. doi:10.1182/blood2008-08-175653
- 839 Illidge TM, Mayes S, Pettengell R, Bates AT, Bayne M, Radford JA, et al. Fractionated (9)(0)Y840 ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy as an initial therapy of follicular lymphoma: an
 841 international phase II study in patients requiring treatment according to GELF/BNLI criteria. *J Clin*842 *Oncol.* 2014;32(3):212-8. doi:10.1200/JCO.2013.50.3110
- John B, Herrin BR, Raman C, Wang YN, Bobbitt KR, Brody BA, et al. The B cell coreceptor CD22
 associates with AP50, a clathrin-coated pit adapter protein, via tyrosine-dependent interaction. J *Immunol.* 2003;170(7):3534-43. Accession Number: 12646615
- Juweid ME. Radioimmunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma: from clinical trials to clinical
 practice. *J Nucl Med.* 2002;43(11):1507-29. Accession Number: 12411555
- Kaminski MS, Zelenetz AD, Press OW, Saleh M, Leonard J, Fehrenbacher L, et al. Pivotal study of
 iodine I 131 tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade B-cell
 non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol.* 2001;19(19):3918-28. doi:10.1200/JCO.2001.19.19.3918
- Kletting P, Maass C, Reske S, Beer AJ and Glatting G. Physiologically based pharmacokinetic
 modeling is essential in 90Y-labeled anti-CD66 radioimmunotherapy. *PLoS One*.
 2015;10(5):e0127934. doi: 10.1371/journal.pone.0127934
- Kraeber-Bodere F, Pallardy A, Maisonneuve H, Campion L, Moreau A, Soubeyran I, et al.
 Consolidation anti-CD22 fractionated radioimmunotherapy with (90)Y-epratuzumab tetraxetan
 following R-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a prospective, single
 group, phase 2 trial. *Lancet Haematol.* 2017;4(1):e[-e45. doi:10.1016/S2352-3026(16)30168-5
- LeBlanc AK, Mazcko CN and Khanna C. Defining the value of a comparative approach to cancer drug development. *Clin Cancer Res.* 2016;22(9):2133-8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2347
- Lesley J, Schulte R and Woods J. Modulation of transferrin receptor expression and function by antitransferrin receptor antibodies and antibody fragments. *Exp Cell Res.* 1989;182(1):215-33. Accession
 Number: 2653853
- Maass C, Kletting P, Bunjes D, Mahren B, Beer AJ and Glatting G. Population-based modeling
 improves treatment planning before (90)Y-labeled anti-CD66 antibody radioimmunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm*. 2015;30(7):285-90. doi:10.1089/cbr.2015.1878

Macor P, Secco E, Zorzet S, Tripodo C, Celeghini C and Tedesco F. An update on the xenograft and
mouse models suitable for investigating new therapeutic compounds for the treatment of B-cell
malignancies. *Curr Pharm Des.* 2008;14(21):2023-39. Accession Number: 18691113

Matrisian LM, Bowden GT, Krieg P, Furstenberger G, Briand JP, Leroy P, et al. The mRNA coding
for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(24):9413-7. PMCID: 387148

872 Mattes MJ, Shih LB, Govindan SV, Sharkey RM, Ong GL, Xuan, et al. The advantage of 873 residualizing radiolabels for targeting B-cell lymphomas with a radiolabeled anti-CD22 monoclonal 874 antibody. *Int J Cancer*. 1997;71(3):429-35. Accession Number: 9139880

Morschhauser F, Radford J, Van Hoof A, Vitolo U, Soubeyran P, Tilly H, et al. Phase III trial of
consolidation therapy with yttrium-90-ibritumomab tiuxetan compared with no additional therapy
after first remission in advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2008;26(32):5156-64. doi:
10.1200/JCO.2008.17.2015

Naruki Y, Carrasquillo JA, Reynolds JC, Maloney PJ, Frincke JM, Neumann RD, et al. Differential
cellular catabolism of 1111n, 90Y and 1251 radiolabeled T101 anti-CD5 monoclonal antibody. *Int J Rad Appl Instrum B*. 1990;17(2):201-7. Accession Number: 1692819

Nikula TK, Curcio MJ, Brechbiel MW, Gansow OA, Finn RD and Scheinberg DA. A rapid, single
vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. *Nucl Med Biol.* 1995;22(3):387-90. PMID: 7627155

O'Reilly MK, Tian H and Paulson JC. CD22 is a recycling receptor that can shuttle cargo between
the cell surface and endosomal compartments of B cells. *J Immunol.* 2011;186(3):1554-63.
doi:10.4049/jimmunol.1003005

Rizzieri D. Zevalin((R)) (ibritumomab tiuxetan): After more than a decade of treatment experience,
what have we learned? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;105:5-17.
doi:10.1016/j.critrevonc.2016.07.008

Rutgen BC, Hammer SE, Gerner W, Christian M, de Arespacochaga AG, Willmann M, et al.
Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously
occurring diffuse large cell lymphoma. *Leuk Res.* 2010;34(7):932-8.
doi:10.1016/j.leukres.2010.01.021

Rylova SN, Stoykow C, Del Pozzo L, Abiraj K, Tamma ML, Kiefer Y, et al. The somatostatin
receptor 2 antagonist 64Cu-NODAGA-JR11 outperforms 64Cu-DOTA-TATE in a mouse xenograft
model. *PLoS One*. 2018;13(4):e0195802. doi:10.1371/journal.pone.0195802

Saba C, Paoloni M, Mazcko C, Kisseberth W, Burton JH, Smith A, et al. A comparative oncology
study of iniparib defines its pharmacokinetic profile and biological activity in a naturally-occurring
canine cancer model. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149194. doi:10.1371/journal.pone.0149194

Scholz CW, Pinto A, Linkesch W, Linden O, Viardot A, Keller U, et al. (90)Yttrium-ibritumomabtiuxetan as first-line treatment for follicular lymphoma: 30 months of follow-up data from an
international multicenter phase II clinical trial. J Clin Oncol. 2013;31(3):308-13.
doi:10.1200/JCO.2011.41.1553

Shan D and Press OW. Constitutive endocytosis and degradation of CD22 by human B cells. J
 Immunol. 1995;154(9):4466-75. Accession Number: 7722303

Sharkey RM, Behr TM, Mattes MJ, Stein R, Griffiths GL, Shih LB, et al. Advantage of residualizing
 radiolabels for an internalizing antibody against the B-cell lymphoma antigen, CD22. *Cancer Immunol Immunother*. 1997;44(3):179-88. Accession Number: 9191878

- 910 Tembhare PR, Marti G, Wiestner A, Degheidy H, Farooqui M, Kreitman RJ, et al. Quantification of 911 expression of antigens targeted by antibody-based therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Am J*
- 912 Clin Pathol. 2013;140(6):813-8. doi:10.1309/AJCPYFQ4XMGJD6TI
- 913 Tomblyn M. Radioimmunotherapy for B-cell non-hodgkin lymphomas. *Cancer Control.*914 2012;19(3):196-203. doi:10.1177/107327481201900304
- 915 Zandvliet M. Canine lymphoma: a review. *Vet Q.* 2016;36(2):76-104. 916 doi:10.1080/01652176.2016.1152633
- 917 Zullo K, Amengual JE, O'Connor OA and Scotto L. Murine models in mantle cell lymphoma. *Best*
- 918 Pract Res Clin Haematol. 2012;25(2):153-63. doi:10.1016/j.beha.2012.04.009















Figure 3 :















Figure 7 :



BIBLIOGRAPHIE

- Abadie, J., Hedan B., Cadieu E., De Brito C., Devauchelle P., Bourgain C., Parker HG., et al. « Epidemiology, pathology, and genetics of histiocytic sarcoma in the Bernese Mountain Dog breed ». *Journal of Heredity*, 2009,100(Supplement 1):19-27.
- Abadie J., Nguyen F., Loussouarn D., Peña L., Gama A., Rieder N., Belousov A., et al. « Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance ». *Breast Cancer Research and Treatment*, 2018,167(2):459-68.
- Abramson JS. « The spectrum of double hit lymphomas ». *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2016,30(6):1239-49.
- Adnan A., Deep K., Kameswaran M., Nikam D., Chandrakala S., Dash A., Banerjee S., et Basu S. « Biodistribution and dosimetry of indigenous ¹³¹I-Rituximab in B-cell lymphoma: pilot study estimating patient specific dose comparing two different dosimetric methods ». *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 2018, jnmt.118.216754.
- Aghevlian S., Boyle AJ., et Reilly RM. « Radioimmunotherapy of cancer with high linear energy transfer (LET) radiation delivered by radionuclides emitting α-particles or Auger electrons ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017,109:102-18.
- Al-Khan A.A., Gunn HJ., Day MJ., Tayebi M., Ryan SD., Kuntz CA., Saad ES., Richardson SJ., et Danks JA. « Immunohistochemical validation of spontaneously arising canine osteosarcoma as a model for human osteosarcoma ». *Journal of Comparative Pathology*, 2017,157(4):256-65.
- Alizadeh AA., Eisen MB., Davis RE., Ma C., Lossos IS., Rosenwald A., Boldrick JC., et al. « Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling ». *Nature*, 2000,403:503-11.
- Allen BJ., Singla AA., Abbas Rizvi SM., Graham P., Bruchertseifer F., Apostolidis C., et Morgenstern A. « Analysis of patient survival in a phase I trial of systemic targeted α-therapy for metastatic melanoma ». *Immunotherapy*, 2011,3(9):1041-50.
- Allen BJ., Raja C., Rizvi S., Li Y., Graham P., Thompson JF., Reisfeld RA. Et Kearsley J. « Intralesional targeted alpha therapy for metastatic melanoma ». *Cancer Biology & Therapy*, 2005,4(12):1318-24.
- Almagro JC., Daniels-Wells TR., Perez-Tapia SM., et Penichet ML.. « Progress and challenges in the design and clinical development of antibodies for cancer therapy ». *Frontiers in Immunology*, 2018,8.
- Andersson H., Cederkrantz E., Back T., Divgi C., Elgqvist J., Himmelman J., Horvath G., et al. « Intraperitoneal-particle radioimmunotherapy of ovarian cancer patients: pharmacokinetics and dosimetry of ²¹¹At-MX35 F(ab')₂ - A phase I study ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2009,50(7):1153-60.
- Andrade-Campos MM., Montes-Limón AE., Soro-Alcubierre G., Lievano P., López-Gómez L., Baringo T., et Giraldo P. « Patients older than 65 years with non-Hodgkin lymphoma are suitable for treatment with ⁹⁰Y-ibritumumab tiuxetan: a single-institution experience ». *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 2015,15(8):464-71.
- Annals of the ICRP : Radiation dose to patients from radiopharmaceuticals. 1987, Pergamon Press, volume 18(1-4).

- Aresu L. « Canine lymphoma, more than a morphological diagnosis: what we have learned about diffuse large B-cell lymphoma ». *Frontiers in Veterinary Science*, 2016,3.
- Aricò A., Ferraresso S., Bresolin S., Marconato L., Comazzi S., Te Kronnie G., et Aresu L. « Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals chromosomal copy number aberrations associated with clinical outcome in canine diffuse large B-cell lymphoma ». Édité par Enrique Hernandez-Lemus. *PLoS ONE*, 2014,9(11):e111817.
- Bai M., Skyrlas A., Agnantis NJ., Kamina S., Papoudou-Bai A., Kitsoulis P., et Kanavaros P.. « B-cell differentiation, apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas ». *Anticancer research*, 2005, 25:347-52.
- Barbet J., Kraeber-Bodéré F., Vuillez JP., Gautherot E., Rouvier E., et Chatal JF. « Pretargeting with the affinity enhancement system for radioimmunotherapy ». *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 1999,14(3):153-66.
- Bartelds GM. « Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up ». *Journal of American Medical Association*, 2011,305(14):1460.
- Bartholomä MD. « Radioimmunotherapy of solid tumors: approaches on the verge of clinical application ». *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals,* 2018,61(9):715-26.
- Baum RP., Kluge AW., Kulkarni H., Schorr-Neufing U., Niepsch K., Bitterlich N. et van Echteld CJA. « [¹⁷⁷Lu-DOTA]⁰-D-Phe¹-Tyr³-Octreotide (¹⁷⁷Lu-DOTATOC) for peptide receptor radiotherapy in patients with advanced neuroendocrine tumours: a phase-II study ». *Theranostics*, 2016,6(4):501-10.
- Behr T., Becker W., Hannappel E., Goldenberg DM. et Wolf F. « Targeting of liver metastases of colorectal cancer with IgG, F(ab')₂ and Fab' anti-carcinoembryonic antigen antibodies labeled with ^{99m}Tc: the role of metabolism and kinetics ». *Cancer Research*, 1995,55(23):5777s-85s.
- Bergman PJ. et Wolchok JD. « Of mice and men (and dogs): development of a xenogeneic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma ». *Cancer Therapy*, 2008,6:817-26.
- Beygi S., Sadashiv S., Reilly JB., Khan C. et Lister J. « Frontline treatment of diffuse large B-cell lymphoma in elderly: a systematic review of clinical trials in post-rituximab era ». *Leukemia & Lymphoma*, 2018,59(12):2847-61.
- Beykan S., Dam JS., Eberlein U., Kaufmann J., Kjærgaard B., Jødal L., Bouterfa H., Bejot R., Lassmann M. et Borup Jensen S. «¹⁷⁷Lu-OPS201 targeting somatostatin receptors: in vivo biodistribution and dosimetry in a pig model ». *EJNMMI Research* 2016,6(1).
- Blakkisrud J., Holtedahl JE., Løndalen A., Dahle J., Bach-Gansmo T., Holte H., Nygaard S., Kolstad A. et Caroline Stokke C. « Biodistribution and dosimetry results from a phase 1 trial of therapy with the antibody–radionuclide conjugate ¹⁷⁷Lu-lilotomab satetraxetan ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2018,59(4):704-10.
- Bodet-Milin C., Ferrer L., Rauscher A., Masson D., Rbah-Vidal L., Faivre-Chauvet A., Cerato E. et al. « Pharmacokinetics and dosimetry studies for optimization of pretargeted radioimmunotherapy in CEA-expressing advanced lung cancer patients ». Frontiers Medicine (Lausanne), 2015,2(84).

- Bodet-Milin C., Kraeber-Bodéré F., Eugène T., Guérard F., Gaschet J., Bailly C., Mougin M., et al. «Radioimmunotherapy for treatment of acute leukemia». *Seminars in Nuclear Medicine*, 2016,46(2):135-46.
- Bourgeois M., Bailly C., Frindel M., Guerard F., Chérel M., Faivre-Chauvet A., Kraeber-Bodéré F. et Bodet-Milin C. « Radioimmunoconjugates for treating cancer: recent advances and current opportunities ». *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2017,17(7):813-19.
- Bunjes, D. « Rhenium-188-labeled anti-CD66 (a, b, c, e) monoclonal antibody to intensify the conditioning regimen prior to stem cell transplantation for patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome: results of a phase I-II study ». *Blood*, 2001,98(3):565-72.
- Burnet NG., Wurm R., Nyman J. et Peacock JH. « Normal tissue radiosentivity: how important is it ? ». *Clinical Oncology*, 1996,8(1):25-34.
- Burotto M., Berkovits A. et Dunleavy K. « Double hit lymphoma: from biology to therapeutic implications ». *Expert Review of Hematology*, 2016,9(7):669-78.
- Cahan B., Leong L., Wagman L., Yamauchi D., Shibata S., Wilzcynski S., Williams LE., et al. « Phase I/II trial of anticarcinoembryonic antigen radioimmunotherapy, gemcitabine, and hepatic arterial infusion of fluorodeoxyuridine postresection of liver metastasis for colorectal carcinoma ». *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 2017,32(7):258-65.
- Caimi PF., Hill BT., Hsi ED. et Smith MR. « Clinical approach to diffuse large B-cell lymphoma ». *Blood Reviews*, 2016,30(6):477-91.
- Carnahan J., Stein R., Qu Z., Hess K., Cesano A., Hansen HJ. et Goldenberg DM. « Epratuzumab, a CD22targeting recombinant humanized antibody with a different mode of action from rituximab ». *Molecular Immunology*, 2007,44(6):1331-41.
- Castillo JJ., Winer ES. et Olszewski AJ.. « Sites of extranodal involvement are prognostic in patients with diffuse parge B-cell lymphoma in the rituximab era: an analysis of the surveillance, epidemiology and end results database: extranodal DLBCL SEER ». *American Journal of Hematology*, 2014,89(3):310-14.
- Chapuy B., Cheng H., Watahiki A., Ducar MD., Tan Y., Chen L., Roemer MGM., et al. « Diffuse large B-cell lymphoma patient-derived xenograft models capture the molecular and biological heterogeneity of the disease ». *Blood*, 2016,127(18):2203-13.
- Chatal JF., Campion L., Kraeber-Bodéré F., Bardet S., Vuillez JP., Charbonnel B., Rohmer V., et al. « Survival improvement in patients with medullary thyroid carcinoma who undergo pretargeted anti-carcinoembryonic-antigen radioimmunotherapy: a collaborative study with the French Endocrine Tumor Group ». *Journal of Clinical Oncology*, 2006,24(11):1705-11.
- Cheson BD. Et Kostakoglu L. « FDG-PET for early response assessment in lymphomas: Part-2 Diffuse large B-cell lymphoma, use of quantitative PET evaluation ». *Cancer Network*, 2017.
- Cheung MC., Hay AE., Crump M., Imrie KR., Song Y., Hassan S., Risebrough N., et al. « Gemcitabine/dexamethasone/cisplatin vs cytarabine/dexamethasone/cisplatin for relapsed or refractory aggressive-histology lymphoma: cost-utility analysis of NCIC CTG LY.12 ». *Journal of the National Cancer Institute*, 2015,107(7).
- Chevallier P., Eugene T., Robillard N., Isnard F., Nicolini F., Escoffre-Barbe M., Huguet F., et al. « ⁹⁰Y-labelled anti-CD22 epratuzumab tetraxetan in adults with refractory or relapsed CD22-positive

B-cell acute lymphoblastic leukaemia: a phase 1 dose-escalation study ». *The Lancet Haematology*, 2015,2(3): e108-17.

- Chiavassa S. « Développement d'un outil dosimétrique personnalisé pour la radioprotection en contamination interne et la radiothérapie vectorisée en médecine nucléaire ». Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, 2005.
- Choi WWL., Weisenburger DD., Greiner TC., Piris MA., Banham AH., Delabie J., Braziel RM., et al. « A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy ». *Clinical Cancer Research*, 2009,15(17):5494-5502.
- Clark Schneider KM., Banks PM., Collie AMB., Lanigan CP., Manilich E., Durkin LM., Hill BT., et Hsi ED.. « Dual expression of MYC and BCL2 proteins predicts worse outcomes in diffuse large B-cell lymphoma ». *Leukemia & Lymphoma*, 2016,57(7):1640-48.
- Coiffier B. « Treatment paradigms in aggressive non-Hodgkin's lymphoma in elderly patients ». *Clinical Lymphoma*, 2002, Suppl 1:S12-8.
- Coiffier B., Thieblemont C., Van Den Neste E., Lepeu G., Plantier I., Castaigne S., Lefort S., et al. « Longterm outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte ». *Blood*, 2010:116(12):2040-5.
- Collier BD., Abdel-Nadi H., Doerr RJ., Harwood SJ., Olsen J., Kaplan EH., Winzelberg GG., et al. « Immunoscintigraphy performed with ¹¹¹In-labeled CYT-103 in the management of colorectal cancer: comparison with CT ». *Radiology*, 1992,185:179-86.
- Cordier D., Forrer F., Kneifel S., Sailer M., Mariani L., Mäcke H., Müller-Brand J., et Merlo A.. « neoadjuvant targeting of glioblastoma multiforme with radiolabeled DOTAGA-substance P results from a phase I study ». *Journal of Neuro-Oncology*, 2010,100(1):129-36.
- Cuenca X., Xhaard A. et Mounier N. « Facteurs pronostiques dans les lymphomes non hodgkiniens et les lymphomes de Hodgkin ». *Bulletin du Cancer*, 2009,96(4):461-73.
- Curran KM., Schaffer PA., Frank CB., Lana SE., Hamil LE., Burton JH., Labadie J., Ehrhart EJ. et P. R. Avery PR. « BCL2 and MYC are expressed at high levels in canine diffuse large B-cell lymphoma but are not predictive for outcome in dogs treated with CHOP chemotherapy: MYC and BCL2 in canine lymphoma ». *Veterinary and Comparative Oncology*, 2017,15(4):1269-79.
- Dalm SU., Nonnekens J., Doeswijk GN., de Blois E., van Gent DC., Konijnenberg MW. et de Jong M. « Comparison of the therapeutic response to treatment with a ¹⁷⁷Lu-labeled somatostatin receptor agonist and antagonist in preclinical models ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2016,57(2):260-65.
- DeNardo GL., Schlom J., Buchsbaum DJ., Meredith RF., O'Donoghue JA., Sgouros G., Humm JL., et DeNardo SJ. « Rationales, evidence, and design considerations for fractionated radioimmunotherapy ». *Cancer*, 2002,94(S4):1332-48.
- Devaraj NK., Upadhyay R., Haun JB., Hilderbrand SA. et Weissleder R. « Fast and sensitive pretargeted labeling of cancer cells through a tetrazine/ *trans*-cyclooctene cycloaddition ». *Angewandte Chemie International Edition*, 2009,48(38):7013-16.
- Diab M., Nguyen F., Berthaud M., Maurel C., Gaschet J., Verger E., Ibisch C., et al. « Production and characterization of monoclonal antibodies specific for canine CD138 (Syndecan-1) for nuclear

medicine preclinical trials on spontaneous tumours: monoclonal antibodies specific for canine CD138 ». *Veterinary and Comparative Oncology*, 2017,15(3):932-51.

- Diehl KH., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal JM. et Van De Vorstenbosch C.. « A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes ». *Journal of Applied Toxicology*, 2001,21(1):15-23.
- Dispenzieri A., D'Souza A., Gertz MA., Laumann K., Wiseman G., Lacy MQ., LaPlant B., et al. « A phase 1 trial of ⁹⁰Y-Zevalin radioimmunotherapy with autologous stem cell transplant for multiple myeloma ». *Bone Marrow Transplantation*, 2017,52(10):1372-77.
- Divgi CR., Mcdermott K., Johnson DK., Schnobrich KE., Finn RD. et Cohen AM. « Detection of hepatic metastases from colorectal carcinoma using indium-111 (¹¹¹In) labeled monoclonal antibody (mAb): MSKCC experience with mAb ¹¹¹In-C110». *Nuclear Medicine and Biology*, 1991,18(7):705-10.
- Du X., Beers R., FitzGerald DJ. et I. Pastan I. « Differential cellular internalization of anti-CD19 and -CD22 immunotoxins results in different cytotoxic activity ». *Cancer Research*, 2008,68(15):6300-6305.
- Dunleavy K. « Aggressive B-cell lymphoma: optimal therapy for MYC-positive, double-hit, and triplehit DLBCL ». *Current Treatment Options in Oncology*, 2015,16(58).
- Ellis RJ., Kim E. et Foor R. « Role of ProstaScint for brachytherapy in localized prostate adenocarcinoma ». *Expert Review of Molecular Diagnosis*, 2004,4(4):435-41.
- Emami B., Lyman J., Brown A., Cola L., Goitein M., Munzenrider JE., Shank B., Solin LJ., et Wesson M.. «Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation». *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 1991,21(1):109-22.
- Erb DA., et Nabi HA. « Clinical and technical considerations for imaging colorectal cancers with technetium-99m-labeled anti-CEA Fab' fragment ». *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 2000,28(1):12-18.
- Eskian M., Khorasanizadeh M., Kraeber-Bodéré F. et Nima Rezaei N. « Radioimmunotherapy in non-Hodgkin lymphoma: prediction and assessment of response ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2016,107:182-89.
- Eskian M., Khorasanizadeh M., Zinzani PL. et Rezaei N. « Radioimmunotherapy as the first line of treatment in non-Hodgkin lymphoma ». *Immunotherapy*, 2018,10(8):699-711.
- Ettlin J., Clementi E., Amini P., Malbon A. et Markkanen E.. « Analysis of gene expression signatures in cancer-associated stroma from canine mammary tumours reveals molecular homology to human breast carcinomas ». *International Journal of Molecular Sciences*, 2017,18(5):1101.
- Fourel J. « Pronostic du lymphome B diffus à grandes cellules chez le chien ». Thèse vétérinaire, Nantes, 2013, 360 p.
- Fraker PJ. et Speck JC. « Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril ». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1978,80(4):849-57.
- Freise AC. et Wu AM. « *In vivo* imaging with antibodies and engineered fragments ». *Molecular Immunology*, 2015,67(2):142-52.

- Friedberg JW., Unger JM., Burack WR., Gopal AK., Raju RN., Nademanee AP., Kaminski MS., et al. « R-CHOP with iodine-131 tositumomab consolidation for advanced stage diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): SWOG S0433 ». *British Journal of Haematology*, 2014,166(3):382-89.
- Fronton L., Pilari S. et Huisinga W.. « Monoclonal antibody disposition: a simplified PBPK model and its implications for the derivation and interpretation of classical compartment models ». *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 2014,41(2):87-107.
- Fu R., Carroll L., Yahioglu G., Aboagye E. et Philip Miller P. « Antibody fragment and affibody immunoPET imaging agents: radiolabelling strategies and applications ». *ChemMedChem*, 2018,23.
- Galibert F. et André C. « Le chien et son génome ». *Médecine/Sciences*, 2006,22(10):806-8.
- Gama A., Alves A. et Schmitt F. « Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification ». *Virchows Archiv*, 2008,453(2):123-32.
- Geissler F., Anderson SK., Venkatesan P. et Press O. « Intracellular catabolism of radiola beled anti-/t antibodies by malignant B-cells ». *Cancer Research*, 1992,52:2907-15.
- Gillard M., Cadieu E., De Brito C., Abadie J., Vergier B., Devauchelle P., Degorce F., et al. « Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas ». *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2014,27(1):90-102.
- Gisselbrecht C., Glass B., Mounier N., Singh Gill D., Linch DC., Trneny M., Bosly A., et al. « Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era ». *Journal of Clinical Oncology*, 2010,28(27):4184-90.
- Gisselbrecht C., Schmitz N., Mounier N., Singh Gill D., Linch DC., Trneny M., Bosly A., et al. « Rituximab maintenance therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with relapsed CD20 + diffuse large B-cell lymphoma: final analysis of the collaborative trial in relapsed aggressive lymphoma ». *Journal of Clinical Oncology*, 2012,30(36):4462-69.
- Go H., Kyung Jeon Y., Huh J., Jin Choi S., Choi YD., Jeong Cha H., Kim HJ., Park G., Min S., et Eun Kim J. « Frequent detection of *BRAF*^{V600E} Mutations in histiocytic and dendritic cell neoplasms ». *Histopathology*, 2014,65(2):261-72.
- Goldenberg DM., DeLand F., Kim E., Bennett S., Primus FJ., van Nagell JR., Estes N., et al. « Use of radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning ». *The New England Journal of Medicine*, 1978,298(25):1384-88.
- Goldenberg DM., Horowitz JA., Sharkey RM., Hall TC., Murthy S., Goldenberg H., Lee RE., Stein R., Siegel JA. et Izon DO. « Targeting, dosimetry, and radioimmunotherapy of B-cell lymphomas with iodine-131-labeled LL2 monoclonal antibody ». *Journal of Clinical Oncology*, 1991,9(4):548-64.
- Goldenberg DM., Preston DF., Primus FJ. et Hansen HJ. « Photoscan localization of GW-39 tumors in hamsters using radiolabeled anticarcinoembryonic antigen immunoglobulin G ». *Cancer Research*, 1974,34:1-9.
- Goldschmidt MH. et Hendrick MJ. « Tumors of the skin and soft tissues ». In *Tumors in Domestic Animals*, édité par Donald J. Meuten, 45-117. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 2008.

- Green DJ. et Press OW. «Whither radioimmunotherapy: to be or not to be?» *Cancer Research*, 2017,77(9):2191-96.
- Green LL., Hardy MC., Maynard-Curie CE., Tsuda H., Louie DM., Mendez MJ., Abderrahim H., et al. «Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs ». *Nature Genetics*, 1994,7:13-21.
- Green TM., Young KH., Visco C., Xu-Monette ZY., Orazi A., Go RS., Nielsen O., et al. « Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone ». *Journal of Clinical Oncolog,y* 2012,30(28):3460-67.
- Griffiths GL., Govindan SV., Sharkey RM., Fisher DR. et Goldenberg DM. « ⁹⁰Y-DOTA-hLL2: an agent for radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2003,44(1):77-84.
- Grosenbaugh DA., Leard AT., Bergman PJ., Klein MK., Meleo K., Susaneck S., Hess PR., et al. « Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor ». *American Journal of Veterinary Research*, 2011,72(12):1631-38.
- Gudkov S., Shilyagina N., Vodeneev V. et Zvyagin A. « Targeted radionuclide therapy of human tumors ». *International Journal of Molecular Sciences*, 2015,17(1).
- Haffty BG., Yang Q., Reiss M., Kearney T., Higgins SA., Weidhaas J., Harris L., Hait W. et Toppmeyer D. « Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative earlystage breast cancer ». *Journal of Clinical Oncology*, 2006,24(36):5652-57.
- Hamlin PA., Alma Rodriguez M., Noy A., Portlock CS., Straus D., McLaughlin P., Pro B., et al. « Final results of a phase II study of sequential R-CHOP and yttrium-90-ibritumomab tiuxetan (RIT) for elderly high risk patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) ». *Blood*, 2010,116:1793.
- Hang HC., Yu C., Kato DL., Bertozzi CR. « A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2003:100(25):14846-51.
- Hans CP. « Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray ». *Blood*, 2004,103(1):275-82.
- Hansen AE., Mcevoy F., Engelholm SA., Law I. et Kristensen AT.. « FDG PET/CT imaging in canine cancer patients: FDG PET/CT in canine cancer patients ». *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 2011,52(2):201-6.
- Hedan B., Thomas R., Motsinger-Reif A., Abadie J., André C., Cullen J. et Breen M. « Molecular cytogenetic characterization of canine histiocytic sarcoma: a spontaneous model for human histiocytic cancer identifies deletion of tumor suppressor genes and highlights influence of genetic background on tumor behavior ». *BMC Cancer*, 2011,11(1).
- Hernandez B., Adissu H., Wei BR., Michael H., Merlino G. et Simpson R. « Naturally occurring canine melanoma as a predictive comparative oncology model for human mucosal and other triple wild-type melanomas ». *International Journal of Molecular Sciences*, 2018,19(2).

- Herrera L. Farah RA., Pellegrini VA., Aquino DB., Sandler ES., Buchanan GR. Et Vitetta ES. « Immunotoxins against CD19 and CD22 are effective in killing precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells in vitro ». *Leukemia*, 2000,14(5):853-58.
- Hindorf C., Glatting G., Chiesa C., Lindén O., et Flux G. « EANM dosimetry committee guidelines for bone marrow and whole-body dosimetry ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2010,37(6):1238-50.
- Hohloch K., Lankeit HK., Zinzani PL., C. Scholz CW., Lorsbach M., Windemuth-Kieselbach C. et Trümper L.. « Radioimmunotherapy for first-line and relapse treatment of aggressive B-cell non-hodgkin lymphoma: an analysis of 215 patients registered in the international RIT-network ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2014,41(8):1585-92.
- Holliger P. et Hudson PJ. « Engineered antibody fragments and the rise of single domains ». *Nature Biotechnology*, 2005,23(9):1126-36.
- Hutton BF. « The origins of SPECT and SPECT/CT ». European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2014,41(S1):3-16.
- Illidge TM., Bayne M., Brown NS., Chilton S., Cragg MS., Glennie MJ., Du Y., et al. « Phase 1/2 study of fractionated ¹³¹I-rituximab in low-grade B-cell lymphoma: the effect of prior rituximab dosing and tumor burden on subsequent radioimmunotherapy ». *Blood*, 2008,113(7):1412-21.
- Illidge TM., Mayes S., Pettengell R., Bates AT., Bayne M., Radford JA., Ryder WD. et al. « Fractionated 90Y-ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy as an initial therapy of follicular lymphoma: an international phase II study in patients requiring treatment according to GELF/BNLI criteria ». *Journal of Clinical Oncology*, 2014:32(3):212-8.
- Jain NC. « The hematopoietic system ». In Schalm's Veterinary Hematology, 1986, 4^{ème} édition, pp 350-387. Lea and Febiger, Philadelphia, PA.
- Jo VY. et Fletcher CDM. « WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition ». *Pathology*, 2014,46(2):95-104.
- John B., Herrin BR., Raman C., Wang YN., Bobbitt KR., Brody BA. et Justement LB. « The B-cell coreceptor CD22 associates with AP50, a clathrin-coated pit adapter protein, via tyrosine-dependent interaction ». *The Journal of Immunology*, 2003,170(7):3534-43.
- Johnson NA., Savage KJ., Ludkovski O., Ben-Neriah S., Woods R., Steidl C., Dyer MJS., et al. « Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival ». *Blood*, 2009,114(11):2273-79.
- Jones PT., Dear PH., Foote J., Neuberger MS. et Winter G. « Replacing the complementaritydetermining regions in a human antibody with those from a mouse ». *Nature*, 1986,321:522-25.
- Jung J., Sook Seol H. et Chang S. « The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research ». *Cancer Research and Treatment*, 2018,50(1):1-10.
- Jurcic JG., Larson SM., Sgouros G., McDevitt MR., Finn RD., Divgi CR., Ballangrud AM., et al. « Targeted _ particle immunotherapy for myeloid leukemia ». *Blood*, 2002,100(4):1233-39.
- Jurcic JG., Rosenblat TL., McDevitt MR., Pandit-Taskar N., Carrasquillo JA., Chanel SM., Ryan C., et al. « Phase I trial of the targeted alpha-particle nano-generator actinium-225 (²²⁵Ac-lintuzumab)
(anti-CD33; HuM195) in acute myeloid leukemia (AML) ». *Journal of Clinical Oncology*, 2011,29(15):6516s.

- Jurczak W., Kisiel E., Sawczuk-Chabin J., Centkowski P., Knopińska-Posłuszny W., et Khan O. « The use of yttrium-90 ibritumomab tiuxetan (⁹⁰Y-IT) as a consolidation therapy in high-risk patients with diffuse large B-cell lymphoma ineligible for autologous stem-cell transplantation ». *Contemporary Oncology*, 2015,19(1):43-47.
- Juweid ME., Hajjar G., Sharkey RM., Suleiman S., Luger S., Swayne C., Alavi A. et Goldenberg DM. « Pharmacokinetics, dosimetry, and initial therapeutic results with ¹³¹I- and ^{III}In-/⁹⁰Y- humanized LL2 anti-CD22 monoclonal antibody in patients with relapsed, refractory non-Hodgkin's lymphoma¹». *Clinical Cancer Research*, 1999,5:3292s-3303s.
- Juweid ME., Sharkey RM., Markowitz A., Behr T., Swayne LC., Dunn R., Hansen HJ., et al. « Treatment of non-Hodgkin's lymphoma with radiolabeled murine, chimeric, or humanized LL2, an anti-CD22 monoclonal antibody¹ ». *Cancer Research*, 1995,55:5899s-5907s.
- Kaminski MS., Zasadny KR., Francis IR., Milik AW., Ross CW., Moon SD., Crawford SM., et al. «Radioimmunotherapy of B-cell lymphoma with ¹³¹I-anti-B1 (anti-CD20) antibody ». *New England Journal of Medicine*, 1993,329(7):459-65.
- Karmali R., Kassar M., Venugopal P.,. Shammo JM., Fung HC., Bayer R., O'Brien T. et. Gregory SA.. « Safety and efficacy of combination therapy with fludarabine, mitoxantrone, and rituximab followed by yttrium-90 ibritumomab tiuxetan and maintenance rituximab as front-line therapy for patients with follicular or marginal zone lymphoma ». *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 2011,11(6):467-74.
- Karmali R., Larson ML., Shammo JM., Gregory SA., O'Brien T. et Venugopal P. « Phase 2 study of CHOP-R-14 followed by ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma ». *Molecular and Clinical Oncology*, 2017,6(4):627-33.
- Kennedy K., Thomas R. et Breen M.. « Canine histiocytic malignancies—challenges and opportunities ». *Veterinary Sciences*, 2016,3(1).
- Khanna C., Fan TM., Gorlick R., Helman LJ.,. Kleinerman ES., Adamson PC., Houghton PJ., et al. «Toward a drug development path that targets metastatic progression in osteosarcoma». *Clinical Cancer Research*, 2014,20(16):4200-4209.
- Khanna C., Chand, Wan X., Bose S., Cassaday R., Olomu O., Mendoza A., Yeung C., Gorlick R., Hewitt SM. et Helman LJ. « The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis ». *Nature Medicine*, 2004,10(2):182-86.
- Kim NH., Lim HY., Im KS., Kim JH., et Sur JH. « Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers ». *Journal of Comparative Pathology*, 2013,148(4):298-306.
- Knox SJ., Goris ML., Trisler K., Negrin R., Davis T., Liles TM., Grillo-Lopez A., et al. « Yttrium-90-labeled anti-CD20 monoclonal antibody therapy of recurrent B-cell lymphoma ». *Clinical Cancer Research*, 1996,2:457-70.
- Köhler G. et Milstein C. « Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion ». *European Journal of Immunology*, 1976,6(7):511-19.

- Kordes M., Röring M., Heining C., Braun S., Hutter B., Richter D., Geörg C., et al. « Cooperation of BRAFF595L and mutant HRAS in histiocytic sarcoma provides new insights into oncogenic BRAF signaling ». *Leukemia*, 2016,30(4):937-46.
- Kraeber-Bodéré F., Bardet S. et Hoefnagel CA. « Radioimmunotherapy in medullary thyroid cancer using bispecific antibody and iodine-131-labeled bivalent hapten: preliminary results of a phase I/II clinical trial ». *Clinical Cancer Research*, 1999,5:3190s-98s.
- Kraeber-Bodere F., Pallardy A., Maisonneuve H., Campion L., Moreau A., Soubeyran I., Le Gouill S., et al. « Consolidation anti-CD22 fractionated radioimmunotherapy with ⁹⁰Y-epratuzumab tetraxetan following R-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a prospective, single group, phase 2 trial ». *The Lancet Haematology*, 2017,4(1):e35-45.
- Kraeber-Bodéré F., Rousseau C., Bodet-Milin C., Ferrer L., Faivre-Chauvet A., Campion L., Vuillez JP., et al. « Targeting, toxicity, and efficacy of 2-step, pretargeted radioimmunotherapy using a chimeric bispecific antibody and 1311-labeled bivalent hapten in a phase I optimization clinical trial ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2006,47(2):247-55.
- Kraeber-Bodéré F., Rousseau C., Bodet-Milin C., Mathieu C., Guérard F., Frampas E., Carlier T., et al. « Tumor immunotargeting using innovative radionuclides ». *International Journal of Molecular Sciences*, 2015,16(2):3932-54.
- Kramer K., Pandit-Taskar N., Humm JL., Zanzonico PB., Haque S., Dunkel IJ., Wolden SL., et al. « A phase II study of radioimmunotherapy with intraventricular ¹³¹I-3F8 for medulloblastoma ». *Pediatric Blood & Cancer*, 2018,65(1):e26754.
- Kratochwil C., Bruchertseifer F., Giesel F., Apostolidis C., Haberkorn U. et Morgenstern A. « Actinium-225-DOTATOC, an empiric dose finding for alpha particle emitter based radionuclide therapy of neuroendocrine tumors ». Journal of Nuclear Medicine, 2015,56(3).
- Kratochwil C., Giesel FL., Bruchertseifer F., Mier W., Apostolidis C., Boll R., Murphy K., Haberkorn U. et Morgenstern A.. «²¹³Bi-DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2014,41(11):2106-19.
- Krolicki L., Bruchertseifer F., Kunikowska J., Koziara H., Królicki B., Jakuciński M., Pawlak D., et al. « Targeted alpha therapy of glioblastoma multiforme: clinical experience with ²¹³Bi- and ²²⁵Ac-Susbtance P ». In *Proceedings of the 10th International Symposium on targeted alpha therapy*. Kanazawa, Japan, 30 May – 1 June 2017, 24P.
- Krolicki L., Bruchertseifer F., Kunikowska J., Koziara H., Królicki B., Jakuciński M., Pawlak D., et al. « Prolonged survival in secondary glioblastoma following local injection of targeted alpha therapy with ²¹³Bi-substance P analogue ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2018,45(9):1636-44.
- Lanore D. et Delprat C. « Chimiothérapie anticancéreuse ». *Abrégés vétérinaires*, Elsevier / Masson, 2002, 176p.
- Lapa C., Herrmann K., Schirbel A., Hänscheid H., Lückerath K., Schottelius M., Kircher M., et al. « CXCR4-directed endoradiotherapy induces high response rates in extramedullary relapsed multiple myeloma ». *Theranostics*, 2017,7(6):1589-97.

- Larson SM., Carrasquillo JA., Cheung NKV. et Press OW. « Radioimmunotherapy of human tumours ». *Nature Reviews Cancer*, 2015,15(6):347-60.
- Lauter A., Strumpf A., Platzbecker U., Schetelig J., Wermke M., Radke J., Kiani A., et al. « ¹⁸⁸Re-anti-CD66 radioimmunotherapy combined with reduced-intensity conditioning and *in-vivo* T-cell depletion in elderly patients undergoing allogeneic haematopoietic cell transplantation ». *British Journal of Haematology*, 2010,148(6):910-17.
- Lawrence J., Vanderhoek M., Barbee D., Jeraj R., Tumas DB. et Vail DM.. «Use of 3'-deoxy-3'-[¹⁸ F]fluorothymidine PET/CT for evaluating response to cytotoxic chemotherapy in dogs with non-Hodgkin's lymphoma ». *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 2009,50(6):660-68.
- LeBlanc AK., Jakoby BW., Townsend DW. Et Daniel GB. « ¹⁸FDG-PET imaging in canine lymphoma and cutaneous mast cell tumor ». *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 2009,50(2):215-23.
- Lee KH., Park HM., Son KH., Shin TJ. et Cho JY. « Transcriptome signatures of canine mammary gland tumors and its comparison to human breast cancers ». *Cancers*, 2019,10(9).
- Lee MS., Lee AR., Jung MA., Lee IH., Choi JH., Chung HW., Jeong SW. Et al. « Characterization of physiologic ¹⁸F-FDG uptake with PET-CT in dogs ». *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 2010,51(6):670-73.
- Lesley J., Schulte R. et Woods J. « Modulation of transferrin receptor expression and function by antitransferrin receptor antibodies and antibody fragments ». *Experimental Cell Research*, 1989,182(1):215-33.
- Lindblad-Toh K., Wade CM., Mikkelsen TS., Karlsson EK., Jaffe DB., Kamal M., et al. « Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog ». *Nature*, 2005,438(7069):803-19.
- Linden O. « Dose-fractionated radioimmunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma using DOTAconjugated, ⁹⁰Y-radiolabeled, humanized anti-CD22 monoclonal antibody, epratuzumab ». *Clinical Cancer Research*, 2005,11(1)4:5215-22.
- Lindmo T. Boven E., Cuttitta F., Fedorko J. et Bunn PA. « Determination fo the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess ». *Journal of Immunological Methods*, 1984,72(1):77-89.
- Liu Q., Tomaszewicz K., Hutchinson L., Hornick JL., Woda B. et Yu H. « Somatic mutations in histiocytic sarcoma identified by next generation sequencing ». *Virchows Archiv*, 2016,469(2):233-41.
- Ljungberg M., Celler A., Konijnenberg MW., Eckerman KF., Dewaraja YK. et Sjogreen-Gleisner K. « MIRD pamphlet No. 26: joint EANM/MIRD guidelines for quantitative ¹⁷⁷Lu-SPECT applied for dosimetry of radiopharmaceutical therapy ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2016,57(1):151-62.
- Löfblom J., Feldwisch J., Tolmachev V., Carlsson J., Ståhl S., et Frejd FY.. « Affibody molecules: engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications ». *FEBS Letters*, 2010,584(12):2670-80.
- Lonberg N., Taylor LD., Harding FA., Trounstine M., Higgins KM., Schramm SR., Kuo CC., et al. « Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications ». *Nature*, 1994,368:856-59.

- López-Guillermo A., Colomo L., Jiménez M., Bosch F., Villamor N., Arenillas L., Muntañola A., et al. « Diffuse large B-Cell lymphoma: clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin ». *Journal of Clinical Oncology*, 2005,23(1)2:2797-2804.
- Maekawa N., Konnai S., Takagi S., Kagawa Y., Okagawa T., Nishimori A., Ikebuchi R., et al. « A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma ». *Scientific Reports*, 2017,7.
- Martins CD., Kramer-Marek G., et Oyen WJG. « Radioimmunotherapy for delivery of cytotoxic radioisotopes: current status and challenges ». *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2018,15(2):185-96.
- Mattes MJ., Shih LB.,. Govindan SV., Sharkey RM., Lin Ong G., Xuan H. et Goldenberg DM. « The advantage of residualizing radiolabels for targeting B-cell lymphomas with a radiolabeled anti-CD22 monoclonal antibody ». *International Journal of Cancer*, 1997,71(3):429-35.
- Maurer MJ., Jais JP., Ghesquières H., Witzig TE., Hong F., Haioun C., Thompson CA., et al. « Personalized risk prediction for event-free survival at 24 months in patients with diffuse large B-cell lymphoma: IPI24 for DLBCL ». *American Journal of Hematology*, 2016,91(2):179-84.
- Mawad R., Gooley TA., Rajendran JG., Fisher DR., Gopal AK., Shields AT., Sandmaier BM., et al. «Radiolabeled anti-CD45 antibody with reduced-intensity conditioning and allogeneic transplantation for younger patients with advanced acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome ». *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2014,20(9):1363-68.
- McBride WJ., Zanzonico P., Sharkey RM., Noren C., Karacay H., Rossi EA., Losman MJ., et al. « Bispecific antibody pretargeting PET (immuno-PET) with an ¹²⁴I-labeled hapten-peptide ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2006,47(10):1678-88.
- McCafferty J., Griffiths AD., Winter G. et Chiswell DJ. « Phage antibodies: filamentous phage display antibody variable domains ». *Nature*, 1990,348:552-54.
- Meredith RF., Torgue JJ., Rozgaja TA., Banaga EP., Bunch PW., Alvarez RD., Straughn JM., Dobelbower MC. et Lowy AM.. « Safety and outcome measures of first-in-human intraperitoneal α radioimmunotherapy with ²¹²Pb-TCMC-trastuzumab ». *American Journal of Clinical Oncology*, 2018,41(7):716-21.
- Mesguich C., Zanotti-Fregonara P., Hindié E. « New Perspectives Offered by Nuclear Medicine for the Imaging and Therapy of Multiple Myeloma ». *Theranostics*, 2016:6(2):287-90.
- Meyer PN., Kai Fu K., Greiner TC., Smith LM., Delabie J., Gascoyne RD., Ott G., et al. « Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab ». *Journal of Clinical Oncology*, 2011,29(2):200-207.
- Mier W., Kratochwil C., Hassel JC., Giesel FL., Beijer B., Babich JW., Friebe M., Eisenhut M., Enk A., et Haberkorn U.. « Radiopharmaceutical therapy of patients with metastasized melanoma with the melanin-binding benzamide ¹³¹I-BA52 ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2014,55(1):9-14.
- Milano MT., Constine LS. et Okunieff P.. « Normal tissue tolerance dose metrics for radiation therapy of major organs ». *Seminars in Radiation Oncology*, 2007,17(2):131-40.

- Milenic DE., Brady ED. et Brechbiel MW. « Antibody-targeted radiation cancer therapy ». *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004,3(6):488-99.
- Millanta F., Asproni P., Cancedda S., Vignoli M., Bacci B. et Poli A. « Immunohistochemical expression of COX-2, MPGES and EP2 receptor in normal and reactive canine bone and in canine osteosarcoma ». *Journal of Comparative Pathology*, 2012,147(2-3):153-60.
- Miller TP., Dahlberg S., Cassady JR., Adelstein DJ., Spier CM., Grogan TM., LeBlanc M., Carlin S., Chase E. et Fisher RI. « Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphoma ». *New England Journal of Medicine*, 1998,339(1):21-26.
- Minamimoto R., Fayad L., Advani R., Vose J., Macapinlac H., Meza J., Hankins J., Mottaghy F., Juweid M. et Quon A. « Diffuse large b-cell lymphoma: prospective multicenter comparison of early interim FLT PET/CT versus FDG PET/CT with IHP, EORTC, Deauville, and PERCIST criteria for Eearly therapeutic monitoring ». *Radiology*, 2016,280(1):220-29.
- Mojtahedi A., Thamake S., Tworowska I., Ranganathan D., et Delpassand ES. « Thev of ⁶⁸Ga-DOTATATE PET/CT in diagnosis and management of neuroendocrine tumors compared to current FDA approved imaging modalities: a review of literature *». American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2014,4(5):426-34.
- Molina TJ. « Physiopathologie des lymphomes diffus à grandes cellules B ». *Hématologie*, 2009,15(3):214–222.
- Morello E., Martano M. et Buracco P. « Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma ». *The Veterinary Journal*, 2011,189(3):268-77.
- Morris MJ. « Pilot trial of unlabeled and indium-111-labeled anti-prostate-specific membrane antigen antibody J591 for castrate metastatic prostate cancer ». *Clinical Cancer Research*, 2005,11(20): 7454-61.
- Morris MA., Lopez-Curto JA., Hughes SPF., An KN., Bassingthwaighte JB. et Kelly PJ. « Fluid spaces in canine bone and marrow ». *Microvascular Research*, 1982,23(2):188-200.
- Morrison SL., Johnson MJ., Herzenberg LA., et Oi VT. « Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. » *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984,81(21):6851-55.
- Morschhauser F., Kraeber-Bodéré F., Wegener WA., Harousseau JL., Petillon MO., Huglo D., Trümper LH., et al. « High rates of durable responses with anti-CD22 fractionated radioimmunotherapy: results of a multicenter, phase I/II study in non-Hodgkin's lymphoma ». *Journal of Clinical Oncology*, 2010,28(23):3709-16.
- Morschhauser F., Radford J., Van Hoof A., Vitolo U., Soubeyran P., Tilly H., Huijgens PC., et al. « Phase III trial of consolidation therapy with yttrium-90–ibritumomab tiuxetan compared with no additional therapy after first remission in advanced follicular lymphoma ». *Journal of Clinical Oncology*, 2008,26(32):5156-64.
- Morschhauser F., Franck, Radford J., Van Hoof A., Botto B., Rohatiner AZS., Salles G., Soubeyran P., et al. « ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan consolidation of first remission in advanced-stage follicular non-Hodgkin lymphoma: updated results after a median follow-up of 7.3 years from the

international, randomized, Phase III first-line indolent trial ». *Journal of Clinical Oncology*, 2013,31(16):1977-83.

- Morschhauser F., Dekyndt B., Baillet C., Barthélémy C., Malek E., Fulcrand J., Bigot P. et al. « A new pharmacokinetic model for ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan based on 3-dimensional dosimetry ». *Scientific Reports.*, 2018:8(1):14860.
- Mortimer JE., Bading JR., Colcher DM., Conti PS., Frankel PH., Carroll MI., Tong S., et al. « Functional imaging of human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer using ⁶⁴Cu-DOTA-trastuzumab PET ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2014,55(1):23-29.
- Mulford DA., Scheinberg DA. et Jurcic JG. « The promise of targeted α -particle therapy ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2005,46(1):199s-204s.
- Muylle K., Flamen P., Vugts DJ., Guiot T., Ghanem G., Meuleman N., Bourgeois P., et al. « Tumour targeting and radiation dose of radioimmunotherapy with ⁹⁰Y-rituximab in CD20+ B-cell lymphoma as predicted by ⁸⁹Zr-rituximab immuno-PET: impact of preloading with unlabelled rituximab ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2015,42(8):1304-14.
- Naruki Y., Carrasquillo JA., Reynolds JC., Maloney JM., Neumann RD. Et Larson SM. « Differential cellular catabolism of ¹¹¹In, ⁹⁰Y and ¹²⁵I radiolabeled T101 anti-CD5 monoclonal antibody ». *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B, Nuclear Medicine and Biology*, 1990,17(2):201-07.
- Nguyen F., Fourel J., Moreau A., Abadie J., et al. « Canine diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) as a spontaneous animal model for preclinical studies ». *12th ICML International Conference on Malignant Lymphoma*. Lugano, Suisse, 18-22 juin 2013. *Hematology and Oncology*, 2013,31(Suppl.1):262.
- Nguyen F., Moreau A., Fourel J., Lemarie F., et al. « Dogs and cats as a spontaneous animal models of human diffuse large B-cell lymphoma». *13th ICML International Conference on Malignant Lymphoma*. Lugano, Suisse, 17-20 juin 2015. *Hematology and Oncology*, 2015,33:252.
- Nguyen F., Peña L., Ibisch C., Loussouarn D., Gama A., Rieder N., Belousov A., Campone M. et Abadie J. « Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors ». *Breast Cancer Research and Treatment*, 2018,167(3):635-48.
- Nicolas GP., Morgenstern A., Schottelius M. et Fani M. « New developments in peptide receptor radionuclide therapy ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2018, jnumed. 118.213496.
- Nicolas GP., Mansi R., McDougall L., Kaufmann J., Bouterfa H., Wild D. et Fani M. « Biodistribution, pharmacokinetics, and dosimetry of ¹⁷⁷Lu-, ⁹⁰Y-, and ¹¹¹In-labeled somatostatin receptor antagonist OPS201 in comparison to the agonist ¹⁷⁷Lu-DOTATATE: the mass effect ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2017,58(9):1435-41.
- Norain A. et Dadachova E.. « Targeted radionuclide therapy of melanoma ». *Seminars in Nuclear Medicine*, 2016,46(3):250-59.
- O'Reilly MK., Tian H., et Paulson JC. « CD22 is a recycling receptor that can shuttle cargo between the cell surface and endosomal compartments of B cells ». *The Journal of Immunology*, 2011,186(3):1554-63.

- Oken MM., Creech RH., Tormey DC., Horton J., Davis TE., McFadden ET. et Carbone PP. « Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group ». *American Journal of Clinical Oncology*, 1982,5(6):649-55.
- Olafsen T. et Wu AM. «Antibody vectors for imaging». *Seminars in Nuclear Medicine*, 2010,40(3):167-81.
- Ortega C. « Ingénierie de fragments d'anticorps pour l'imagerie in vivo de cancers de la sphère génitale ». Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud, Paris XI, 2012.
- Ostrander EA., Dreger DL., et Evans JM. « Canine cancer genomics: lessons for canine and human health ». *Annual Review of Animal Biosciences*, 2018.
- Ostrander EA.. « Both ends of the leash The human links to good dogs with bad genes ». *New England Journal of Medicine*, 2012,367(7):636-46.
- Padilla L., Lee C., Milner R., Shahlaee A., et Bolch WE. « Canine anatomic phantom for preclinical dosimetry in internal emitter therapy ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2008,49(3):446-52.
- Pagel JM. « ¹³¹I-anti-CD45 antibody plus busulfan and cyclophosphamide before allogeneic hematopoietic cell transplantation for treatment of acute myeloid leukemia in first remission ». *Blood*, 2006,107(5):2184-91.
- Pagel JM., Gooley TA., Rajendran J., Fisher DR., Wilson WA., Sandmaier BM., Matthews DC., et al. « Allogeneic hematopoietic cell transplantation after conditioning with ¹³¹I-anti-CD45 antibody plus fludarabine and low-dose total body irradiation for elderly patients with advanced acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome ». *Blood*, 2009,114(27):5444-53.
- Paoloni M. et Khanna C. « Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans ». *Nature Reviews Cancer*, 2008,8(2):147-56.
- Paoloni M., Webb C., Mazcko C., Cherba D., Hendricks W., Lana S., Ehrhart EJ., et al. « Prospective molecular profiling of canine cancers provides a clinically relevant comparative model for evaluating personalized medicine (PMed) trials ». *PLoS ONE*, 2014,9(3):e90028.
- Pfreundschuh M., Kuhnt E., Trümper L., s Österborg A., Trneny M., Shepherd L., Gill DS., et al. « CHOPlike chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group ». *The Lancet Oncology*, 2011,12(1):1013-22.
- Pileri SA., Grogan TM., Harris NL., Banks P., Campo E., Chan JK., Favera RD., et al. «Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases ». *Histopathology*, 2002,41(1):1-29.
- Polig E. et Jee WSS. « Bone structural parameters, dosimetry, and relative radiation risk in the beagle skeleton ». *Radiation Research*, 1989,120(1):83.
- Ponce F., Marchal T., Magnol JP., Turinelli V., Ledieu D., Bonnefont C., Pastor M., Delignette ML. et Fournel-Fleury C. « A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in france with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology ». *Veterinary Pathology*, 2010,47(3):414-33.
- Press OW., Eary JF., Badger CC., Martin PJ., Appelbaum FR., Levy R., Miller R., Brown S., Nelp WB. et Krohn KA.. « Treatment of refractory non-Hodgkin's lymphoma with radiolabeled MB-1 (anti-CD37) antibody. » *Journal of Clinical Oncology*, 1989,7(8):1027-38.

- Press OW., Eary JF., Applebaum FR., Martin PJ., Badger CC., Nelp WD., Glenn S., et al. « Radiolabeledantibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support ». *New England Journal of Medicine*, 1993,329(17):1219-24.
- Primus FJ., Wang RH., Goldenberg DM. et Hansen HJ. « Localization of human GW-39 tumors in hamsters by radiolabeled heterospecific antibody to carcinoembryonic antigen ». *Cancer Research*, 1973,33:2977-82.
- Prost A., Bouron C., Bigueur Q., Dufour PA., Hachemi M. et Boursot C. « Cancer différencié de la thyroïde : durée moyenne de séjour, débit de dose et exposition de l'entourage après une cure de radiothérapie par l'iode-131 ». *Médecine Nucléaire*, 2017,41(3),P_078.
- Purroy N., Bergua J., Gallur L., Prieto J., Lopez LA., Sancho JM., García-Marco JA., et al. « Long-term follow-up of dose-adjusted EPOCH plus rituximab (DA-EPOCH-R) in untreated patients with poor prognosis large B-cell lymphoma. A phase II study conducted by the spanish PETHEMA Group ». *British Journal of Haematology*, 2015,169(2):188-98.
- Rajguru S., Kristinsdottir T., Eickhoff J., Peterson C., Meyer CM., Traynor AM. et Kahl BS. « Yttrium-90ibritumomab tiuxetan plus rituximab maintenance as initial therapy for patients with hightumor-burden follicular lymphoma: a Wisconsin Oncology Network study ». *Clinical Advances in Hematology and Oncology*, 2014,12(8):509-15.
- Rakha EA., El-Sayed ME., Green AR., Lee AHS., Robertson JF. et Ellis IO. « Prognostic markers in triplenegative breast cancer ». *Cancer*, 2007,109(1):25-32.
- Randall EK. « PET-computed tomography in veterinary medicine ». *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 2016,46(3):515-33.
- Ranieri G., Gadaleta CD., Patruno R., Zizzo N., Daidone MG., Hansson MG., Paradiso A. et Ribatti D. « A model of study for human cancer: spontaneous occurring tumors in dogs. Biological features and translation for new anticancer therapies ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2013,88(1):187-97.
- Reis-Filho JS. et Tutt ANJ. « Triple negative tumours: a critical review: triple negative tumours ». *Histopathology*, 2007,52(1):108-18.
- Richman CM. «High-dose radioimmunotherapy combined with fixed, low-dose paclitaxel in metastatic prostate and breast cancer by using a MUC-1 monoclonal antibody, M170, linked to indium-111/yttrium-90 via a cathepsin cleavable linker with cyclosporine to prevent human anti-mouse antibody ». *Clinical Cancer Research*, 2005,11(16):5920-27.
- Rosenberg SA. « Validity of the Ann Arbor staging classification for the non-Hodgkin's lymphomas ». *Cancer Treatment Reviews*, 1977,61(6):1023-27.
- Rosenblat TL., McDevitt MR.,. Mulford DA., Pandit-Taskar N.,. Divgi CR., Panageas KS., Heaney ML., et al. « Sequential cytarabine and α-particle immunotherapy with bismuth-213–lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia ». *Clinical Cancer Research*, 2010,16(21):5303-11.
- Rosenthal MS., Cullom J., Hawkins W., Moore SC., Tsui BMW. et Yester M. « Quantitative SPECT imaging: a review and recommendations by the focus committee of the society of nuclear medicine computer and instrumentation council ». *Journal of Nuclear Medicine*, 1995,36(8):1489-1513.

- Rosenwald A., Wright G., Chan WC., Connors JM., Campo E., Fisher RI., Gascoyne RD., et al. « The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma ». *New England Journal of Medicine*, 2002,346(25):1937-47.
- Rousseau C., Ruellan AL., Bernardeau K., Kraeber-Bodéré F., Gouard S., Loussouarn D., Saï-Maurel C. 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 ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2011:1(1):20.
- Rousseau C., Ferrer L., Supiot S., Bardiès M., Davodeau F., Faivre-Chauvet A., Baumgartner P., et al. « Dosimetry results suggest feasibility of radioimmunotherapy using anti-CD138 (B-B4) antibody in multiple myeloma patients ». *Tumor Biology*, 2012,33(3):679-88.
- Rowe JA., Morandi F., Osborne DR., Wall JS., Kennel SJ., Reed RB. Et LeBlanc AK. « Relative skeletal distribution of proliferating marrow in the adult dog determined using 3'-deoxy-3'- (¹⁸F)fluorothymidine ». *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 2019,48:46-52.
- Rütgen BC., Hammer SE., Gerner W., Christian M., Guija de Arespacochaga A., Willmann M., Kleiter M., Schwendenwein I., et Saalmüller A. « Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma ». *Leukemia Research*, 2010,34(7):932-38.
- Rütgen BC., Willenbrock S., Reimann-Berg N., Walter I., Fuchs-Baumgartinger A., Wagner S., Kovacic B., et al. « Authentication of primordial characteristics of the CLBL-1 cell line prove the integrity of a canine B-cell lymphoma in a murine *in vivo* model ». *PLoS ONE*, 2012,7(6):e40078.
- Rylova SC., Stoykow C., Del Pozzo L., Abiraj K., Luisa Tamma M., Kiefer Y., Fani M. et Maecke HR.. « The somatostatin receptor 2 antagonist ⁶⁴Cu-NODAGA-JR11 outperforms ⁶⁴Cu-DOTA-TATE in a mouse xenograft model ». *PLOS ONE*, 2018,13(4):e0195802.
- Salaun PY., Campion L., Bournaud C., Faivre-Chauvet A., Vuillez JP., Taieb D., Ansquer C., et al. « Phase II trial of anticarcinoembryonic antigen pretargeted radioimmunotherapy in progressive metastatic medullary thyroid carcinoma: biomarker response and survival improvement ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2012,53(8):1185-92.
- Salfeld JG. « Isotype selection in antibody engineering ». *Nature Biotechnology*, 2007,25(12):1369-72.
- Sandström M., Ilan E., Karlberg A., Johansson S., Freedman N., et Garske-Román U. « Method dependence, observer variability and kidney volumes in radiation dosimetry of ¹⁷⁷Lu-DOTATATE therapy in patients with neuroendocrine tumours ». *EJNMMI Physics*, 2015,2(1).
- Schaefer NG., Huang P., Buchanan JW., Wahl RL. « Radioimmunotherapy in non-Hodgkin lymphoma: opinions of nuclear medicine physicians and radiation oncologists ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2011:52(5):830-8.
- Scheidhauer K., Wolf I., Baumgartl HJ., von Schilling C., Schmidt B., Reidel G., Peschel C. et Schwaiger M. « Biodistribution and kinetics of ¹³¹I-labelled anti-CD20 MAb IDEC-C2B8 (rituximab) in relapsed non-Hodgkin's lymphoma ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2002,29(10):1276-82.
- Schlumberger M., Bastholt L., Dralle H., Jarzab B., Pacini F., et Smit JWA. «2012 European thyroid association guidelines for metastatic medullary thyroid cancer ». *European Thyroid Journal*, 2012,1(1):5-14.

- Schoffelen R., Boeran OC., Goldenberg DM., Sharkey RM., van Herpen CML., Franssen GM., McBride WJ., et al. « Development of an imaging-guided CEA-pretargeted radionuclide treatment of advanced colorectal cancer: first clinical results ». *British Journal of Cancer*, 2013,109(4):934-42.
- Schoffelen R., Woliner-van der Weg W., Visser EP., Goldenberg DM., Sharkey RM., McBride WJ., Chang CH., et al. « Predictive patient-specific dosimetry and individualized dosing of pretargeted radioimmunotherapy in patients with advanced colorectal cancer ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2014,41(8):1593-602.
- Scholz CW., Pinto A., Linkesch W., Lindén O., Viardot A., Keller U., Hess G., et al. « ⁹⁰Y-ibritumomabtiuxetan as first-line treatment for follicular lymphoma: 30 months of follow-up data from an international multicenter phase II clinical trial ». *Journal of Clinical Oncology*, 2013,31(3):308-13.
- Schroeder HW Jr., Zemlin M. Khass M., Nguyen HH. et Schelonka RL. « Genetic control of DH reading frame and its effect on B-cell development and antigen-specific antibody production ». *Critical Reviews of Immunology*, 2010,30(4):327-44.
- Schulz AS.,. Glatting G., Hoenig M., Schuetz C., Gatz SA., Grewendorf S., Sparber-Sauer M., et al. « Radioimmunotherapy-based conditioning for hematopoietic cell transplantation in children with malignant and nonmalignant diseases ». *Blood*, 2011,117(17):4642-50.
- Sehn LH., Berry B., Chhanabhai M., Fitzgerald C., Gill K., Hoskins P., Klasa R. et al. « The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP ». *Blood*, 2007:109(5):1857-61.
- Seiler SMF., Baumgartner C., Hirschberger J., Beer AJ., Brühschwein A., Kreutzmann N., Laberke S., et al. « Comparative oncology: evaluation of 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose (FDG) positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) for the staging of dogs with malignant tumors ». *PLoS ONE*, 2015,10(6):e0127800.
- Selvarajah GT., Kirpensteijn J., van Wolferen ME., Rao NAS., Fieten H., et Mol JA. « Gene expression profiling of canine osteosarcoma reveals genes associated with short and long survival times ». *Molecular Cancer*, 2009,8(1).
- Semah F., Tamas C. et Syrota A. « La tomographie par émission de positons et ses applications cliniques ». *Sang, Thrombose, Vaisseaux*, 2004,16(9):471-95.
- Sévère S., Marchand P., Guiffard I., Morio F., Venisseau A., Veyrand B., Le Bizec B., et al. « Pollutants in pet dogs: a model for environmental links to breast cancer ». Springerplus, 2015,4(27).
- Sgouros G., Roeske JC., McDevitt MR., Palm S., Allen BJ., Fisher DR., Brill AB., et al. « MIRD pamphlet No. 22 (abridged): radiobiology and dosimetry of α-particle emitters for targeted radionuclide therapy ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2010,51(2):311-28.
- Shah HJ., Keraliya AR., Jagannathan JP., Harsha Tirumani S., Lele VR. et DiPiro PJ. « Diffuse large B-cell lymphoma in the era of precision oncology: how imaging is helpful ». *Korean Journal of Radiology*, 2017,18(1):54-70.
- Shan D. et Press OW. « Constitutive endocytosis and degradation of CD22 by human B cells' ». *The Journal of Immunology*, 1995,154(9):4466-75.

- Sharkey RM., Berh TM., Mattes MJ., Stein R., Griffiths GL., Shih LB., Hansen HJ., et al. « Advantage of residualizing radiolabels for an internalizing antibody against the B-cell lymphoma antigen CD22 ». *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 1997,44(3):179-88.
- Sharkey RM., Brenner A., Burton J., Hajjar G., Toder SP., Alavi A., Matthies A., et al. « Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with ⁹⁰Y-DOTA humanized anti-CD22 IgG (⁹⁰Y-epratuzumab): do tumor targeting and dosimetry predict therapeutic response ? ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2003(a),44(12):2000-18.
- Sharkey RM., McBride WJ., Karacay H., Chang K., Griffiths GL., Hansen HJ., et Goldenberg DM. «A universal pretargeting system for cancer detection and therapy using bispecific antibody ». *Cancer Research*, 2003(b),63:354-63.
- Shearin AL., Hedan B., Cadieu E., Erich SA., Schmidt EV., Faden DL., Cullen J., et al. « The MTAP-CDKN2A locus confers susceptibility to a naturally occurring canine cancer ». *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2012,21(7):1019-27.
- Shibata S., Raubitschek A., Leong L., Koczywas M., Williams L., Zhan J. et Wong JYC. « A phase I study of a combination of yttrium-90-labeled anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody and gemcitabine in patients with CEA-producing advanced malignancies ». *Clinical Cancer Research*, 2009,15(8):2935-41.
- Shields AF., Larson SM., Grunbaum Z. et Graham MM. « Short-term thymidine uptake in normal and neoplastia tissues: studies for pet ». *Clinical Sciences*, 1984,25(7):759-64.
- Shin DY., Byun B.H., Kim KM., Kang JH., Lim I., Kim BI., Lee SS., Choi CW., Kang HJ. et Lim SM. «Radioimmunotherapy with ¹³¹I-rituximab as consolidation therapy for patients with diffuse large B-cell lymphoma ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2016,78(4):825-31.
- Shinkai Y., Rathbun G., Lam KP., Oltz EM., Stewart V., Mendelsohn M., Charron J., et al. « RAG-2deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement ». *Cell*, 1992,68(5):855-67.
- Siegel JA., Thomas SR., Stubbs JB., Stabin MG., Hays MT., Koral KF., Robertson S., et al. « MIRD Pamphlet No. 16: techniques for quantitative radiopharmaceutical biodistribution data acquisition and analysis for use in human radiation dose estimates ». *Journal of Nuclear Medicine*, 1999,40:37s-61s.
- Simpson RM., Bastian BC., Michael HT., Webster JD., Prasad ML., Conway CM., Prieto VM., et al. « Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma ». *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2014,27(1):37-47.
- Simpson S., Dunning MD., de Brot S., Grau-Roma L., Mongan NP. et Rutland CS. « Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics ». *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2017,59(1).
- Stabin MG., Sparks RB., et Crowe E. « OLINDA/EXM: the second-generation personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2005,46(6):1023-27.
- Stefoni V., Casadei B., Bottelli C., Gaidano G., Ciochetto C., Cabras MG., Ansuinelli M., et al. « Shortcourse R-CHOP followed by ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in previously untreated high-risk elderly diffuse large B-cell lymphoma patients: 7-year long-term results ». *Blood Cancer Journal*, 2016,6(5):e425.

- Stein R., Goldenberg DM., Thorpe SR., Basu A, et Mattes MJ. « Effects of radiolabeling monoclonal antibodies with a residualizing iodine radiolabel on the accretion of radioisotope in tumors ». *Cancer Research*, 1995,55:3132-39.
- Stephens DM., Li H., LeBlanc ML., Puvvada SD., Persky D., Friedberg JW., Smith SM. « Continued risk of relapse independent of treatment modality in limited-stage diffuse large B-cell lymphoma: final and long-term analysis of southwest oncology group study S8736 ». *Journal of Clinical Oncology*, 2016:34(25):2997-3004.
- Stickney DR., Anderson LD., Slater JB., Ahlem CN., Kirk GA., Schweighardt SA., et Frincke JM. « Bifunctional antibody: a binary radiopharmaceutical delivery system for imaging colorectal carcinoma ». *Cancer Research*, 1991,51:6650-55.
- Stigbrand T., Ullen A., Sandstrom P., Mirzaie-Joniani H., Sundstrom B., Nillson B., Arlestig L., et al. « Twenty years with monoclonal antibodies: State of the art. Where do we go?». *Acta Oncologica*, 1996,35(3):259-65.
- Straka MR., Joyce JM. et Myers DT. « Tc-99m nofetumomab merpentan complements an equivocal bone scan for detecting skeletal metastatic disease from lung cancer ». *Clinical Nuclear Medicine*, 2000,25(1):54-55.
- Straw JA., Klubes P. et Hart MM. « Distribution of anticancer agents in spontaneous animal tumors. II. Distribution of gallium in canine lymphosarcoma ». *Journal of the National Cancer Institue*, 1975,55(1):199-202.
- Strohl WR. « Current progress in innovative engineered antibodies ». *Protein & Cell*, 2018,9(1):86-120.
- Strosberg J., El-Haddad G., Wolin E., Hendifar A., Yao J., Chasen B., Mittra E., et al. « Phase 3 trial of ¹⁷⁷Lu-DOTATATE for midgut neuroendocrine tumors ». *New England Journal of Medicine*, 2017,376(2):125-35.
- Sueiro FAR., Alessi AC. et Vassallo J.. « Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on P53 immunoexpression ». *Journal of Comparative Pathology*, 2004,131(2-3):207-13.
- Sullivan-Chang L., O'Donnell RT. et Tuscano JM. « Targeting CD22 in B-cell malignancies: current status and clinical outlook ». *BioDrugs*, 2013,27(4):293-304.
- Suzuki T., Ishii-Watabe A., Tada M., Kobayashi T., Kanayasu-Toyoda T., Kawanishi T. et Yamaguchi T. « Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG₁: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR ». *The Journal of Immunology*, 2010,184(4):1968-76.
- Tagawa ST., Batra J., Vallabhajosula S., Jhanwar Y., Christos PJ., Emmerich L., Karir BS., et al. « Final results of 2-dose fractionation of ¹⁷⁷Lu-J591 for progressive metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). » *Journal of Clinical Oncology*, 2016,34(15):5022s-22s.
- Takada M., Hix JML., Corner S., Schall PZ., Kiupel M. et Yuzbasiyan-Gurkan V. « Targeting MEK in a translational model of histiocytic sarcoma ». *Molecular Cancer Therapeutics*, 2018,17(11):2439-50.
- Takahashi E. et Nakamura S. « Histiocytic sarcoma : an updated literature review based on the 2008 WHO classification ». *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, 2013,53(1):1-8.

- Tennvall J., Fischer M., Bischof Delaloye A., Bombardieri E., Bodei L., Giammarile F., Lassmann M., Oyen W. et Brans B. « EANM Procedure Guideline for Radio-Immunotherapy for B-Cell Lymphoma with 90Y-Radiolabelled Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin) ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2007,34(4):616-22.
- Tomita N., Kodama F., Motomura S., Koharazawa H., Fujita H., Harano H., Kanamori H. et Ishigatsubo Y. « Prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma treated by riskadopted therapy ». *Internal Medicine*, 2006,45(5):247-52.
- Turkington TG. « Introduction to PET instrumentation ». *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 2001,29(1):4-11.
- Uike N., Choi I., Tsuda M., Haji S., Toyoda K., Suehiro Y., Abe Y., et al. « Factors associated with effects of ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in patients with relapsed or refractory low-grade B-cell non-Hodgkin lymphoma: single-institution experience with 94 japanese patients in rituximab era ». *International Journal of Hematology*, 2014,100(4):386-92.
- Uva P., Aurisicchio L., Watters J., Loboda A., Kulkarni A., Castle J., Palombo F., et al. « Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors ». *BMC Genomics*, 2009,10(1).
- Vail DM. et Thamm DH. « Hematopoietic tumors ». In *Ettinger SJ., Feldman EC. Textbook of veterinary internal medicine, 6th edition, Volume 1*, Saint-Louis, Saunders Elsevier, 2005:732-47.
- Valli VE., San Myint M., Barthel A., Bienzle D., Caswell J., Colbatzky F., Durham A., et al. « Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria». *Veterinary Pathology*, 2011,48(1):198-211.
- Van de Watering FC., Rijpkema M., Robillard M., Oyen WJ. Et Boerman OC. « Pretargeted imaging and radioimmunotherapy of cancer using antibodies and bioorthogonal chemistry ». *Frontiers Medicine*, 2014,18(1).
- Vezzali E., Parodi AL., Marcato PS. et Bettini G.. « Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-hodgkin lymphoma according to the WHO ». *Veterinary and Comparative Oncology*, 2010,8(1):38-49.
- Vinjamuri S., Gilbert TM., Banks M., McKane G., Maltby P., Poston G., Weissman H., et al. « Peptide receptor radionuclide therapy with ⁹⁰Y-DOTATATE/⁹⁰Y-DOTATOC in patients with progressive metastatic neuroendocrine tumours: assessment of response, survival and toxicity ». *British Journal of Cancer*, 2013,108(7):1440-48.
- Vose JM., Wahl RL., Qaleh M., Rohatiner AZ., Knox SJ., Radford JA., Zelenetz AD., et al. « Multicenter phase II study of iodine-131-tositumomab for chemotherapy-relapsed/refractory low-grade B-cell non-Hodgkin lymphomas ». *Journal of Clinical Oncology*, 2000,18(6):1316-23.
- Wahl RL. Zasadny KR., MacFarlane D., Francis IR., Ross CW., Estes J., Fisher S., et al. « Iodine-131 anti-B1 antibody for B-cell lymphoma: an update on the Michigan phase I experience ». *Journal of Nuclear Medicine*, 1998,39(8):21s-27s.
- Wang H., Rangan VS., Sung MC., Passemore D., Kempe T., Wang X., Thevanayagam L. et al. « Pharmacokinetic characterization of BMS-936561, an anti-CD70 antibody-drug conjugate, in

preclinical animal species and prediction of its pharmacokinetics in humans ». *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 2016,37:93-106.

- Wang Y., Deng M., Chen Q., Li Y., Guo X., Shi P., He L., et al. « Apatinib exerts anti-tumor activity to nonhodgkin lymphoma by inhibition of the Ras pathway ». *European Journal of Pharmacology*, 2019,843:145-53.
- Weiss DJ. « Histopathology of canine nonneoplastic bone marrow ». *Veterinary Clinical Pathology*, 1986,15(2):7-11.
- Whiteman DC., Pavan WJ., et Bastian BC. « The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin: the melanomas ». *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2011,24(5):879-97.
- Wild D., Fani M., Fischer R., Del Pozzo L., Kaul F., Krebs S., Fischer R., et al. « Comparison of somatostatin receptor agonist and antagonist for peptide receptor radionuclide therapy: a pilot study ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2014,55(8):1248-52.
- Withrow SJ., Vail DM et Page RL. «Withrow and MacEwen's-small animal clinical oncology, 5th edition ». Saint-Louis, Saunders Elsevier, 2012, 750p.
- Witzig TE., Tomblyn MB., Misleh JG., Kio EA., Sharkey RM., Wegener WA., et Goldenberg DM. « Anti-CD22 ⁹⁰Y-epratuzumab tetraxetan combined with anti-CD20 veltuzumab: a phase I study in patients with relapsed/refractory, aggressive non-Hodgkin lymphoma ». *Haematologica*, 2014,99(11):1738-45.
- Witzig TE., Gordon LI., Cabanillas F., Czuczman MS., Emmanouilides C., Joyce R., Pohlman BL., et al. «Randomized controlled trial of yttrium-90–labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma». *Journal of Clinical Oncology*, 2002,20(10):2453-63.
- Witzig, TE., Hong F., Micallef IN., Gascoyne RD., Dogan A., Wagner H., Kahl BS., Advani RH. et Horning SJ. « A phase II trial of RCHOP followed by radioimmunotherapy for early stage (stages I/II) diffuse large B-cell non-hodgkin lymphoma: ECOG3402 ». *British Journal of Haematology*, 2015,170(5):679-86.
- Wong H., Terner UK., English D., Noujaim AA., Lentle BC. Et Hill JR. « The role of transferrin in the in vivo uptake of gallium-67 in a canine tumor ». *Internal Journal of Nuclear Medicine and Biology*, 1980,7(1):9-16.
- Wong K., van der Weyden L., Schott CR., Foote A., Constantino-Casas F., Smith S., Dobson JM., et al. « Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma ». *Nature Communications*, 2019,10(1).
- Yuan J., Ku GY., Adamow M., Mu Z., Tandon S., Hannaman D., Chapman P., et al. « Immunologic responses to xenogeneic tyrosinase DNA vaccine administered by electroporation in patients with malignant melanoma ». *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2013,1(1).
- Zalutsky MR., Reardon DA., Akabani G., Coleman RE., Friedman AH., Friedman HS., McLendon RE., Wong TZ., et Bigner DD. « Clinical experience with α-particle emitting ²¹¹At: treatment of recurrent brain tumor patients with ²¹¹At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6 ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2007,49(1):30-38.

- Zhang J., Wang H., Jacobson O., Cheng Y., Niu G., Li F., Bai C., Zhu Z., et Chen X.. « Safety, pharmacokinetics, and dosimetry of a long-acting radiolabeled somatostatin analog ¹⁷⁷Lu-DOTA-EB-TATE in patients with advanced metastatic neuroendocrine tumors ». *Journal of Nuclear Medicine*, 2018,59(11):1699-1705.
- Zhou JJ., Gonzalez A., Lenox MK., Fossum TW., Frank RK., Simon J., Stearns S., Ruoff CM., Wendt RE. et Akabani G. « Dosimetry of a ⁹⁰Y-hydroxide liquid brachytherapy treatment approach to canine osteosarcoma using PET/CT ». *Applied Radiation and Isotopes*, 2015,97:193-200.
- Zinzani PL., Rossi G., Franceschetti S., Botto B., Di Rocco A., Cabras MG., Petti MC., et al. « Phase II trial of short-course R-CHOP followed by ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in previously untreated high-risk elderly diffuse large B-cell lymphoma patients ». *Clinical Cancer Research*, 2010,16(15):3998-4004.
- Zinzani PL., Tani M., Fanti S., Stefoni V., Musuraca G., Castellucci P., Marchi E., et al. « A phase II trial of CHOP chemotherapy followed by yttrium-90-ibritumomab tiuxetan (Zevalin) for previously untreated elderly diffuse large B-cell lymphoma patients ». *Annals of Oncology*, 2007,19(4):769-73.
- (Sans auteur). « The international NHL prognostic factors project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The international Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project ». *New England Journal of Medicine*, 1993,329:987-94.





Titre : Ciblage préclinique du CD22 canin pour l'imagerie phénotypique (immuno-TEMP) et la radioimmunothérapie des chiens spontanément atteints de lymphomes B diffus à grandes cellules

Mots clés : chien, lymphome B diffus à grandes cellules, tumeurs spontanées, imagerie phénotypique, radioimmunothérapie, CD22

Résumé : La radioimmunothérapie (RIT) utilise anticorps monoclonaux des (MAbs) radiomarqués spécifiques d'antigènes tumoraux. Injectés par voie intraveineuse, les MAbs radiomarqués se fixent à la tumeur et produisent une irradiation locale permettant de faire régresser les tumeurs disséminées. La RIT anti-CD22 a démontré son efficacité dans des essais cliniques chez des patients atteints de lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL). L'optimisation de cette approche thérapeutique vers un traitement personnalisé impose de développer des modèles précliniques pertinents. Les modèles murins disponibles sont peu pertinents pour une optimisation de cette approche thérapeutique. Les chiens spontanément atteints de DLBCL sont en revanche représentatifs de la pathologie humaine d'un point de vue physiopathologique et constituent un modèle préclinique pertinente pour optimiser la RIT anti-CD22

chez l'Homme.

Parmi les 7 MAbs murins anti-CD22 canin isolés au laboratoire, nous avons choisi le plus adapté au diagnostic par immunohistochimie et par imagerie fonctionnelle chez les chiens. La biodistribution de cet anticorps 10C6 radiomarqué à l'indium-111 a été déterminée chez des chiens sains et malades et la dosimétrie effectuée à partir des données recueillies en imagerie indique qu'une RIT peut être effectuée de façon sécurisée chez les chiens atteints de DLBCL.

L'influence de l'activité spécifique du MAb radiomarqué sur la biodistribution a été étudiée. Les variations importantes des doses déposées aux tumeurs et aux organes sains indiquent que l'activité spécifique est un paramètre à prendre en compte pour optimiser l'efficacité de la RIT dans une approche de personnalisation du traitement.

Title : Preclinical targeting of canine CD22 for phenotypic imaging (immuno-SPECT) and radioimmunotherapy in dogs with spontaneous diffuse large B-cell lymphoma

Keywords : dog, diffuse large B-cell lymphoma, spontaneous tumors, SPECT-CT imaging, radioimmunotherapy, CD22

Abstract : Radioimmunotherapy (RIT) uses radiolabeled monoclonal antibodies (MAbs) specific for tumor antigens. After intravenous injection, radiolabeled MAbs bind to the tumor and produce local irradiation to reduce disseminated tumors. Anti-CD22 RIT has been shown to be effective in clinical trials in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). The optimization of this therapeutic approach towards personalized treatment requires the development of relevant preclinical models. The mouse models available are of little relevance for optimizing this therapeutic approach. Conversely, dogs with spontaneous DLBCL are representative of human pathology from a physiopathological point of view and

constitute a relevant preclinical model for

optimizing anti-CD22 RIT in humans.

Among the 7 murine anti-canine CD22 Mabs isolated in the laboratory, we chose the most suitable for diagnosis in immunohistochemistry and functional imaging in dogs. The biodistribution of this indium-111 radiolabeled 10C6 antibody has been determinated in healthy and diseased dogs, and dosimetry from imaging data indicates that RIT can be safely performed in dogs with DLBCL. The influence of the specific activity of

The influence of the specific activity of radiolabeled MAb on biodistribution has been studied. The large variations in the doses deposited to tumors and healthy organs indicate that the specific activity is a parameter to take into account to optimize the efficiency of the RIT in a personalization approach to treatment.