

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : *Médecine Nucléaire et Radiopharmaceutique*

Par

Cassandra METIVIER

Développement d'une approche théranostique utilisant le cuivre-64 dans un modèle murin de myélome multiple

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 19/06/23

Unité de recherche : CRCl²NA – Inserm U1307 – CNRS URM 6075 – Nantes Université

Rapporteurs avant soutenance :

Alexis BROISAT
Sylvie CHALON

Chargé de recherche Inserm, URM Inserm 1039, Université Grenoble Alpes
Directeur de recherches Inserm, UMR Inserm 1253, Université de Tours

Composition du Jury :

Président : Férid HADDAD

Professeur des Universités, Nantes Université

Examineurs : Mathilde BONNET
Nathalie LE BRIS

Professeure des Universités, Université Clermont Auvergne
Maître de conférences Universitaire, Université de Bretagne Occidentale

Dir. de thèse : Alain FAIVRE-CHAUVET
Encadrante de thèse : Latifa RBAH-VIDAL

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, CHU de Nantes
Maître de conférences Universitaire, Nantes Université

Co-encadrant de thèse : Nicolas CHOUIN

Maître de conférences Universitaire, ONIRIS, Nantes

Soutiens financiers :

Le projet TheraScCoop dans lequel s'inscrit mon sujet de thèse est soutenu financièrement par l'initiative NExT « Nantes Excellence Trajectory » (appel à projets I-SITE), action du deuxième Programme d'Investissements d'Avenir (PIA2) lancé par l'Etat et mis en œuvre par l'ANR (référence ANR-16-IDEX-0007). Cette initiative a lieu dans la région Pays de la Loire, à Nantes Métropole.

Cette recherche a également été financée par la Ligue Régionale Contre le Cancer Grand Ouest (comité Loire-Atlantique et comité Finistère).

Remerciements :

À Madame la Professeure Sylvie Chalon et Monsieur le Docteur Alexis Broisat pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter d'être les rapporteurs de ma thèse. Je vous remercie pour le temps et l'intérêt que vous avez consacrés à mon travail.

À Madame le Professeure Mathilde Bonnet, Monsieur le Professeur Férid Haddad, et Madame la Docteur Nathalie Le Bris, pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

À Monsieur le Professeur Alain Faivre-Chauvet, mon directeur de thèse. Je te remercie pour tes conseils, ta disponibilité et surtout de la profonde patience et bienveillance que tu as toujours eu à mon égard. Tes conseils ont été précieux pour me guider pendant la période de rédaction de ce manuscrit.

À Madame la Docteure Latifa Rbah-Vidal, mon encadrante de thèse. Tout d'abord, je te remercie infiniment de m'avoir permis de réaliser cette thèse sous ta direction, sur un sujet tout aussi nouveau que passionnant pour moi. Merci de m'avoir formée au métier de chercheur, de m'avoir montré que la persévérance paie toujours et d'avoir toujours su rester optimiste. Je te remercie aussi d'avoir toujours été franche, honnête et bienveillante à l'égard de mon travail et de m'avoir fait confiance tout au long de ces années.

À Monsieur le Docteur Chouin Nicolas, mon co-encadrant de thèse. Merci pour les corrections et les commentaires constructifs que tu as apportés à ce manuscrit ainsi que lors de la préparation de la soutenance. Merci aussi pour tes travaux sur la dosimétrie et le partage de tes connaissances sur le sujet, adapté à la biologiste que je suis.

À Madame la Professeure Françoise Kraeber-Bodéré et Monsieur le Professeur Michel Chérel, directeurs de l'équipe d'oncologie nucléaire du CRCIN²NA dans laquelle j'ai réalisé ma thèse. Je tenais à vous remercier de m'avoir accueilli au sein de votre équipe.

À Patricia Le Saëc, merci beaucoup pour tout le travail réalisé sur les radiomarquages au cuivre qui a été essentiel pour la réalisation de cette thèse. Je te remercie de m'avoir formée et initiée à la radiochimie. Tu m'as été d'un immense soutien pendant ces trois années, ta bonne humeur et ton optimisme ont été un pilier pour moi. Merci pour tout Madame Sourire et vive TheraScCoop !!

À Catherine Chauvet, pour ton aide précieuse lors des expérimentations animales et ton implication dans ce projet, notamment lors de ces longs mois de suivi constant des animaux pendant les radiothérapies. Ta présence et ta sérénité lors des sessions d'injection en intraveineuse m'auront toujours porté chance ! Merci de ta gentillesse et de ta bienveillance. J'ai vraiment été ravie de travailler avec toi.

À Séverine Marionneau-Lambot, merci beaucoup pour ton aide précieuse et tes conseils en matière d'expérimentation animale. Merci d'avoir toujours été disponible lorsque j'en avais besoin et de m'avoir formée à l'acquisition des images TEP.

À Hela Bouhsine pour ton temps et ton aide précieuse sur la mise en place des expérimentations concernant le CXCR4 qui nous auront donné du fil à retordre !

À Justine Perrin, tout d'abord je tenais à te remercier de m'avoir formée, conseillée et aidée à de nombreuses reprises, notamment pour la microscopie confocale et la cytométrie en flux (j'ai toujours gardé ta bible du FACS auprès de moi). Mais je tiens aussi à te remercier pour l'accueil chaleureux que tu m'as fait au sein de cette équipe. Pour toutes ces soirées, ces pauses sketches du midi, ce festival mémorable passé en ta compagnie ! J'espère que tout se déroule comme tu le souhaites à Rotterdam et qu'on se reverra très bientôt !

À Capucine Bianciotto qui m'a permis de réaliser ma première expérience comme « encadrante », cela a été très facile de travailler avec quelqu'un d'aussi volontaire, impliqué et sympathique. J'ai adoré cette expérience et j'espère que toi aussi.

À Joëlle Gaschet, merci pour tes conseils avisés et constructifs sur l'interprétation de mes travaux. Merci aussi pour ta précieuse expertise sur la mise en place de plusieurs protocoles cellulaire pour les études de clonogénicité.

À Mathilde Allard pour ton aide sur l'interprétation et l'analyse des études de cytométrie en flux. Merci pour ta disponibilité, ta bienveillance et ta bonne humeur.

À Nina Laurent, tout d'abord je voudrais te remercier pour toute l'aide que tu m'as apportée lors du lancement et de la mise au point des études d'histologie. Je suis ravie d'avoir partagé mes dernières années de thèse avec toi au laboratoire. Merci pour toutes ces discussions en rapport ou non avec notre travail, qui m'ont aidé à relativiser ou me changer les idées, pour toutes ces

soirées (et bientôt tous ces concerts) qui m'ont aussi permis d'apprécier Nantes un peu plus. Bon courage pour la suite de ta thèse, qui se déroulera, j'en suis persuadée, très bien !

À Benjamin Le Crom, j'ai été ravie de rencontrer une personne aussi passionnée et passionnante que toi et qui as su changer sa vie du tout au tout pour s'épanouir pleinement. Merci pour tes conseils toujours avisés et ta bienveillance extrême. On se retrouve quand tu veux en festival !

À Ludovic Le Saux, mon cher « collègue », sans qui ces années de thèse auraient été bien différentes. Merci infiniment d'avoir toujours été présent pour me soutenir et m'écouter quand j'en avais besoin (cela fonctionne dans les deux sens ne l'oublie pas). Merci aussi d'avoir toujours été moteur dans cette équipe de l'organisation de soirées/activités pour intégrer au mieux les nouveaux arrivants et nous permettre de passer de bons moments tous ensemble en dehors du laboratoire. Je te souhaite tout le meilleur pour finir cette thèse avec succès (ce que tu feras, je n'en doute pas) et en étant fier de toi et de ton travail. Enfin, je pense que l'on peut abolir le terme « collègue », merci d'être mon ami.

À l'ensemble de l'équipe « oncologie nucléaire », anciens et nouveaux membres, pour leur accueil et qui m'ont aussi apporté leur aide tout au long de la réalisation de ce travail. Merci aussi pour toutes les soirées, les goûters, les activités, tous les fous rires...

À Arronax, pour avoir produit et fourni le cuivre-64 nécessaire à la réalisation de ces travaux de thèse.

À Monsieur le Docteur Emmanuel Garcion, pour nous avoir fourni l'hybridome cellulaire 12G5 à partir duquel nous avons pu travailler sur l'axe de recherche concernant le ciblage du récepteur CXCR4.

À Madame la Professeure Margret Schottelius, pour ses précieux conseils lors de la mise en place des protocoles de cytométrie flux pour étudier l'expression du récepteur CXCR4.

À l'équipe CEMCA de Brest, pour avoir synthétisé et fourni le chélate NCS-TE1PA avec lequel nous avons pu travailler.

Je souhaite aussi remercier toutes les personnes qui m'ont formé et qui ont participé à la réalisation de cette thèse, le personnel des plateformes PT Radio, Cima, CytoCell, UTE, MicropiCell et P2R qui ont aussi toujours été présents pour répondre à mes questions.

À tous mes amis, amis de lycée et K-Thons, Nantais et AngesVins, pour tous les moments partagés qui m'ont été essentiels pour décompresser et relativiser. Merci pour tous ces fous rires, pour les

vacances au ski, les festivals, les soirées, les sessions jeux de société, les olympiades, tous ces moments hors du temps qui m'ont offert de vrais bouffés d'air frais ...

Je remercie ma famille, mes parents mes frères Jordan, Kevin et Morgan qui m'ont soutenu et supporté tout au long de mes années d'études. Vous avez toujours été présents et prêts à me remonter le moral dans les moments difficiles, merci de m'avoir toujours encouragé. Une pensée pour mes grands-parents, Colette, Claude et Daniel qui se sont toujours intéressés et impliqués dans ce que je faisais, j'espère que vous êtes fières de moi.

Enfin, merci à Alexandre, sans toi je n'y serai pas arrivée ... Merci de m'avoir soutenu sans relâche et d'avoir cru en moi.

Table des Matières :

Soutiens financiers :	1
Remerciements :	1
Liste des Figures	8
Liste des Tableaux	10
Liste des abréviations	11
Partie I : Rappels bibliographiques	14
I. La théranostique	15
1. Définition du concept	15
2. La théranostique en médecine nucléaire.....	17
a. Définition	17
b. Historique et évolution de la théranostique	18
c. La théranostique en clinique	19
3. L'imagerie moléculaire	20
a. Historique.....	20
b. Imagerie TEP vs. Imagerie TEMP.....	22
c. Le principe de détection de la TEP	24
d. L'intérêt de l'imagerie TEP	25
e. Le choix du radionucléide	26
f. Le choix du vecteur	28
i. Les peptides	30
ii. Les anticorps monoclonaux et leurs dérivés	33
4. La radiothérapie interne vectorisée	35
a. Principe général.....	35
b. Les différents types d'émissions utilisés en RIV	36
II. Le cuivre	39
1. Les caractéristiques	39
2. Le devenir du cuivre dans l'organisme.....	39
3. Le rôle physiologique/pathologique	42
4. Le rôle pathologique du cuivre en cancérologie.....	42
5. Le cuivre-64	43
a. Les caractéristiques	43
b. Les chélates du cuivre	44
6. Utilisation du cuivre-64 en précliniques et cliniques pour l'imagerie et la thérapie.....	46
a. Applications du cuivre-64 en clinique pour l'imagerie TEP	46
b. Évaluation du potentiel thérapeutique du cuivre-64	46
7. La paire théranostique $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$	48
III. Myélome multiple	50
1. Physiopathologie et épidémiologie	50
2. Le diagnostic du myélome multiple	52
3. Traitements.....	55
IV. Cibles théranostiques dans le MM	58
1. Le syndécan-1 (CD138)	58
2. Le CXCR4 (CD184)	59
Objectifs de thèse	61

Partie II : Évaluation théranostique d'un anticorps anti-CD138 radiomarqué au cuivre-64..... 62

I. Matériel et méthodes.....	63
1. Culture cellulaire	63
2. Anticorps 9E7.4 et isotype IgG2A	64
3. Analyse par cytométrie en flux	64
4. Les modèles animaux	65
5. Fonctionnalisation de l'AcM 9E7.4 par le 1-picolinate, 6-para isothiocyanatobenzyl tetraazacyclo tetradecane (p-SCN-Bn-TE1PA)	66
6. Radiomarquage de l'anticorps 9E7.4 au cuivre-64	67
7. Contrôles des radiomarquages	68
8. Captation cellulaire du vecteur [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 par les cellules MOPC315.BM.....	69
9. Biodistribution <i>ex vivo</i> dans le modèle de myélome multiple.....	70
10. Imagerie par tomographie par émission de positons (TEP)	70
11. Dosimétrie dans le modèle MOPC315.BM de myélome multiple	71
12. Radiothérapie interne vectorisée au [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans le modèle de myélome multiple	71
13. Radiothérapie interne vectorisée au [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans le modèle de cancer du sein triple négatif (CSTN).....	73
14. Suivi des animaux et contrôle de la toxicité.....	74
15. Histologie.....	75

II. Évaluation d'une RIV utilisant le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans un modèle murin myélome multiple 76

1. Évaluation par cytométrie en flux de l'expression par la lignée MOPC315.BM de la cible CD138 en comparaison à la lignée 5T33.....	76
2. Caractérisation de l'affinité de l'anticorps 9E7.4 pour la lignée cellulaire MOPC315.BM	77
3. Radiomarquage et immunoréactivité	78
4. Captation cellulaire du vecteur [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 par les MOPC315.BM	78
5. Biodistributions <i>ex vivo</i> du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans un modèle de tumeurs MOPC315.BM sous-cutanées	81
6. Imagerie TEP-TDM du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 et [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-IgG2a,κ dans le modèle s.c MOPC315.BM	83
7. Dosimétrie	84
8. Expérimentation de la RIV utilisant le [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans un modèle orthotopique de MM 85	
9. Expérimentation de la RIV utilisant le [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans un modèle sous-cutané de MM 92	

III. Évaluation d'une RIV utilisant le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans un modèle murin de tumeur solide, le cancer du sein triple négatif 100

1. Évaluation par cytométrie en flux de l'expression membranaire du CD138 par la lignée cellulaire murine 4T1 de cancer du sein triple négatif	100
2. Imagerie TEP-TDM du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 et du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-IgG2A,κ chez des souris portants une tumeur 4T1 s.c.....	102
3. Expérimentation de la RIV utilisant le [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans un modèle sous-cutané de CSTN.....	104

IV. Discussion 112

V. Conclusion 122

Partie III : Évaluation diagnostique d'un anticorps anti-CXCR4 radiomarqué au cuivre-64..... 124

I. Matériels et méthodes..... 125

1. Culture cellulaire	125
2. Modèles précliniques.....	125
3. Production de l'anticorps 12G5	125
4. Cytométrie en flux.....	126
5. Microscopie confocale.....	127
6. Fonctionnalisation avec le chélate TE1PA et radiomarquage de l'anticorps 12G5 au cuivre-64 128	
7. Imagerie TEP-TDM	128
II. Résultats.....	129
1. Contrôle analytique de l'anticorps 12G5 anti-CXCR4 humain produit	129
2. Caractérisation de l'expression membranaire du récepteur CXCR4 par des lignées cellulaires humaines du MM cultivées in vitro	129
3. Caractérisation de l'expression membranaire du récepteur CXCR4 par les lignées cellulaires humaines de MM à partir des tumeurs greffées aux souris NSG	132
4. Imagerie TEP-TDM du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-12G5.....	134
III. Discussion	136
IV. Conclusion.....	139
Partie IV : Conclusion générale.....	140
Partie V : Références bibliographiques	144
Communications	163
Annexes.....	165
Annexe 1 : Profil UPLC de l'anticorps 9E7.4 et de l'anticorps 9E7.4-TE1PA couplé avec 20 équivalents	166
Annexe 2 : Qualification des billes magnétiques couvertes du peptide 2 utilisées pour les contrôles d'immunoréactivité du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, avec l'anticorps 9E7.4 natif radiomarqué à l'iode-125	167
Annexe 3 : Tableau de valeurs des %AD/millions de cellules lors du contrôle de captation cellulaire	168
Annexe 4 : Tableau de valeurs des %/DI/g à 5 min, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 chez des souris saines	169
Annexe 5 : Tableau de valeurs des %/DI/g à 5 min, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 chez des souris porteuses d'une tumeur s.c MOPC315.BM.....	170
Annexe 6 : Marqueurs biologiques relevés pour l'étude de la toxicité hépatique et rénale lors des expérimentations de RIV	171
Annexe 7 : Profil UPLC de l'anticorps 12G5 et de l'anticorps 12G5-TE1PA couplé avec 20 équivalents	172
Annexe 8 : Article publié.....	173

Liste des Figures

Figure 1. Schéma représentatif de la place de la théranostique dans la médecine personnalisée	16
Figure 2. Principe d'utilisation des radiopharmaceutiques en médecine nucléaire.....	17
Figure 3. Évolution du nombre de publications incluant le terme « Theranostic » ou « Theragnostic » entre 2002 et 2022.....	19
Figure 4. Une des premières images TEMP au technétium-99m d'un thorax humain	21
Figure 5. Premières images TEP d'un cerveau humain utilisant le [¹¹ C]CO-Carboxyhémoglobine	22
Figure 6. Démonstration de la supériorité de la résolution et de la spécificité de la TEP au gallium-68 (A) en comparaison de la TEMP au lutétium-177 (B) dans l'imagerie des récepteurs PCMA.....	23
Figure 7. Représentation schématique du principe de détection de la TEP.....	25
Figure 8. Représentation schématique des principales stratégies de radiomarquage de vecteurs pour la production de radiopharmaceutiques.....	29
Figure 9. Structures chimiques du [¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA-TATE et du [⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-TOC.....	32
Figure 10. Représentation schématique d'un anticorps et de ses différents dérivés possibles et impact de leur taille sur leur demi-vie biologique	34
Figure 11. Représentation schématique des principales caractéristiques des émetteurs alpha, bêta et des électrons Auger utilisés en RIV	38
Figure 12. Représentation schématique du devenir du cuivre dans l'organisme.....	41
Figure 13. Schéma représentatif de la décroissance du cuivre-64	44
Figure 14. Diagnostic différentiel du spectre des gammopathies monoclonales.....	51
Figure 15. Représentation schématique de l'ensemble de la stratégie thérapeutique contre le myélome multiple	56
Figure 16. Évolution des essais cliniques sur le myélome multiple entre 2002 et 2022.....	57
Figure 17. Rôle du Syndécan-1 dans la prolifération des cellules du myélome multiple	58
Figure 18. Imagerie TEP au [⁶⁸ Ga]Ga-Pentixafor chez un patient atteint du MM	60
Figure 19. Schéma représentatif du protocole de RIV dans le modèle orthotopique de myélome multiple murin MOPC315.BM.....	71
Figure 20. Schéma représentatif du protocole de RIV dans le modèle s.c ectopique de myélome multiple murin MOPC315.BM.....	72
Figure 21. Schéma représentatif du protocole de RIV dans le modèle de tumeur solide du sein triple négatif 4T1.....	73
Figure 22. Caractérisation par cytométrie en flux de l'expression membranaire du CD138 par les lignées cellulaires 5T33 et MOPC315.BM in vitro	77
Figure 23. Caractérisation par cytométrie en flux de l'affinité de l'anticorps 9E7.4 pour la lignée cellulaire MOPC315.BM.....	78
Figure 24. Liaison spécifique in vitro du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 sur les cellules MOPC315.BM	80
Figure 25. Biodistribution ex vivo du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans le modèle MOPC315.BM.....	82
Figure 26. Suivi longitudinal par imagerie TEP-TDM de la biodistribution in vivo du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 et comparaison avec le [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-IgG2a,κ chez des souris porteuses d'une tumeur s.c MOPC315.BM	84
Figure 27. Survie des animaux après thérapie au [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans le modèle orthotopique MOPC315.BM.....	87
Figure 28. Suivi du poids et de la toxicité hématologique après thérapie au [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans le modèle orthotopique MOPC315.BM.....	89

Figure 29. Suivi de la toxicité hépatique et rénale après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle orthotopique MOPC315.BM.....	91
Figure 30. Suivi de l'évolution de la maladie dans le modèle orthotopique MOPC315.BM par imagerie TEP-TDM avec une injection thérapeutique du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$	92
Figure 31. Suivi de la survie, de la variation pondérale et de la croissance tumorale chez les souris après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle s.c MOPC315.BM	94
Figure 32. Suivi de la toxicité hématologique après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle s.c MOPC315.BM	96
Figure 33. Suivi de la toxicité hépatique et rénale après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle s.c MOPC315.BM.....	97
Figure 34. Théranostique et efficacité thérapeutique après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle s.c MOPC315.BM.....	99
Figure 35. Caractérisation par cytométrie en flux de l'expression membranaire du CD138 par la lignée cellulaire 4T1 et de l'affinité de l'anticorps 9E7.4 pour la cible	101
Figure 36. Comparaison de l'expression membrane du CD138 entre les lignées cellulaires 4T1 et MOPC315.BM.....	102
Figure 37. Suivi longitudinal par imagerie TEP-TDM de la biodistribution in vivo du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ et comparaison avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-IgG2a},\kappa$	104
Figure 38. Suivi de la survie et de la variation pondérale après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle murin de CSTN.....	106
Figure 39. Imagerie TEP-TDM des souris traitées au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ et $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$	107
Figure 40. Suivi des volumes tumoraux après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle murin de CSTN	109
Figure 41. Suivi de la toxicité hématologique après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle murin de CSTN.....	110
Figure 42. Suivi de la toxicité hépatique et rénale après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle murin de CSTN	111
Figure 43. Chromatogramme HPLC de l'AcM 12G5 après purification et dialyse	129
Figure 44. Caractérisation par cytométrie en flux de l'expression membranaire du CXCR4 par les différentes lignées cellulaires humaines de MM.....	130
Figure 45. Caractérisation par cytométrie en flux de l'affinité de l'anticorps 12G5 pour la cible CXCR4 par nos différentes lignées cellulaires humaines de MM.....	131
Figure 46. Étude de l'expression membranaire du CXCR4 par nos lignées cellulaires humaines de MM par microscopie confocale.....	132
Figure 47. Caractérisation par cytométrie en flux de l'expression membranaire du CXCR4 par les différentes lignées cellulaires humaines de MM à partir des tumeurs ex vivo	133
Figure 48. Caractérisation par imagerie TEP-TDM de la fixation du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-12G5}$ chez des souris portants une tumeur s.c OPM-2, U266.B1 ou MM.1S	135

Liste des Tableaux

Tableau 1. La corrélation entre le parcours moyen (en mm) dans l'eau et l'énergie maximale (MeV) du positon de différents radionucléides.....	27
Tableau 2. Propriétés des principaux radioisotopes du cuivre.....	43
Tableau 3. Propriétés des BCA disponibles pour le radiomarquage au cuivre.....	45
Tableau 4. Classification des stades de facteurs de risque dans le MM par l'ISS et la prise en compte des risques cytogénétiques	54
Tableau 5. Ratios de fixation du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 sélective au niveau de la tumeur	83
Tableau 6. Estimation des doses absorbées du [⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans les tissus/organes des souris porteuses d'une tumeur s.c MOPC315.BM	85
Tableau 7. Activités globales injectées dans les différentes cohortes en activités injectées par gramme de souris (MBq/g) greffées en i.v avec les MOPC315.BM	88
Tableau 8. Activités globales injectées dans les différentes cohortes en activités injectées par gramme de souris (MBq/g) porteuses de tumeurs s.c MOPC315.BM.....	95
Tableau 9. Activités globales injectées dans les différentes cohortes en activités injectées par gramme de souris (MBq/g) porteuses de tumeurs s.c 4T1	106

Liste des abréviations

[⁶⁴Cu]Cu-ATSM: [⁶⁴Cu]Cu-diacetylbis (N4-methylthiosemicarbazone)

[⁶⁴Cu]CuCl₂: dichlorure de cuivre

2-[¹⁸F]F-FDG : 2-[¹⁸F]-fluoro-2-déoxy-D-glucose

aa : acides aminés

AcM : anticorps monoclonal

ALT : alanine aminotransférase

AMM : autorisation de mise sur le marché

AST : aspartate aminotransférase

ATP7A : adénosine triphosphatase A de type P

ATP7B : adénosine triphosphatase B de type P

BCA : Bifunctional Chelating Agent

BCMA : antigène de maturation des cellules B

Bq : Becquerel ; MBq : Mégabecquerel

BSA : Albumine de sérum bovin

BUN : azote uréique sanguin

CE : capture électronique

CPM : coups par minute

CSTN : cancer du sein triple négatif

CTR1 : récepteur 1 de transport du cuivre à haute affinité

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DPM : désintégration par minute

D-VTD : daratumumab-bortézomib-thalidomide-déxaméthasone

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique

EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique

EHA : Association européenne d'hématologie

ESMO : Société européenne d'oncologie médicale

EMA : Agence européenne du médicament

FcγR : récepteurs Fc-gamma

FDA : Food and Drug Administration

FISH : hybridation in situ en fluorescence

FITC : fluorescéine

FGF1 : facteur de croissance des fibroblastes 1

GB : globules blancs

GR : globules rouges

HER2 : récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain
HIF-1 α : facteur 1 α inductible par l'hypoxie
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
IMWG : International Myeloma Working Group
IL-6 : interleukine-6
i.p : intrapéritonéal
i.v : intraveineux
Ig : immunoglobuline
IgH : immunoglobulin heavy, chaîne lourde des immunoglobulines
IRM : imagerie par résonance magnétique
ITLC : chromatographie en couche mince instantanée
Kd : constante de dissociation
LNH : lymphome non hodgkinien
LOX : lysyl oxydase
MEM NEAA : acides aminés non essentiels
MEMO1 : médiateur de motilité cellulaire
MGUS : gammopathie monoclonale de signification indéterminée
MIP : « maximum intensity projection »
MM : myélome multiple
MO : moelle osseuse
ms : médiane de survie
NCCN : National Comprehensive Cancer Network
NHS : N-hydroxysuccinimide
NIS : symporteur sodium/iodure
PE : phycoérythrine
p-SCN-Bn-DOTA (DOTA) : 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
p-SCN-Bn-NOTA (NOTA) : S-2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid
p-SCN-Bn-TE1PA (TE1PA) : 1-picolinate, 6-para isothiocyanatobenzyl tetraazacyclo tetradecane
PSMA : antigène de la membrane spécifique de la prostate
RIV : radiothérapie interne vectorisée
ROS : radicaux libres de l'oxygène
S.I : système immunitaire
SDF-1 : facteur dérivé du stroma 1
SFMN : Société Française de Médecine Nucléaire et Imagerie Moléculaire

SMM : myélome multiple asymptomatique

SST : somatostatine

SVF : sérum de veau foetal

Td : temps de doublement

TDM : tomodensitométrie

TEL : transfert d'énergie linéique

TEMP : tomographie par émissions monophotonique

TEP : tomographie par émissions de positons

TNE : tumeur neuroendocrine

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium

β 2M : beta-2-microglobuline

Partie I : Rappels bibliographiques

I. La théranostique

1. Définition du concept

Les avancées de la recherche biomédicale en oncologie de ces 3 dernières décennies sont à l'origine de nouveaux défis concernant la prise en charge des patients. La mise en place d'une médecine personnalisée est l'un des plus importants. L'émergence de cette nouvelle approche de la médecine s'est développée en réponse à l'observation, de plus en plus fréquente, de l'hétérogénéité inter-, mais aussi intra-tumorale dans de nombreux types de cancer ([Marusyk et Polyak 2010](#)).

De nos jours, l'approche par thérapie conventionnelle en oncologie est toujours utilisée et consiste à appliquer un protocole thérapeutique unique utilisant des mêmes médicaments avec des posologies identiques sans prendre en compte cette hétérogénéité tumorale. Or, celle-ci est souvent à l'origine de nombreux effets secondaires et d'une récurrence tumorale chez les patients qui ne vont pas tous répondre de la même manière aux traitements ([Ding et al. 2012](#); [Burrell et al. 2013](#)).

La médecine personnalisée serait en mesure de pallier ce problème. Elle implique, quand cela est possible, une sélection des patients sur la base de tests biologiques ou d'imagerie médicale permettant par la suite de proposer aux patients éligibles une thérapie ciblée ([Idée et al. 2013](#)). Cette sélection pour un traitement spécifique est nécessaire pour choisir des patients plus susceptibles d'y répondre étant donné le coût important de ce type de thérapie ([Kasztura et al. 2019](#)), et d'éviter ces mêmes traitements coûteux à des patients peu ou pas susceptibles d'y répondre. Ainsi, dans la prise en charge du patient, une caractérisation précise du type de cancer est mise en place avec des examens d'imagerie médicale comme la tomographie par émission de positons (TEP), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie par émission de positons (TEP), ou par quantifications de biomarqueurs dans le sang ou le plasma ou directement dans les tissus tumoraux à partir d'une biopsie ([Idée et al. 2013](#)). Lorsque le test diagnostique est positif, rapidement, la thérapie ciblée pourra être mise en place. Dans le cas contraire, si le test diagnostique est négatif, un protocole thérapeutique conventionnel sera administré. Un suivi au cours de la thérapie du caractère observé lors du diagnostic permettra le suivi de l'évolution de la maladie, il aura alors une fonction pronostique de l'efficacité du traitement ([Lech et al. 2016](#)).

C'est dans ce contexte de médecine personnalisée que s'inscrit le concept de « Théranostic ». C'est en 2002 que l'Américain John Funkhouser a inventé le terme « Théranostic » (en anglais « Theranostic » ou « Theragnostic »), construit à partir de la combinaison de deux mots grecs : *therapeia*, pour « thérapie », et *gnosis*, qui se traduit par « savoir », pour désigner un outil médical qui combine à la fois le diagnostic et la thérapie ([Funkhouser 2002](#); [Bentzen 2005](#)). Dans le cas de

la théranostique, on considère l'utilisation d'un seul vecteur (**Figure 1**) avec un tropisme spécifique pour les cellules tumorales, sur lequel on va insérer un composant (atome ou molécule) radioactif ou fluorescent pour diagnostiquer et sélectionner les patients. Pour la thérapie, ce même vecteur pourra être lié à une toxine ou à un radionucléide à fort transfert d'énergie linéique (TEL) pour éliminer les cellules tumorales ([Kelkar et Reineke 2011](#)). Un avantage important avec l'utilisation de ces deux composés est qu'ils auront des propriétés pharmacocinétiques proches et dans les meilleurs cas identiques, supposant une distribution et une clairance similaire dans l'organisme. L'étude de ces propriétés pharmacocinétique avec le composé diagnostique pourra, en plus de sélectionner les patients qui répondront au traitement, avoir une valeur pronostique de son efficacité.

Ainsi, l'évaluation de l'expression de la cible sur laquelle se fixe spécifiquement le composé théranostique est donc d'une utilité clinique directe non seulement au moment du diagnostic, mais aussi pendant et après le traitement. Nous nous intéresserons dans cette thèse à l'application du principe de théranostic en médecine nucléaire.

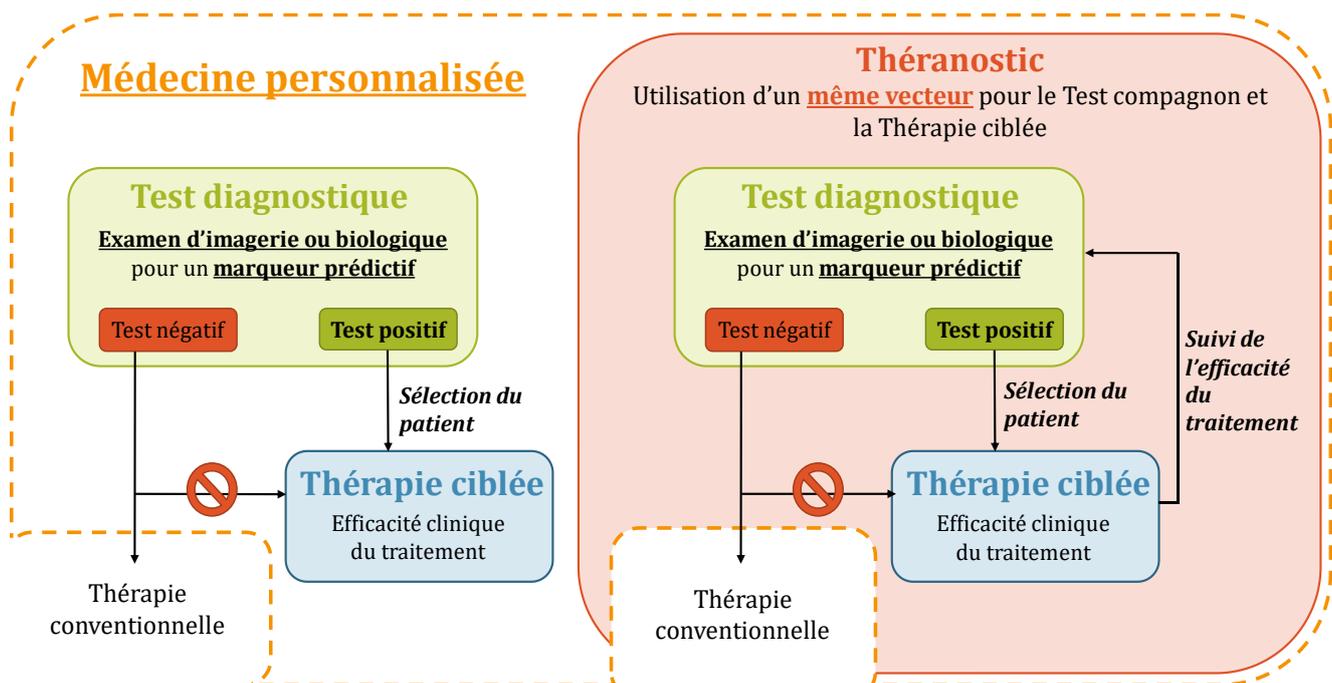


Figure 1. Schéma représentatif de la place de la théranostique dans la médecine personnalisée

Le résultat du test diagnostique en médecine personnalisée est déterminant pour choisir le protocole thérapeutique. Pour que la thérapie ciblée soit efficace, elle n'est administrée qu'en cas de test diagnostique positif. Dans le cas contraire, les protocoles standards de traitement à la pathologie seront appliqués. Le principe pour la théranostique est le même, la différence réside dans l'utilisation d'une molécule vectrice unique pour le test diagnostique et la thérapie, avec l'intérêt supplémentaire, de pouvoir suivre avec le même test diagnostique l'efficacité de la thérapie.

2. La théranostique en médecine nucléaire

a. Définition

Le concept de « théranostic » en médecine nucléaire s'appuie sur l'utilisation pour le diagnostic et la thérapie d'un unique radiopharmaceutique ou de deux radiopharmaceutiques très similaires.

Un radiopharmaceutique est un médicament utilisé pour la réalisation d'exams d'imagerie, mais aussi pour des protocoles de thérapie. Il se définit selon le Code de la Santé Publique comme, « tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radionucléides, incorporés à des fins médicales » ([Articles L5121-1 à L5121-21 - Légifrance](#) s. d.). Le plus souvent, comme cela est représenté dans la **Figure 2**, un radiopharmaceutique sera composé d'une molécule biologique, appelée « vecteur », qui va cibler spécifiquement une particularité phénotypique ou métabolique des cellules d'intérêt, lié par un ligand à un radionucléide avec des propriétés d'émission adaptées au diagnostic ou à la thérapie ([Vermeulen et al. 2019](#)). Parfois, un radionucléide seul pourra être utilisé comme un radiopharmaceutique. C'est le cas de l'iode, un substrat naturellement capté par la thyroïde qui ne nécessite donc pas d'être vectorisé ([Schlienger, Goichot, et Grunenberger 1997](#)).

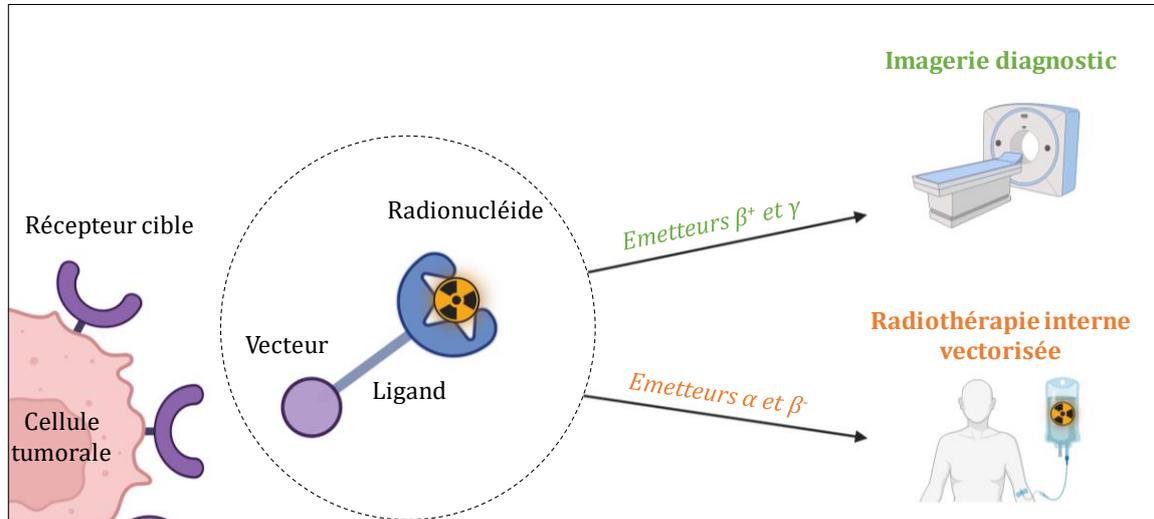


Figure 2. Principe d'utilisation des radiopharmaceutiques en médecine nucléaire (réalisée sur Biorender.com)

Un vecteur spécifique pour un récepteur cible exprimé par les cellules tumorales est couplé à l'aide d'un ligand à un radionucléide pour former un radiopharmaceutique. Les propriétés d'émission du radionucléide composant le radiopharmaceutique vont définir son rôle : les radionucléides émetteurs de rayonnements β^+ et γ vont permettre de réaliser un diagnostic par l'imagerie moléculaire, alors que les radionucléides émetteurs de rayonnements β^- et α vont être utilisés comme agent thérapeutique pour la radiothérapie interne vectorisée.

En pratique, le radiopharmaceutique sera administré la plupart du temps par voie intraveineuse (i.v) pour se distribuer dans l'ensemble de l'organisme avant d'atteindre sa cible. Ainsi, par le biais des rayonnements émis, l'injection de radiopharmaceutique permet un diagnostic fonctionnel ou phénotypique des tissus tumoraux, établi à partir de l'étude de son devenir dans l'organisme (sa pharmacocinétique) et sa distribution dans les tissus d'intérêts. Le radiopharmaceutique thérapeutique sera quant à lui, composé du même vecteur que pour le diagnostic et lié à un radionucléide dont les rayonnements émis permettent de détruire spécifiquement les tissus cibles sans trop impacter les organes sains non ciblés (Gudkov et al. 2015). Cette pratique thérapeutique se distingue de la radiothérapie externe qui, comme son nom l'indique, irradie les cellules tumorales avec une source de rayonnement extérieure à l'organisme. Dans notre cas, on parle de radiothérapie interne vectorisée (RIV)(Sadeghi, Enferadi, et Shirazi 2010).

Concernant le vecteur, il peut s'agir d'un anticorps ou de fragment d'anticorps, de peptides, de petites molécules (Reubi et Maecke 2008; Knowles et Wu 2012). Le radionucléide qui sera transporté jusqu'aux tumeurs grâce au vecteur sera choisi pour ses capacités d'émission pour une application d'imagerie diagnostique (avec les particules β^+ ou rayonnements gamma) ou pour la RIV (avec les particules α , électrons Auger ou β^-) (Figure 2).

b. Historique et évolution de la théranostique

Historiquement, alors que le terme « théranostic » n'existait pas encore, la première étude en médecine nucléaire reposant sur ce principe a été réalisée en 1946 (Seidlin, Marinelli, et Oshry 1990). Cette étude reposait sur le tropisme naturel de la forme iodure de l'iode pour le tissu thyroïdien via le symporteur sodium/iodure (NIS), une glycoprotéine surexprimée sur les membranes des thyrocytes (Eskandari et al. 1997; Plantin-Carrenard, Foglietti, et Beaudeau 2005). Dans cette étude, une administration par voie orale d'une dose à l'état de trace (<74 MBq) d'iode-131/iode-130 a permis de détecter, à l'aide d'un compteur Geiger, les métastases d'un adénocarcinome thyroïdien avec plus de précision que la radiographie qui ne laissait pas apparaître l'ensemble des métastases. Après ce diagnostic, un traitement par l'administration orale de plusieurs doses thérapeutiques d'iode-131/iode-130 (de 20,5 à 55 millicuries) a été effectué et a permis de contrôler l'évolution de la maladie. Après cette découverte et depuis les années 80, les patients dont on soupçonne un cancer de la thyroïde peuvent être diagnostiqués par scintigraphie à l'iode-123 ($\text{Na}^{[123\text{I}]}\text{I}$) ou au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Per technetate qui est assimilé par le tissu thyroïdien de la même manière que l'iode (Kusić et al. 1990). Ces deux radiopharmaceutiques permettent d'identifier les nodules thyroïdiens qui ont une forte activité métabolique. Pour confirmer ou infirmer la caractère cancérigène de ces nodules, un diagnostic complémentaire par imagerie TEP au 2- ^{18}F F-FDG ou au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Tc-MIBI va permettre de mettre en évidence respectivement l'inflammation ou l'activité mitochondriale des nodules (de Koster et al. 2018).

Enfin, après chirurgie de la tumeur primaire, une dose thérapeutique de Na^{[123]I} sous forme de gélules sera administrée comme traitement adjuvant pour limiter la reprise tumorale, et ce chez les patients à haut risque comme chez les patients à faible risque (Ren, Li, et Wang 2016; Giovanella et al. 2022).

Depuis, l'intérêt pour la théranostique n'a fait que de s'accroître comme le démontre la **Figure 3** avec le nombre de publications sur PubMed incluant le terme « Theranostic » ou « Theragnostic ». Aujourd'hui, de nombreux radiopharmaceutiques ont été développés et évalués en préclinique et en clinique. Plusieurs facteurs, qui seront discutés dans la suite de cette introduction, ont permis ces avancées, dont : la diversité actuelle de molécules vectrices toujours plus spécifiques, la production et la disponibilité de nouveaux radionucléides plus intéressants pour une utilisation en théranostique ainsi que, les progrès techniques concernant la spécificité en imagerie médicale.

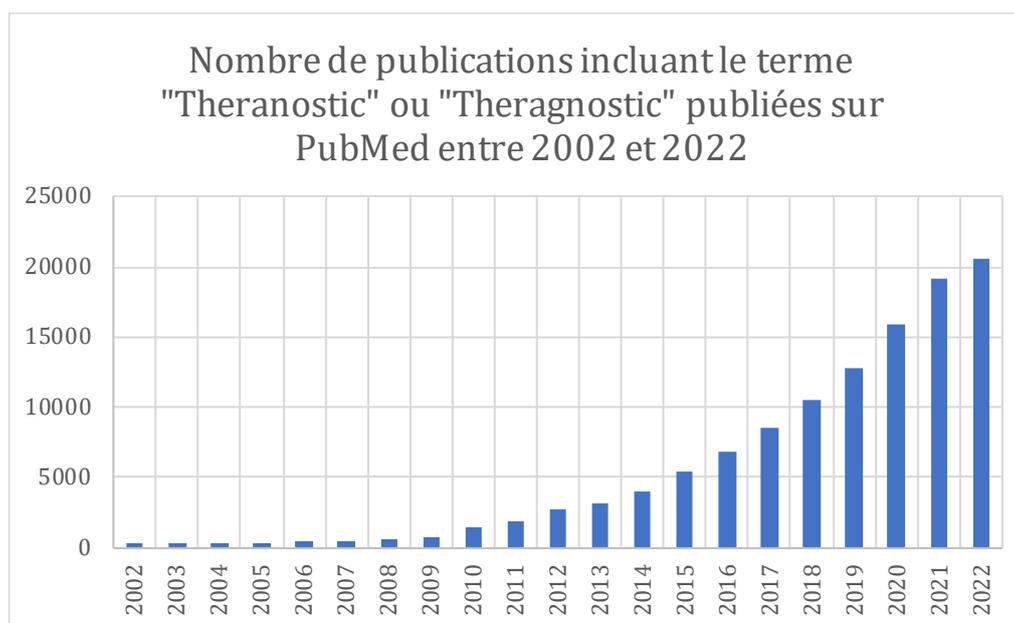


Figure 3. Évolution du nombre de publications incluant le terme « Theranostic » ou « Theragnostic » entre 2002 et 2022 (recherche effectuée sur PubMed le 21/12/2022)

c. La théranostique en clinique

Au cours de la dernière décennie, de nouveaux radiopharmaceutiques développés pour une application théranostique ont été approuvés par l'Agence européenne du médicament (EMA), deux paires sont largement utilisées en routine. La première paire concerne toute une classe de peptides analogues des récepteurs de la somatostatine (SST) couplés à différents radionucléides, développée et testée en clinique pour l'imagerie diagnostique et le traitement des tumeurs

neuroendocrines (TNE) qui surexpriment ce récepteur (Buchmann et al. 2007; Bodei et al. 2016). Ainsi, depuis 2016, l'EMA a approuvé l'utilisation de trois radiopharmaceutiques peptidiques, le [⁶⁸Ga]Ga-DOTATATE, [⁶⁸Ga]Ga-DOTATOC et le [⁶⁸Ga]Ga-DOTANOC, qui ont démontré une grande affinité pour le récepteur et qui permettent une imagerie TEP de haute résolution des TNE avec le gallium-68 ($t_{1/2} = 67,8$ minutes ; β^+ 88% ; CE 12%) (Buchmann et al. 2007; Virgolini et al. 2010). A partir des images TEP, les patients dont les tumeurs expriment fortement les SST sont sélectionnés pour une RIV avec du lutetium-177 ($t_{1/2} = 6,647$ jours ; β^- 100% ; γ 17,2%) avec le [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTATATE qui a montré son intérêt dans l'essai clinique de phase 3 (NETTER-1) pour le traitement des TNE de l'intestin (Strosberg et al. 2017).

La seconde paire de radiopharmaceutiques a aussi été développée à partir de vecteurs peptidiques, ils ciblent un antigène spécifique de la prostate (PSMA) et ont obtenu leur autorisation de mise sur le marché (AMM) pour la prise en charge des patients atteints du cancer de la prostate résistant à la castration. L'essai clinique VISION de phase 3 a montré l'avantage thérapeutique de l'utilisation complémentaire du [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 au traitement de soutien (hormonothérapie, radiothérapie et/ou glucocorticoïdes) par rapport au traitement de soutien seul pour augmenter la survie sans progression des patients (médiane de 8,7 mois contre 3,4 mois) (Sartor et al. 2021). Les patients sélectionnés pour l'étude présentaient un mauvais pronostic avec des tumeurs positives au [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 utilisé pour le diagnostic et la stadification des cancers de la prostate depuis 2012 (Eder et al. 2012; Vaz et al. 2020). Un suivi de l'évolution de la maladie pendant le traitement est aussi possible avec l'injection du [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 qui permet de faire de l'imagerie par tomographie par émission monophotonique (TEMP) (Baum et al. 2016). Chez les patients qui ne répondent pas au [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617, de premiers essais cliniques ont été réalisés avec un émetteur de particules alpha, l'actinium-225, prometteur pour une utilisation en RIV (Yadav et al. 2020).

3. L'imagerie moléculaire

a. Historique

L'imagerie moléculaire est un type d'imagerie utilisé en médecine nucléaire et en recherche préclinique permettant la visualisation en 3 dimensions et dans l'ensemble de l'organisme de la répartition d'un radionucléide administré à l'état de trace dans l'ensemble de l'organisme. L'imagerie moléculaire (ou fonctionnelle) est complémentaire aux imageries dites « anatomiques » telles que l'IRM ou la TDM qui permettent d'observer avec une grande précision la structure des organes et tissus, mais ne permettent pas d'observer leur fonctionnalité. Les exemples d'imagerie diagnostique évoqués ci-dessus emploient les deux principales techniques d'imagerie moléculaire utilisées en médecine nucléaire, la TEP et la TEMP (Rahmim et Zaidi 2008). Dans les deux cas, le médicament radiopharmaceutique sera administré, le plus souvent par voie

intraveineuse, chez l'humain ou l'animal pour étudier son devenir dans l'organisme. L'acquisition des images permettra une visualisation des sites de distribution dans les différents tissus et organes d'intérêt ainsi que des voies d'élimination du radiopharmaceutique. Ces deux techniques d'imagerie reposent sur des principes spécifiques de détection qui s'appuient sur les propriétés d'émission des radionucléides employés.

L'imagerie TEMP est la technique la plus utilisée en médecine nucléaire, elle s'appuie sur l'utilisation de radionucléides qui émettent des rayonnements gamma. Des caméras spécifiques vont détecter le photon émis lors de la décroissance du radionucléide. Le détecteur est composé d'un cristal scintillant permettant la conversion du signal reçu en lumière visible, cette lumière est ensuite converti en signal électrique avec un photomultiplicateur. Ce type de caméra, appelé caméra Anger, a été développé dans les années 50 (Anger 1952). Les premiers travaux à l'origine de l'imagerie TEMP ont été initiés à la fin des années 1950 par les chercheurs David Kuh et Roy Edwards, dont l'objectif était d'associer l'imagerie tomographique, utilisée en radiographie depuis les années 30 grâce aux principes théoriques développés par le Physicien André Bocage (« ANDRÉ BOCAGE (1892-1953)--FRENCH TOMOGRAPHER » 1965), à la détection des radionucléides dans l'organisme avec les gamma caméras. Après quelques années de développement, les premiers appareils pour la TEMP composés de caméras Anger ont pu être utilisés (Figure 4) (Anger et McRae 1968; Jaszczak et al. 1977).

Cette technique d'imagerie a l'avantage d'utiliser des radionucléides facilement disponibles comme l'iode-123 ou le technétium-99m. On retrouve selon une enquête nationale de la SFMN (Société Française de Médecine Nucléaire et Imagerie Moléculaire) réalisée en 2021, 247 caméras TEMP/TDM réparties en France et on compte 165 examens TEMP/10 000 habitants.

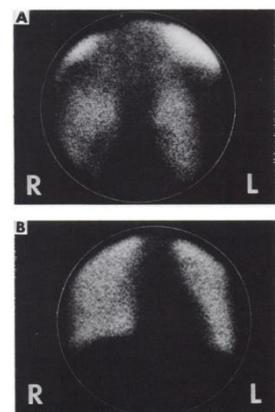


Figure 4. Une des premières images TEMP au technétium-99m d'un thorax humain (Anger et McRae 1968)

A) en vue antérieure B) et en vue latérale. R : right (droite) ; L left (gauche)

Concernant l'imagerie TEP, c'est en 1951 que le Docteur William H. Sweet et le Professeur Gordon L. Brownell de l'hôpital général du Massachusetts ont évoqué pour la première fois, l'idée d'utiliser des émetteurs de positons en imagerie médicale. Il s'en suit dans les années 50 et 60 plusieurs

tentatives peu concluantes de conception d'imageurs à positons, mais qui en démontreront tout de même la faisabilité (Brownell et Sweet 1956; Rankowitz et al. 1961). En 1975, les travaux de Michel Ter-Pogossian, Michael E. Phelps et Edward J. Hoffman ont permis de mettre au point le premier tomographe transaxial à émission de positons (Ter-Pogossian et al. 1975; Phelps et al. 1975). L'année suivante, l'imagerie TEP arrive en clinique avec les premières images TEP de tumeurs cérébrales chez des patients (Figure 5) (Hoffmann et al. 1976).

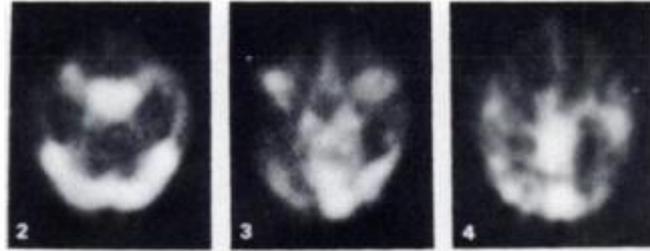


Figure 5. Premières images TEP d'un cerveau humain utilisant le $[^{11}\text{C}]\text{CO-Carboxyhémoglobine}$ (Hoffmann et al. 1976)

Après sept ans de développement, le premier prototype fonctionnel combinant la TEP avec la TDM a vu le jour en 1998 au sein du Centre médical de l'Université de Pittsburgh (Beyer et al. 2000). Depuis, les systèmes n'ont cessé de se développer notamment avec l'optimisation de nouvelles technologies pour les détecteurs avec des photodiodes en avalanche et des photomultiplicateurs en silicium qui ont amélioré la résolution temporelle. De plus, les progrès concernant la réduction de la taille des détecteurs ont permis d'augmenter leur nombre par appareil et ainsi d'augmenter la sensibilité des imageurs TEP (Jiang, Chalich, et Deen 2019). Selon une enquête nationale de la SFMN réalisée en 2021 on retrouve 167 caméras TEP/TDM réparties en France (« ENQUÊTE NATIONALE ANNUELLE » s. d.). Depuis cette date, de nouveaux progrès ont été réalisés sur les TEP, et des systèmes dits « grand champ » commencent à être disponibles, depuis quelques années. Ces systèmes révolutionnaires permettent l'acquisition d'une imagerie TEP corps entier en des temps très courts (entre 2 et 5 minutes contre environ 20 minutes avec un système « classique ») (Cherry et al. 2018; Ng et al. 2022).

b. Imagerie TEP vs. Imagerie TEMP

D'un point de vue du coût et de l'accessibilité des radioisotopes nécessaires à la TEMP, l'utilisation de cette technique d'imagerie semble plus avantageuse (Crişan et al. 2022). Cependant, d'un point de vue de la performance diagnostique de l'imagerie, la TEP est supérieure. L'un des principaux avantages de la TEP est lié à sa résolution d'image de 3-4 mm en clinique (Decazes et al. 2020), alors qu'elle n'est que de 10-15 mm pour la TEMP (Buchmann et al. 2007). Cette différence de résolution est représentée dans la Figure 6. De plus, l'énergie photonique des

radioisotopes utilisés en TEP subit moins les phénomènes d'atténuation du signal lors du parcours des rayonnements dans la matière jusqu'aux détecteurs que la TEMP, ce qui rend les images plus facilement interprétables (Crişan et al. 2022). L'imagerie TEP a aussi l'avantage d'être plus spécifique et discriminante lors d'un examen diagnostique. C'est cette efficacité qui rend son utilisation plus attractive. Les travaux cliniques de Buchmann et al. 2007 traduisent cette différence de spécificité et d'efficacité. En effet, l'imagerie diagnostique comparative de tumeurs neuroendocrines chez les patients a été réalisée en TEMP et en TEP respectivement avec le $[^{111}\text{In}]\text{In-DTPAOC}$ et le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTATOC}$. Cette étude a mis en évidence de nombreux sites de fixation contradictoires entre les deux radiopharmaceutiques, avec notamment de nombreux points de fixation du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTATOC}$ non retrouvés avec l' $[^{111}\text{In}]\text{In-DTPAOC}$. L'ensemble des discordances qui ont pu être investiguées par IRM ont démontré l'efficacité de diagnostic de la TEP en comparaison à la TEMP qui elle, n'a pas pu mettre en évidence un grand nombre de sites tumoraux. Enfin, toutes ces différences entre les deux techniques ont aussi un impact sur la quantification des images. Cette quantification est importante d'un point de vue théranostique pour pouvoir ensuite mettre en place une thérapie adaptée. Elle sera ainsi plus précise et facile à partir de l'imagerie TEP que de l'imagerie TEMP (Ritt et al. 2011).

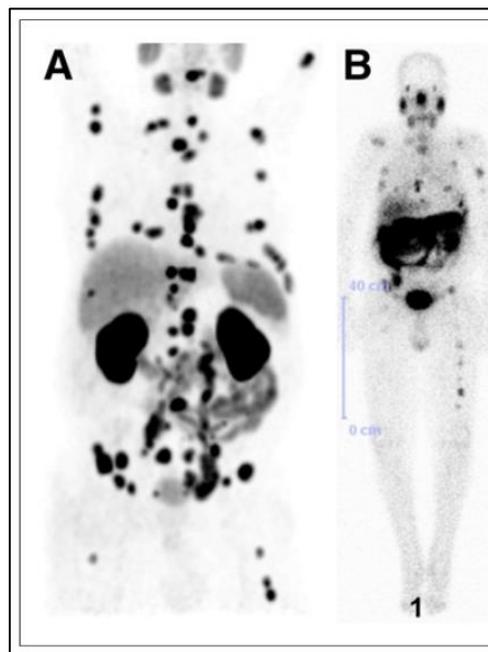


Figure 6. Démonstration de la supériorité de la résolution et de la spécificité de la TEP au gallium-68 (A) en comparaison de la TEMP au lutétium-177 (B) dans l'imagerie des récepteurs PSMA (Baum et al. 2016)

Les deux examens ont été réalisés chez un même patient. La TEP au $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA}$ permet de distinguer avec un bon contraste l'ensemble des métastases alors que la TEMP au $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA}$ ne permet pas de voir distinctement l'ensemble des métastases observées en TEP.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons eu accès à une TEP pour l'imagerie du petit animal. De plus, la proximité du cyclotron de Arronax à Saint-Herblain nous a permis de travailler avec un radioisotope adapté à cette technique d'imagerie. C'est pourquoi, dans la suite de cette introduction, la tomographie par émission de positons et son intérêt en théranostique seront développés.

c. Le principe de détection de la TEP

La technique repose sur l'injection en faible quantité (dose traceuse) d'un radiotraceur ciblant spécifiquement un tissu ou une fonction. Le radionucléide va émettre des rayonnements de type β^+ lors de sa désintégration. Ces rayonnements sont issus de noyaux instables trop riches en protons et au sein desquels, un proton va se transformer en neutron. Cette transformation va induire l'émission d'un positon (ou antiélectron) et d'un neutrino. Après un court trajet dans les tissus durant lequel le positon va perdre son énergie cinétique par collision électron-positon ou rayonnement de freinage, ce dernier va s'associer avec un électron de la matière et le couple positon-électron va s'annihiler. Cette annihilation va induire l'émission de deux photons gamma d'une énergie de 511 keV chacun, émis selon la même direction, mais dans des sens diamétralement opposés (un angle de 180°). Les 2 photons émis simultanément seront alors détectés par la caméra TEP qui est constituée de blocs détecteurs positionnés en anneau autour du patient (ou l'animal) (**Figure 7**) ([Townsend 2004](#)). Un événement sera enregistré lorsque deux des détecteurs seront touchés de manière simultanée. Le lieu de l'annihilation se situera sur la ligne droite dite de coïncidence qui passe par les deux détecteurs. Le croisement des lignes de coïncidence permettra de localiser de façon précise le lieu d'annihilation et avec une précision moins importante, l'endroit où se localise le radionucléide responsable des désintégrations nucléaires. La reconstruction par ordinateur des images TEP coupe par coupe permettra finalement une reconstruction en 3 dimensions d'une image représentant la distribution du radionucléide dans l'ensemble de l'organisme.

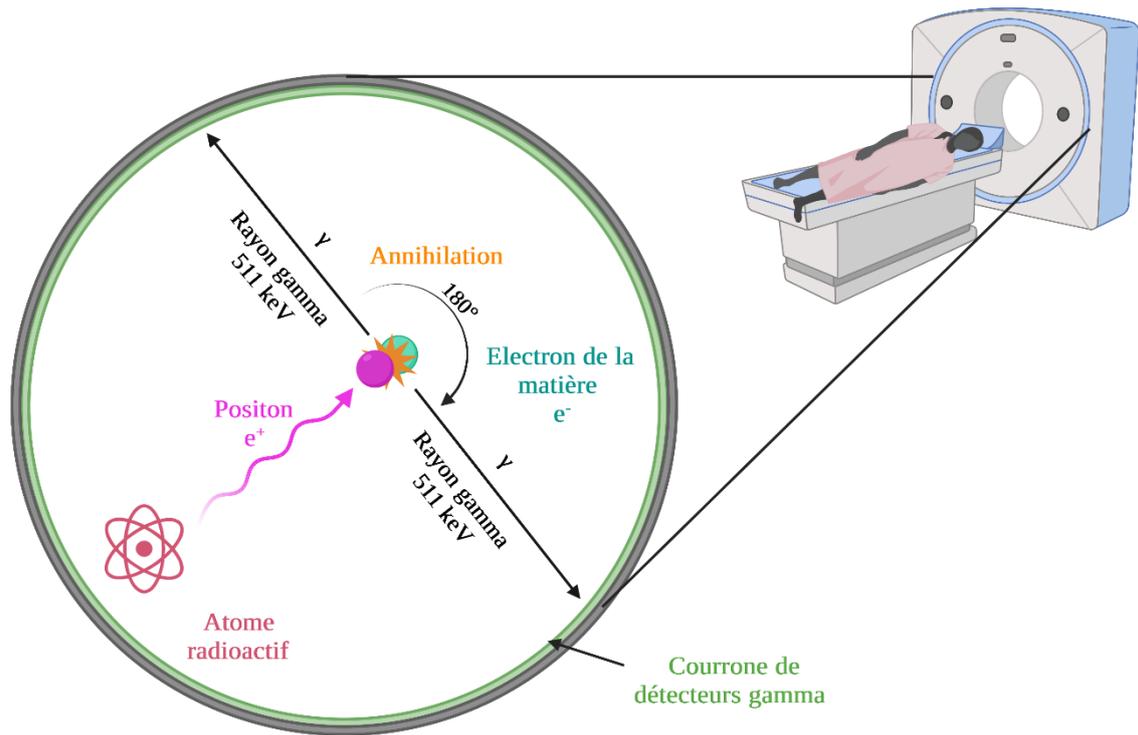


Figure 7. Représentation schématique du principe de détection de la TEP (réalisé sur Biorender.com)

Après l'injection par exemple par voie i.v du radiopharmaceutique, dans la circulation sanguine, le patient est installé dans l'appareil TEP-TDM. L'atome radioactif du radiopharmaceutique émet des positons qui s'annihilent avec les électrons de la matière. Cette réaction entraîne l'émission de deux photons gamma, de 511 keV chacun, dans des directions diamétralement opposées. La couronne de détecteurs placée autour du patient va capter les photons émis. Les images obtenues, lors du même examen, de la TEP et de la TDM vont être fusionnées par ordinateur pour reconstituer en 3D des images en coupe de la distribution du radiopharmaceutique dans l'organisme.

d. L'intérêt de l'imagerie TEP

Durant les 20 dernières années, afin d'affiner le diagnostic et le pronostic des patients, la fusion d'images anatomiques et fonctionnelles, reconstruites par ordinateur, a été développée et est aujourd'hui largement utilisée. Ainsi, la TEP est passée d'une imagerie fonctionnelle à une modalité à une imagerie hybride ou bimodale avec l'association d'une TDM ou d'une IRM. Ce type d'examen d'imagerie permet d'obtenir des informations précises sur l'étendue (bilan d'extension) et l'état d'avancement de la maladie pour prédire l'efficacité des traitements envisagés. Les améliorations technologiques de la TEP nous permettent aujourd'hui de réaliser des images d'une résolution de l'ordre de 3 à 4 mm en clinique (Decazes et al. 2020). Pour l'imagerie préclinique, cette résolution est de l'ordre de l'inframillimétrique (0,1-1 mm), elle est permise grâce au faible diamètre de l'anneau détecteur de ces caméras dédiées aux animaux (Kim et Lee 2022). En parallèle, les avancées en termes de production de radionucléides innovants pour une utilisation

en clinique avec notamment des périodes plus longues, et l'augmentation de radiopharmaceutiques utilisables en imagerie TEP (Vaz et al. 2020), font, qu'aujourd'hui, l'imagerie TEP est devenue indispensable pour diagnostiquer de façon certaine les patients atteints d'un cancer, mais aussi pour leur proposer le traitement le plus adapté.

Avant l'arrivée de la TEP, la sélection des patients susceptibles de répondre à une thérapie ciblée reposait sur la réalisation d'une biopsie invasive suivie d'une analyse immunohistochimique. Le principal problème avec cette méthode est lié à l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale. Le prélèvement d'un échantillon sur une tumeur primaire ou une métastase peut se révéler non représentatif du type de cancer (Marusyk et Polyak 2010) et induire la mise en place d'une thérapie inefficace. La TEP quant à elle est une méthode non invasive permettant de par la spécificité des radiopharmaceutiques utilisés pour une cible donnée, de mettre en évidence d'une éventuelle hétérogénéité tumorale. Les travaux de Bensch et al., 2018 illustrent cette utilisation des radiopharmaceutiques. Dans le diagnostic du cancer du sein, ils ont utilisé un anticorps radiomarqué au zirconium-89, le $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Trastuzumab}$, ciblant spécifiquement le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique (HER2) pour réaliser l'imagerie TEP de la répartition tissulaire du récepteur HER2 dans le corps entier. À la suite de ce premier diagnostic, une imagerie comparative au 2- $[^{18}\text{F}]\text{F-FDG}$ a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité de la répartition du récepteur HER2 au sein des tissus tumoraux et ainsi de, prédire l'efficacité des traitements anti-HER2. Ainsi l'association d'une imagerie fonctionnelle TEP performante, avec le développement de radiopharmaceutiques spécifiques d'un phénotype de cancer et injectés à dose traceuse permettrait de cartographier l'ensemble des sites métastatiques exprimant l'antigène ciblé dans le corps entier pour ensuite adapter le traitement administré. Elle permettrait aussi de suivre l'évolution de la maladie et la réponse au traitement en réalisant de nouvelles imageries TEP tout au long de la prise en charge du patient (Wei et al. 2020).

Le suivi longitudinal par l'imagerie TEP peut aussi nous fournir des informations essentielles quant à la biodistribution et à la pharmacocinétique du radiopharmaceutique dans les organes d'intérêt, mais aussi dans les tissus sains afin d'optimiser la mise en place d'une RIV. À partir de ces informations, des calculs dosimétriques permettront de prédire l'activité à injecter pour éradiquer les sites tumoraux tout en limitant les dommages aux tissus non spécifiques.

e. Le choix du radionucléide

Le choix du radionucléide à utiliser pour réaliser une acquisition TEP est important et répond à plusieurs besoins ou contraintes. Tout d'abord, la période physique du radionucléide doit être adaptée à la période biologique du vecteur pour optimiser l'imagerie. Par exemple, tous les vecteurs, comme les peptides ou les fragments d'anticorps, qui atteindront rapidement leur cible tumorale spécifique et qui ont une clairance sanguine très rapide, n'ont pas nécessité à être

utilisés avec des émetteurs avec une longue période radioactive, sauf si leur temps de rétention tumorale est long. Inversement, l'utilisation de vecteurs à pharmacocinétique lente, comme les anticorps complets par exemple (demi-vie sanguine > 24 h), pour réaliser une imagerie TEP doit prendre en compte cette caractéristique. Dans ce cas, les radionucléides de périodes longues seront plus adaptés pour réaliser des imageries TEP aux temps où le radiotracer sera présent en concentration importante dans les tissus cibles, mais en faible concentration dans les autres tissus (Wittrup et al. 2012). Il faudra aussi tenir compte des limites du système de détection de la TEP, qui dépend de la distance parcourue par le positon entre son site d'émission et son lieu d'annihilation. Cette distance est fonction de son énergie maximale au moment de l'émission : plus l'énergie est importante, plus la distance parcourue par le positon est importante. Le **Tableau 1** représente la corrélation entre le parcours moyen dans l'eau et l'énergie maximale du positon de différents radionucléides utilisés en imagerie TEP (Emond et al. 2019).

Tableau 1. La corrélation entre le parcours moyen (en mm) dans l'eau et l'énergie maximale (MeV) du positon de différents radionucléides (Tableau modifié à partir de Emond et al. 2019).

Radionucléide	Parcours moyen dans l'eau (mm)	Énergie maximale du positon (MeV)	Période radioactive (h)
fluor-18	0,44	0,63	1,83
zirconium-89	0,87	0,901	78,4
cuiivre-64	0,51	0,65	12,7
gallium-68	2,39	1,889	1,13
iode-124	3,4	2,137	100,2
rubidium-82	5,03	3,379	0,021

Selon le schéma d'émission complet des radionucléides, les éventuelles émissions de rayonnements gamma seront un facteur à considérer en termes de radioprotection pour éviter l'irradiation des proches du patient ou du personnel médical. Pour les centres d'imagerie nucléaire, la disponibilité des radionucléides est un autre paramètre important. Ainsi la proximité d'un cyclotron ou la possibilité d'avoir un générateur sur place comme cela existe pour des générateurs de gallium-68 (Martiniova et al. 2016) ou de rubidium-82 (Machac et al. 2006) peut être un facteur déterminant dans le choix du radionucléide utilisé.

Dans le cadre d'une approche théranostique, ce qui peut être encore plus intéressant, c'est l'utilisation de radionucléides possédant des isotopes émetteurs de particules β^- . On parle alors de « vraies » paires théranostiques, dont les plus intéressantes sont : iode-124/iode-131, yttrium-86/yttrium90, scandium-44/scandium-47 et cuiivre-64/cuiivre-67. Enfin, certains

radionucléides peuvent être utilisés à la fois comme des agents d'imagerie et des agents de thérapie, c'est par exemple le cas du lutetium-177, du cuivre-67 ou de l'iode-131, dont les émissions β^- permettent de mettre en place une RIV, mais qui émettent aussi des rayonnements gamma qui permettent de réaliser une imagerie TEMP.

f. Le choix du vecteur

De nombreux types de vecteurs peuvent être utilisés pour la production de radiopharmaceutiques à destination de l'imagerie et de la thérapie grâce à leur affinité spécifique pour une cible phénotypique tumorale. Afin de pouvoir être utilisés comme radiopharmaceutiques, ces vecteurs devront répondre à plusieurs critères.

- Principaux critères concernant le **radiomarquage** du vecteur :

Le vecteur doit pouvoir être radiomarké sans que cela entraîne une altération de la reconnaissance de la cible d'intérêt. Pour répondre à ce critère, il faut pouvoir conserver la structure tridimensionnelle du site de reconnaissance lors du radiomarquage. Pour cela, il faut choisir la position spécifique du radiomarquage sur le vecteur ou, si cela n'est pas possible, éloigner au maximum le site de radiomarquage de celui du site de reconnaissance ([Morais et Ma 2018](#)).

Les stratégies de fixation du vecteur au radionucléide vont nécessiter une fonctionnalisation du vecteur qui dépendra de la classe du radionucléide choisi, qui peut être métallique ou organique (halogènes, oxygène, azote, carbone) (**Figure 8**). Pour les radionucléides organiques, une simple bioconjugaison par liaison covalente avec une substitution électrophile ou nucléophile ([Zhou et al. 2009; 2017](#)) sera réalisée, soit directement sur le vecteur (radiomarquage direct), comme sur les tyrosines des anticorps ([Kaminski et al. 1993](#)), ou à l'aide d'un groupement prosthétique (radiomarquage indirect) ([Boudjemeline et al. 2018](#)). Pour les métaux, l'utilisation d'un ligand ou chélate bifonctionnel permettant la bioconjugaison, mais aussi la complexation du métal sera nécessaire (radiomarquage indirect) ([Wängler et al. 2011](#)). Ce chélate va aider à former un radiopharmaceutique plus stable et résistant avec une cage moléculaire autour du radionucléide qui empêchera le relargage du métal dans l'organisme ([Kostelnik et Orvig 2019](#)). Après cette fonctionnalisation, il sera nécessaire de vérifier que le vecteur est toujours capable de reconnaître sa cible moléculaire.

De plus, le radiopharmaceutique doit pouvoir être synthétisé facilement avec une pureté chimique suffisante qui ne nécessite pas d'étape de purification et un rendement de synthèse important. L'automatisation du radiomarquage peut répondre à cette nécessité en plus d'être un critère important du point de vue de la radioprotection (Lepareur 2022).

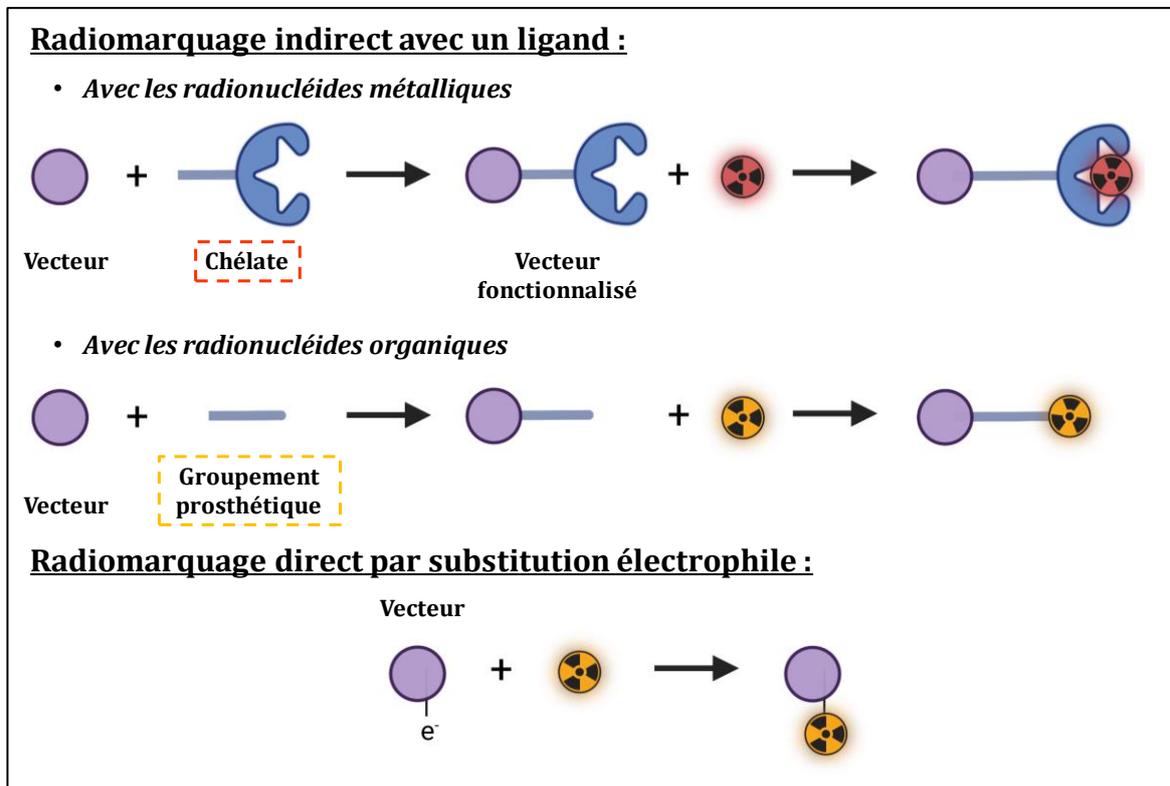


Figure 8. Représentation schématique des principales stratégies de radiomarquage de vecteurs pour la production de radiopharmaceutiques (réalisé sur Biorender.com)

Les radiomarquages nécessitant l'intermédiaire d'un ligand sont dits « indirects », on parlera de chélate lorsque le radionucléide sera métallique et de groupement prosthétique pour les radionucléides organiques. Pour les radionucléides organiques, une voie de radiomarquage directe peut être possible, comme avec une substitution électrophile.

- Principaux critères **biologiques** concernant le choix du vecteur :

Au niveau des critères biologiques, l'affinité et la spécificité de fixation du vecteur sur sa cible vont permettre une accumulation du radiopharmaceutique dans ou au niveau de la tumeur. Dans un milieu biologique, l'affinité du vecteur pour sa cible est représentée par la constante d'affinité K_a :

$$K_a = \frac{\text{forme fixée}}{\text{forme libre} * \text{sites de fixation}}$$

Le rapport entre la forme fixée et libre du vecteur se traduit en imagerie TEP par le rapport signal tumoral/bruit de fond. Pour augmenter le rapport en faveur du signal tumoral, il faut augmenter l'affinité de la molécule pour sa cible (Wei et al. 2020). Concernant la spécificité, il faut pouvoir s'assurer que le vecteur ne ciblera que les tissus tumoraux. Généralement, des études d'histopathologie de différentes biopsies de tissus tumoraux, mais aussi de tissus sains sont réalisées pour s'assurer de cette spécificité (Bailly et al. 2019). Cette technique de révélation de la fixation du vecteur étant pratiquée sur des échantillons tumoraux prélevés ou sur des modèles in vitro pour les études précliniques, elle ne permet pas d'affirmer que le vecteur, avec les différentes barrières physiologiques qui existent, sera en mesure d'accéder à cette cible in vivo (Raaphorst et al. 2017).

Les paramètres pharmacocinétiques du vecteur sont aussi des critères fondamentaux à prendre en compte. Pour réaliser l'imagerie ou la thérapie dans de bonnes conditions, il faut que le vecteur arrive sur la cible tumorale le plus rapidement possible et qu'il y reste suffisamment longtemps (Tornesello et al. 2017). Concernant la pharmacocinétique du vecteur dans les tissus sains, il faut que la clairance du vecteur dans ces tissus soit rapide. Avoir une bonne clairance du radiopharmaceutique au niveau des tissus sains évitera aussi une toxicité lors du traitement (Knowles et Wu 2012).

Il est évidemment peu probable de trouver des vecteurs qui pourront répondre à l'intégralité des critères décrits ci-dessus. Les critères les plus importants selon l'utilisation du radiopharmaceutique en imagerie ou en thérapie seront retenus pour le choix du vecteur. En imagerie, il faut chercher à optimiser la dose injectée au patient pour obtenir la meilleure image possible tout en injectant l'activité la moins importante possible. Alors qu'en thérapie, il faut augmenter au maximum la dose délivrée au niveau de la tumeur tout en contrôlant les doses délivrées aux tissus sains afin qu'elles soient acceptables en terme de toxicité. Afin d'optimiser ces choix de radiopharmaceutiques et donc par extension de vecteurs, des études précliniques et cliniques de dosimétrie sont réalisées. La rétention du radiopharmaceutique dans les organes et son temps d'élimination vont permettre de déterminer l'activité cumulée qui servira au calcul de la dose absorbée par un tissu ou un organe donné (Graves et Hobbs 2021).

Dans les types de vecteurs pouvant être utilisés, on retrouve principalement des vecteurs immunologiques et des petites molécules comme le DOTA-TATE et le PSMA décrit ci-dessus.

i. Les peptides

Les peptides représentent une classe de molécules ayant un intérêt croissant pour le ciblage du cancer. Ce sont des vecteurs immunologiques de petite taille (jusqu'à 10 kDa) formés d'une combinaison d'un nombre variable d'acides aminés liés par leur fonction amino-terminale

(NH₂) et carboxy-terminale (COOH). Cette petite taille leur confère des capacités de diffusion tissulaire intéressantes (Reubi 2003).

Il est à noter que les peptides endogènes présentent une très forte affinité pour leurs récepteurs, mais leur courte demi-vie (quelques minutes) est un frein à leur utilisation comme vecteurs. Par conséquent, des analogues de synthèse, conservant une petite taille, mais à demi-vie plus longue ont été développés. Ces analogues peptidiques sont facilement synthétisables et modifiables via leur fonction terminale amine primaire ou acide carboxylique afin de conférer des caractéristiques innovantes. Ces sites accessibles chimiquement via des synthèses en phase solide n'altèrent généralement pas leur fonctionnalité (Reubi et Maecke 2008).

Dans le ciblage du cancer, il est intéressant d'utiliser des peptides régulateurs de fonctions biologiques que l'on retrouve surexprimées dans de nombreux cancers (Reubi 2003). Ces fonctions s'exercent le plus souvent par l'intermédiaire de récepteurs à haute affinité, spécifiques, généralement couplés à des protéines G. Il faudra néanmoins prendre en compte le fait que les peptides analogues seront internalisés après fixation sur les récepteurs, alors que les peptides antagonistes ne le sont pas en général (Mikołajczak et Maecke 2016).

L'exemple le plus représentatif de cette classe moléculaire est celui de la somatostatine, dont les récepteurs sont fortement exprimés dans les tumeurs neuroendocrines sécrétantes (Reubi 2003). La somatostatine est un peptide utilisé pour inhiber les sécrétions hormonales endocrines et exocrines des cellules tumorales, son utilisation réduit les symptômes induits par les cellules cancéreuses (syndrome carcinoïde, hyperglycémie) (Gomes-Porras, Cárdenas-Salas, et Álvarez-Escolá 2020). Comme décrit au préalable, plusieurs radiopharmaceutiques ciblant le SST sont utilisés en clinique comme le [⁶⁸Ga]Ga-DOTATOC pour l'imagerie TEP (Hennrich et Benešová 2020) ou le [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTATATE pour la thérapie (Strosberg et al. 2017; Hennrich et Kopka 2019) (Figure 9).

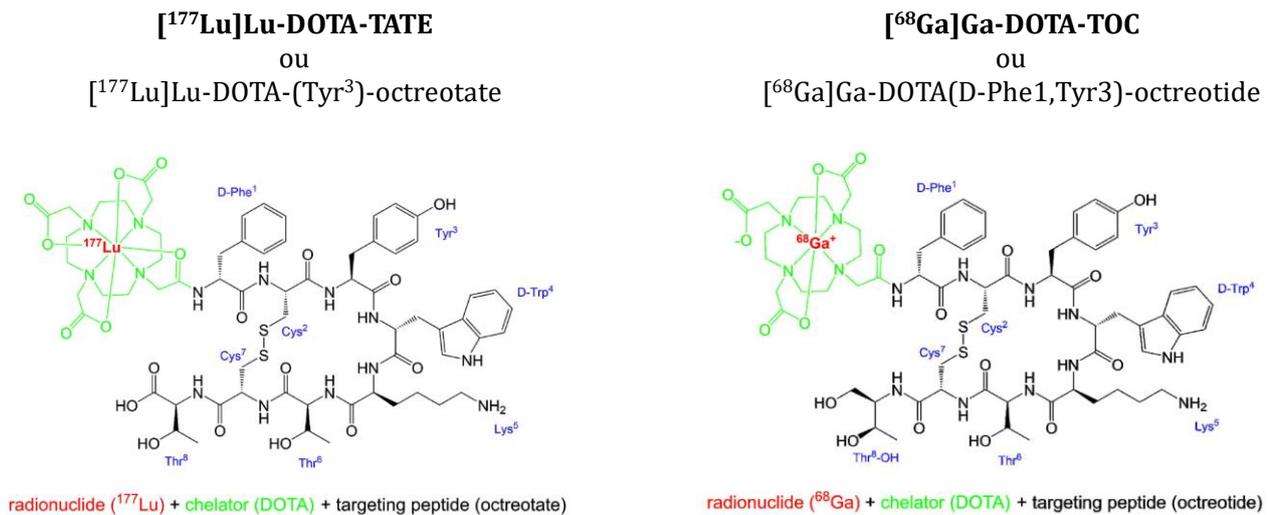


Figure 9. Structures chimiques du [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-TATE et du [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TOC
(Hennrich et Kopka 2019; Hennrich et Benešová 2020)

Les peptides présentent tout de même des caractéristiques liées à leur pharmacocinétique et leur métabolisme qu'il faut prendre en compte :

En effet, les peptides ont très souvent une distribution sanguine rapide. Cette caractéristique n'est pas un inconvénient lorsque leur temps de rétention dans la tumeur est suffisamment long. Elle permet au contraire d'éviter une toxicité sanguine importante, tout en conservant la fonction diagnostique ou thérapeutique. Une autre particularité des peptides est leur métabolisation précoce par des enzymes protéolytiques ou peptidases. En effet, une fois dans l'organisme, les peptides seront dégradés par des enzymes ubiquitaires que sont les peptidases (Froidevaux et Eberle 2002).

Des stratégies d'optimisation permettant de contourner cette métabolisation peuvent être mises en place lors de l'utilisation de vecteurs peptidiques. Des modifications structurales du peptide d'origine peuvent être réalisées pour augmenter la stabilité des peptides dans l'organisme (Tornesello et al. 2017). C'est notamment ce qui a été réalisé pour les radiopharmaceutiques peptidiques ciblant les récepteurs de la somatostatine. En effet, les peptides utilisés en clinique sont des analogues de la somatostatine modifiés pour améliorer leur pharmacocinétique et leur stabilité in vivo (Bauer et al. 1982). Enfin, la pharmacocinétique des vecteurs peptidiques dépendra aussi de leur composition et de la charge globale du radiopharmaceutique. Cela a pu être mis en évidence avec l'utilisation du DOTA-TATE qui du fait de sa charge globale se fixe de façon importante dans les reins (Bodei et al. 2008). Cette accumulation importante dans les reins peut être à l'origine d'une néphrotoxicité non négligeable lors des protocoles de RIV à base de radiopeptides. Afin de limiter cette fixation au niveau des tubules rénaux, une solution chargée

positivement à base de lysine et d'arginine est coadministrée avec le radiopharmaceutique, permettant une saturation des transporteurs au niveau du tubule proximal ([Hammond et al. 1993](#); [Jamar et al. 2003](#)).

ii. Les anticorps monoclonaux et leurs dérivés

Les anticorps monoclonaux (AcM) sont des agents thérapeutiques d'intérêt en immunothérapie anti cancéreuse depuis la fin des années 1970 ([Goldenberg et al. 1978; 1980](#)). Depuis, leur développement a connu un réel succès couronné en 2021, par une approbation de la Food and Drug Administration (FDA) et de l'EMA de la première utilisation en clinique de 11 nouveaux anticorps pour une application thérapeutique ([Kaplon et al. 2022](#)). En médecine nucléaire, ils sont utilisés comme vecteurs aussi bien en imagerie qu'en thérapie et représentent donc des vecteurs d'intérêt en théranostic. Les anticorps utilisés peuvent être de différents formats :

- Des immunoglobulines entières de type G (IgG) :

Les IgG sont composées de quatre chaînes polypeptidiques, deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. L'association de ces chaînes forme deux domaines (**Figure 10**) : le domaine constant Fc et les domaines variables Fv sur lesquels se trouve le paratope qui reconnaît spécifiquement l'épitope de l'antigène ciblé. Le principal intérêt autour de ces vecteurs est dû à leur efficacité de ciblage. Ils sont en effet, très affins pour leur antigène, mais ce sont aussi des protéines très stables et faciles à produire ([Steinmeyer et McCormick 2008](#)). D'autre part, ils ont la capacité de cibler toute sorte d'antigènes, et il est possible d'obtenir des anticorps très spécifiques d'antigènes exprimés presque exclusivement par les cellules tumorales ou les cellules de l'environnement tumoral. Cependant, les anticorps sont des vecteurs immunologiques de grande taille (150 kDa) qui ne peuvent pas être filtrés par les glomérules rénaux, ce qui leur confère une demi-vie sanguine relativement plus longue (3-4 semaines) que celle des peptides ([Pouget et al. 2011](#)). Cette caractéristique nécessite d'associer à l'IgG un radionucléide avec une demi-vie suffisamment longue pour réaliser une image tardive (4 à 7 jours p.i), et ainsi, améliorer le rapport tumeur/sang ([Knowles et Wu 2012](#)).

- Des dérivés d'anticorps :

Afin de pallier certains inconvénients des IgG, des dérivés présentant une homologie plus ou moins importante avec les IgG ont été développés, tels que des IgG chimériques ou humanisées produites à l'aide de vecteurs d'expression ([Bourel et Teillaud 2006](#)). De même, et de façon à améliorer leurs propriétés pharmacocinétique, des dérivés d'anticorps de taille plus petite peuvent être produits. Ces modifications peuvent diminuer l'affinité des vecteurs pour la tumeur,

mais elles permettent néanmoins de développer des molécules avec une clairance sanguine plus rapide qui amène à des rapports tumeur/tissus non cibles favorables à une utilisation en imagerie ou thérapie (**Figure 10**)(Wittrup et al. 2012).

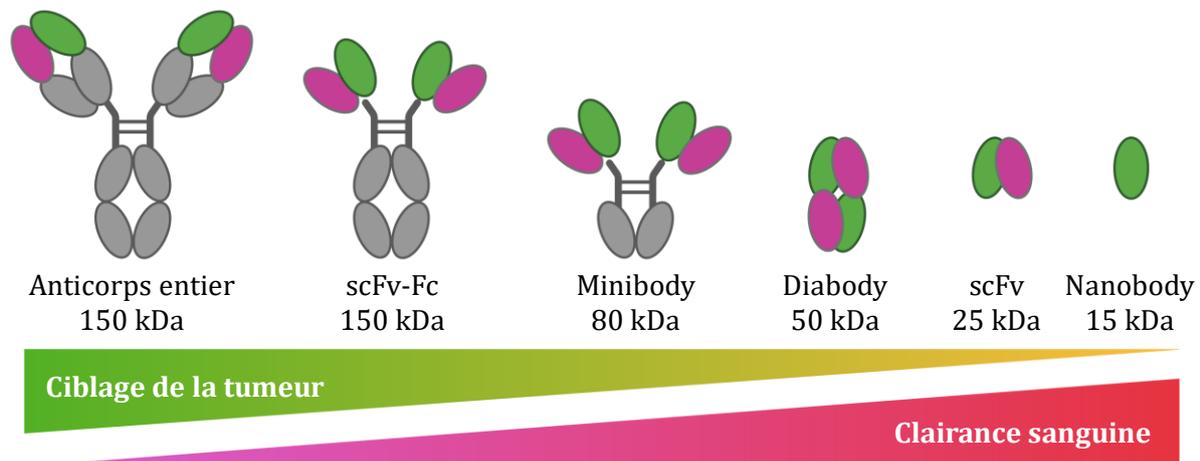


Figure 10. Représentation schématique d'un anticorps et de ses différents dérivés possibles et impact de leur taille sur leur demi-vie biologique (modifiée à partir de Knowles et Wu 2012 et réalisé sur Biorender.com)

Cependant, comme pour les peptides, la taille de ces dérivés, comprise entre 100 et 15 kDa, peut entraîner une élimination trop rapide par voie rénale et peut induire une accumulation rénale importante incompatible pour des applications thérapeutiques (Wei et al. 2022). Des solutions sont expérimentées depuis plusieurs années pour pallier ce problème, principalement avec des modifications structurales des radiopharmaceutiques, comme par exemple une modification de leur charge (Vegt et al. 2010). Le préciblage est une autre approche permise depuis le développement des anticorps bispécifiques, elle permet d'optimiser les techniques de ciblage des tumeurs avec les radiopharmaceutiques. Dans les techniques de préciblage, le vecteur et le radionucléide sont administrés séparément, en deux temps. D'abord, le vecteur modifié avec une fonction cliquable est administré. Puis, un certain temps, adapté à la demi-vie biologique du vecteur, après lequel la fixation tumorale et la clairance aux organes sains du vecteur seront optimales pour le diagnostic ou la thérapie, le radionucléide modifié avec une fonction cliquable complémentaire est administré. Une fois dans l'organisme, le radionucléide ira se fixer spécifiquement sur le vecteur via leurs fonctions « clicks ». Cette technique a fait l'objet de plusieurs études cliniques et précliniques qui ont montré des résultats prometteurs (Bodet-Milin et al. 2016; Keinänen et al. 2020; Cheal et al. 2022).

4. La radiothérapie interne vectorisée

La radiothérapie interne vectorisée agit sur les cellules tumorales comme la « magic bullet » conceptualisée au début du XX^e siècle par le Professeur Paul Ehrlich (Heynick 2009). Le radiopharmaceutique thérapeutique va, de façon spécifique et sélective, cibler et traiter efficacement les tumeurs, sans endommager le reste de l'organisme. Avec la radiothérapie interne à l'iode-131 dans les cancers thyroïdiens, c'est la voie métabolique de l'iode qui permet de délivrer le radionucléide spécifiquement via le NIS (Giovannella et al. 2022). Dans les années 80, l'expansion du développement d'AcM spécifiques, avec les hybridomes cellulaires (Köhler et Milstein 1975), a permis d'introduire les premières immunothérapies en clinique. En 1986, le muromonab-CD3 (Orthoclone™) a été le premier anticorps monoclonal autorisé en clinique par la FDA. Cet AcM prévient le rejet des greffes rénales en inhibant les lymphocytes T cytotoxiques en se liant à l'antigène CD3 présent à la surface de leurs membranes cellulaires (Van Wauwe, De Mey, et Goossens 1980). À partir de ce moment, il est devenu possible d'associer la spécificité de ciblage des AcM (puis des différents types de vecteurs déjà décrits) à la puissance cytotoxique des radionucléides. À la suite de ce raisonnement, les premiers travaux de RIV à l'aide d'anticorps ont fait leur apparition en clinique. Au début des années 90, de premières études ont vectorisé l'iode-131 avec un anticorps anti-CD20 ciblant les lymphocytes B pour le traitement du lymphome non hodgkinien (LNH) (Press et al. 1993). Plusieurs autres anticorps anti-CD20 ont été évalués dans le traitement du LNH, une AMM a été obtenue en 2004 pour l' [⁹⁰Y]-Ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN™) (Witzig et al. 2003). Depuis, la radiothérapie interne vectorisée a connu un vrai succès, avec d'abord, des applications dans les cancers hématologiques puis dans des tumeurs solides (Rondon, Rouanet, et Degoul 2021).

a. Principe général

La radiothérapie interne vectorisée appelée aussi radiothérapie moléculaire ou encore radiothérapie interne suit en grande majorité le même principe d'injection systémique du radiopharmaceutique que pour l'imagerie, cette fois-ci dans le but d'amener des rayonnements ionisants jusqu'aux sites tumoraux pour induire la mort des cellules tumorales. Les rayonnements ionisants vont agir sur l'ensemble des molécules biologiques (protéines, lipides...) ainsi que sur l'ADN. L'ionisation de l'ADN provoque des dommages irréversibles (cassures simples et doubles brins, liaisons croisées ADN-ADN ou ADN-protéines, ...) conduisant à la mort des cellules tumorales (Pouget et al. 2015). Cette ionisation de l'ADN peut être directe, ou indirecte par la formation de radicaux libres (ROS) lors de la radiolyse de l'eau dans les tissus (Gudkov et al. 2015). Concernant le radiopharmaceutique, les critères de sélection des vecteurs utilisés seront les mêmes que ceux décrits au préalable pour les radiopharmaceutiques à visée diagnostique. Le choix du radionucléide, lui, est déterminant. Plusieurs propriétés de désintégration des

radionucléides sont à prendre en compte, et principalement leurs demi-vies, qui devront être compatibles avec celle du vecteur, leurs parcours dans la matière et leurs énergies. Ces deux dernières propriétés permettent de définir le transfert d'énergie linéique qui correspond à la quantité d'énergie libérée par unité de distance (keV/ μm) (White, Escorcia, et Viola 2021). Ce TEL devra être suffisamment élevé pour pouvoir induire des dommages aux cellules tumorales. Plusieurs types d'émissions associées aux radionucléides sont appropriés pour induire des effets cytotoxiques sur les cellules tumorales.

b. Les différents types d'émissions utilisés en RIV

On distingue trois types d'émissions radioactives utilisées en RIV pour des applications thérapeutiques : les particules β^- , les particules α et les électrons Auger. Leurs principales propriétés sont résumées dans la **Figure 11** (Gudkov et al. 2015).

- Les rayonnements β^- :

Le rayonnement β^- est constitué d'un électron de faible énergie (0,5-2,3 MeV), dont le parcours dans la matière (de l'ordre de quelques millimètres) dépend de l'énergie. Cette caractéristique en fait l'émission la plus adaptée pour des tumeurs solides de petites ou moyennes tailles accessibles, mais aussi potentiellement la plus toxique pour les tissus sains environnants la tumeur. Il est considéré que les rayonnements β^- peuvent couvrir jusqu'à 50 cellules environ (Boswell et Brechbiel 2007). Ce type d'émetteur est le plus utilisé en traitement de routine en clinique. Ils ont été largement utilisés dès le début des années 2000, dans les cancers hématologiques et notamment le LNH avec des anticorps anti-CD20 ou anti-CD22 radiomarqués à l'yttrium-90 (Pouget et al. 2011). Un émetteur plus récemment introduit en clinique est le lutetium-177, comme avec le [^{177}Lu]Lu-DOTATATE et le [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. C'est un émetteur β^- de moyenne énergie (0,497 MeV) efficace dans le traitement de tumeurs de petite taille. Il a aussi l'avantage d'être plus adapté à une utilisation en clinique en termes de radioprotection que des émetteurs de fortes énergies tel que l'yttrium-90 qui n'ont pas de rayonnement gamma associé (2,284 MeV) (Pouget et al. 2011).

- Les rayonnements α :

Les émetteurs α sont caractérisés par l'émission d'un noyau d'hélium composé de deux protons et de deux électrons. Les particules alpha ont un TEL très élevé de 50-230 keV/ μm et un parcours dans la matière court de quelques dizaines de micromètres (10-100 μm) qui permettrait de limiter les dégâts causés aux tissus sains environnants. De plus, il a été démontré que contrairement aux rayonnements β^- , les effets cytotoxiques des émetteurs α ne sont pas dépendants de l'oxygène, ce qui rend ces rayonnements efficaces dans les tumeurs hypoxiques (Reissig et al. 2020). Bien que ces radionucléides soient encore peu disponibles et donc peu

disponibles, leurs propriétés les rendent particulièrement intéressants pour le traitement de micrométastases ou de tumeurs disséminées (Poty et al. 2018b).

En clinique, l'intérêt de la RIV- α a été évalué dans quelques études pour des cancers hématologiques ou des tumeurs solides métastatiques. Dans la leucémie myéloïde aiguë, une étude de phase I/II menée sur 31 patients, a évalué l'utilisation en RIV d'un anticorps anti-CD33 humanisé radiomarqué au bismuth-213 adjuvant à une chimiothérapie. Cette étude a démontré l'efficacité d'une RIV- α dans ce type de cancer, en réduisant significativement le nombre de blastes présents à la moelle osseuse (Rosenblat et al. 2010). L'intérêt autour des rayonnements α comme agent thérapeutique se traduit par une expansion du nombre d'études précliniques et cliniques mettant en place des RIV- α dans différents types de cancers (Poty et al. 2018a). Plus récemment, avec le succès de la RIV utilisant des peptides dans le traitement du cancer de la prostate métastatique résistant à la castration avec le [^{177}Lu]Lu-PSMA-617, des études cliniques ont évalué le potentiel de l'actinium-225 ([^{225}Ac]Ac-PSMA-617). Chez les patients réfractaires au [^{177}Lu]Lu-PSMA-617, l'actinium-225 ([^{225}Ac]Ac-PSMA-617) montre de bons résultats pour stabiliser le développement de la maladie sans induire de forte toxicité (Yadav et al. 2020).

- Les électrons Auger :

L'émission des électrons Auger est précédée d'un phénomène de capture électronique au sein du noyau atomique. Lors de la désexcitation de l'atome, les lacunes induites dans les couches électroniques sont remplies par des électrons des couches extérieures, ces transitions s'accompagnent de l'émission d'un électron Auger ou de rayon X. On considère que 5 à 30 électrons Auger peuvent être émis par désintégration avec une énergie de 0,001-1 keV. Leur très faible parcours dans la matière ($< 1 \mu\text{m}$) les rend très énergétiques sur leur parcours (4-26 keV/ μm) (Gudkov et al. 2015). Avec cette caractéristique, il est nécessaire que le radionucléide soit internalisé et qu'il reste dans la cellule pour avoir un effet cytotoxique sur l'ADN, ce qui rend le développement de radiopharmaceutiques plus compliqué (Filosofov, Kurakina, et Radchenko 2021). Si la spécificité du vecteur utilisé avec les électrons Auger est importante et que celui-ci peut être internalisé par la cellule ciblée, ce type d'émetteur serait parfaitement adapté au ciblage des cellules tumorales isolées (Kassis 2008). Ces dernières années, et pour répondre à ce besoin, des molécules vectrices spécifiques telles que des nanoparticules et des plasmides ont été développés et évalués in vitro pour permettre le transport des électrons Auger jusque dans les noyaux des cellules tumorales (Howell 2023).

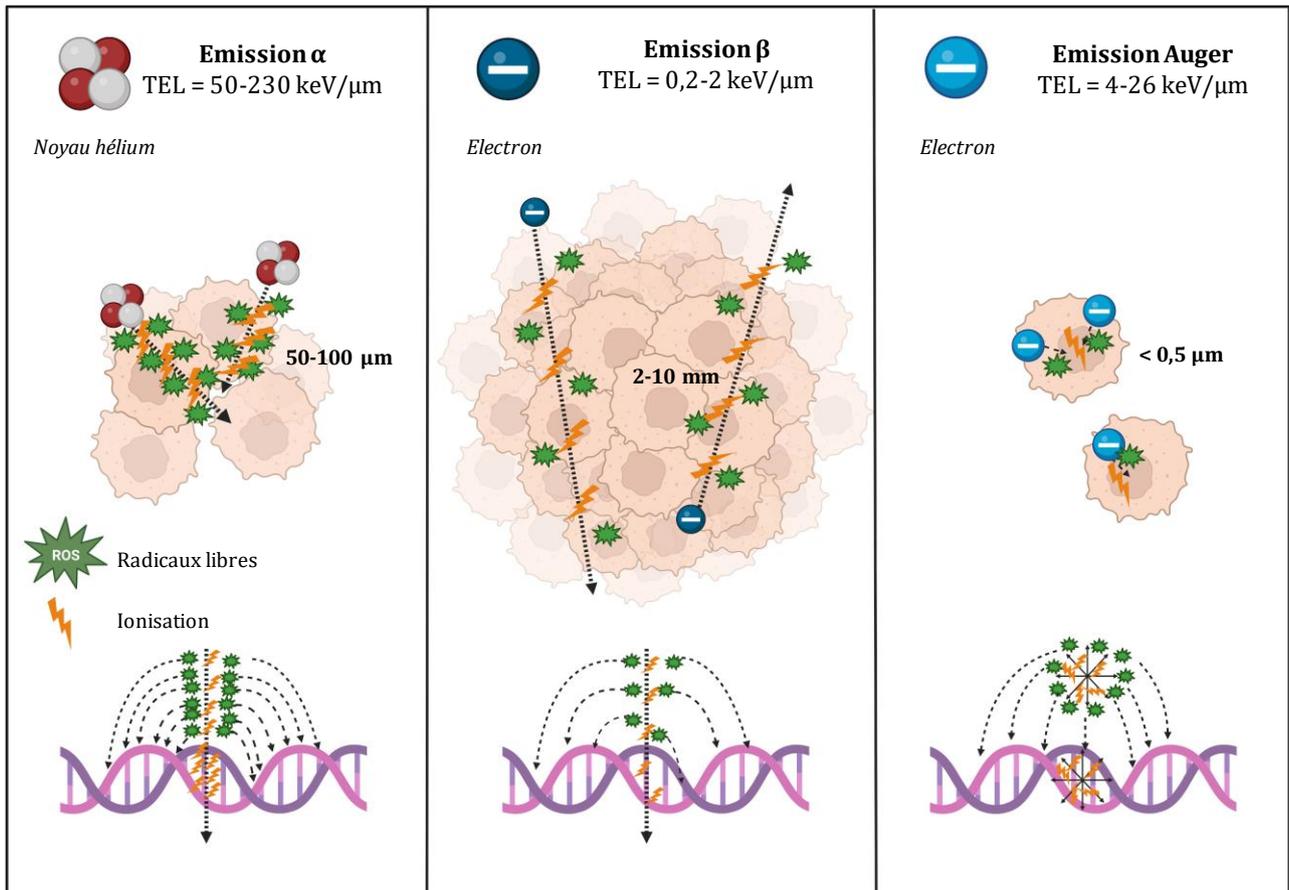


Figure 11. Représentation schématique des principales caractéristiques des émetteurs alpha, bêta et des électrons Auger utilisés en RIV (adaptée de Gudkov et al. 2015)

Les émetteurs α se caractérisent par l'émission d'un noyau d'hélium avec un TEL entre 50 et 230 keV/ μm , son parcours dans la matière est relativement court (50-100 μg) ce qui lui confère une très forte énergie avec une forte densité d'ionisation provoquant des dommages irréversibles à l'ADN. Les électrons émis par les particules β - ont un faible TEL de 0.2 à 2 keV/ μm associé à un trajet dans la matière relativement long (2-10 mm) qui leur une énergie moyenne capable d'irradier de petites masses tumorales. Les émissions d'électron Auger ont un TEL intermédiaire de 4 à 26 keV/ μm associé à un parcours dans la matière nanométrique ce qui leur confère une très forte énergie irradiante à l'échelle d'une cellule.

II. Le cuivre

1. Les caractéristiques

Le cuivre est le troisième métal le plus abondant dans l'organisme humain après le fer et le zinc (Chellan et Sadler 2015). On le retrouve à l'état de trace dans l'organisme humain, distribués au niveau des mitochondries, des noyaux et des cytoplasmes cellulaires (Laliberté et Labbé 2008). Chez l'humain et l'animal, le cuivre est lié sous forme de complexe à des protéines chaperonnes, et sa forme libre dans l'organisme est quasiment inexistante. Dans le règne animal, deux formes principales du cuivre existent : l'ion cuivreux $\text{Cu}^+(\text{I})$ et l'ion cuivrique $\text{Cu}^{2+}(\text{II})$. C'est un couple oxydant/réducteur qui sert de cofacteur pour de nombreuses enzymes et qui se caractérise par un potentiel $E_0 (\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+) = 0,16 \text{ V}$. Ce potentiel standard bas en comparaison de celui du couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ($0,77 \text{ V}$) montre que le cuivre est bien adapté aux échanges d'électrons. C'est donc un nutriment essentiel au métabolisme finement régulé et impliqué dans de nombreux processus biologiques. Il intervient notamment dans la chaîne respiratoire, dans la protection contre le stress oxydatif et le transport du fer (Madsen et Gitlin 2007).

2. Le devenir du cuivre dans l'organisme

Tout comme les autres oligo-éléments, le cuivre est apporté dans l'organisme par l'alimentation sous sa forme Cu^{2+} . Il va donc d'abord passer dans le système digestif, jusqu'au duodénum qui est son principal site d'absorption vers le système sanguin. Avant d'être absorbé par les entérocytes qui tapissent le duodénum, l'ion Cu^{2+} va être réduit par des métalloréductases en Cu^+ (Georgatsou et al. 1997; Rees et Thiele 2007). Le transporteur de Cu à haute affinité présent à la membrane apicale des entérocytes, Ctr1, est un transporteur d'influx indépendant de l'énergie qui va prendre en charge l'entrée du cuivre dans la cellule (J. Lee et al. 2002). Ce transporteur fonctionne sous forme d'homotrimère, il va lier l'ion cuivre par son domaine N-terminal pour l'internaliser dans le cytoplasme cellulaire (Puig et al. 2002). Dans le cytoplasme des entérocytes, le Cu^{2+} est chélaté par différentes protéines chaperonnes pour limiter les réactions d'oxydation, et notamment la protéine Atox1 (Lin et Culotta 1995). Atox1 achemine le cuivre jusqu'à l'appareil de Golgi pour y être pris en charge par l'ATP7A, un transporteur d'efflux du cuivre de la famille des ATPases de types P (Petris et al. 1996). L'ATP7A va acheminer le cuivre jusqu'à la membrane plasmique basale de l'entérocyte pour relarguer le cuivre dans les veines mésentériques qui se déversent dans la veine porte (Greenough et al. 2004). Dans le système et jusqu'au foie, le cuivre sera lié à des protéines plasmatiques de faible poids moléculaire comme l'albumine ou bien à des acides aminés, principalement l'histidine (Neumann et Sass-Kortsak 1967; McArdle et al. 1990).

Le foie est l'organe principal de la régulation du devenir du cuivre dans l'organisme. Après son absorption dans les cellules hépatiques via le transporteur Ctr1, de la même manière, Atox1 va

acheminer le cuivre jusqu'à un autre transporteur d'efflux, l'ATP7B dans l'appareil de Golgi. L'ATP7B va pouvoir aider à incorporer le cuivre à la céruloplasmine avant qu'il ne soit sécrété dans le sang par la veine cave. La céruloplasmine est une oxydase synthétisée dans le foie responsable de 90% de la prise en charge du cuivre dans le sang ([Holmberg, Laurell, et Gjertsen 1948](#)). Comme dans le système portal, l'albumine et certains acides aminés vont prendre en charge le reste du cuivre dans le système vasculaire. Une fois dans la veine cave, le cuivre associé aux protéines plasmatiques va remonter jusqu'au cœur avant d'être distribué à l'ensemble de l'organisme. L'ATP7B va aussi prendre en charge la régulation de l'excès de cuivre dans les cellules hépatiques en le relarguant par exocytose à la membrane apicale des cellules et directement dans les canicules biliaires ([Lutsenko 2010](#)). Une fois dans la bile, celle-ci sera déversée au niveau du duodénum via le canal cholédoque, où le cuivre pourra être réabsorbé par les entérocytes si besoin ou bien excrété dans les fèces via le tractus gastro-intestinal.

Le foie est aussi l'organe principal de stockage du cuivre. Dans les hépatocytes, les métalloprotéines présentes peuvent chélater les ions cuivre, et ainsi permettre d'en stocker l'excédent ([Evans, Dubois, et Hambidge 1973](#)).

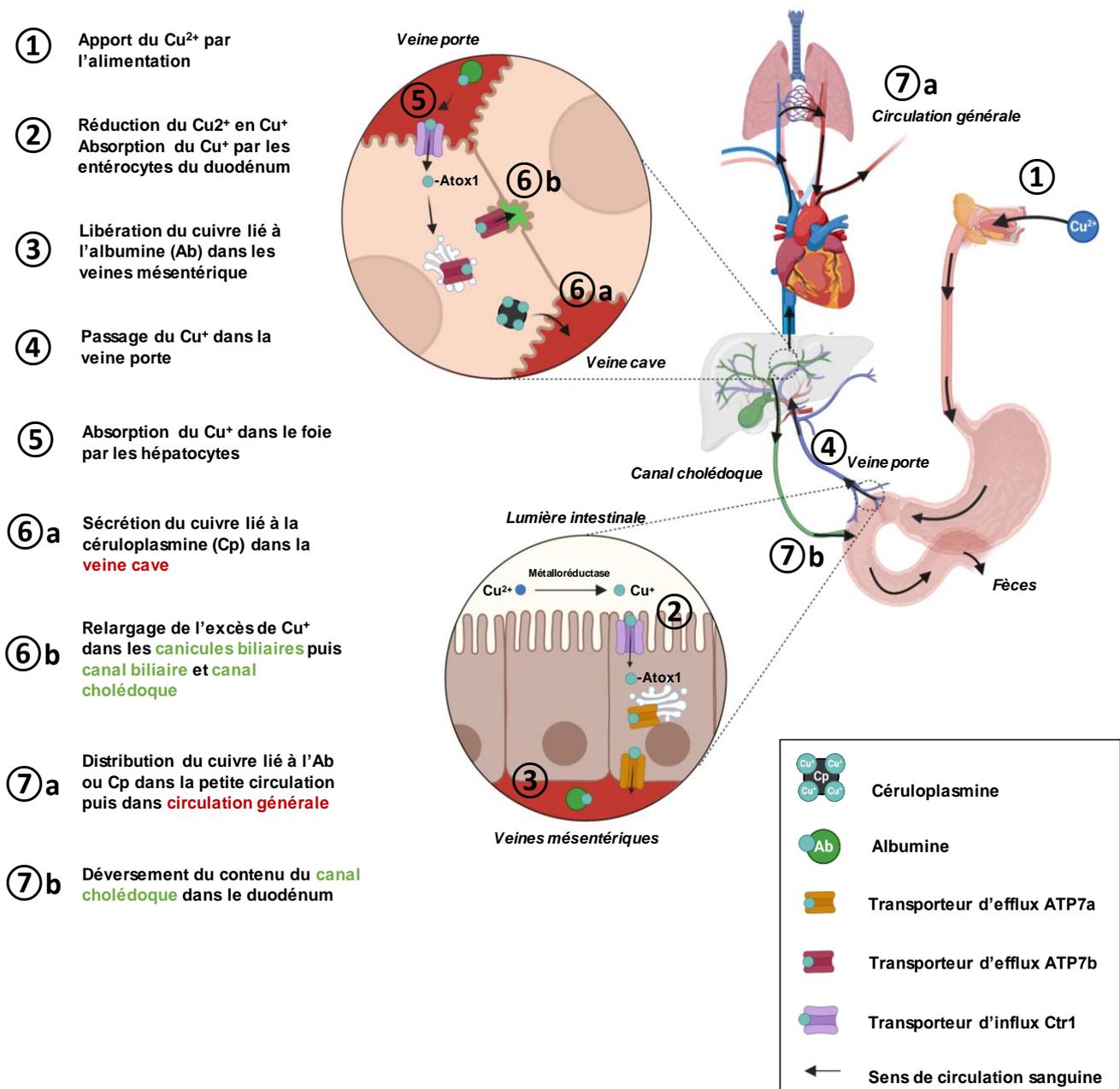


Figure 12. Représentation schématique du devenir du cuivre dans l'organisme (réalisé avec Biorender.com)

① Le Cu^{2+} apporté par l'alimentation est ② réduit par des métallo-réductases en Cu^+ dans la lumière intestinale au niveau du duodénum avant d'être importé par le Ctr1 dans les entérocytes. Dans le cytoplasme, Atox1 se lie au Cu^+ pour le conduire jusqu'à l'ATP7A dans l'appareil de Golgi. ③ L'ATP7A va permettre l'efflux du Cu^+ dans les veines mésentériques, où il sera pris en charge par l'albumine (Ab), puis dans le système porte jusqu'au foie. ④ De la même manière, Ctr1 va importer le Cu^+ dans les hépatocytes et, Atox1 va lier le Cu^+ jusqu'à l'appareil de Golgi. ⑤a L'ATP7B va permettre d'incorporer le Cu^+ à la céruloplasmine (Cp) qui sera sécrétée dans la veine cave pour pouvoir ⑥a alimenter le reste des organes en Cu^+ via le système vasculaire. En cas d'excès de Cu^+ dans les cellules, ⑤b l'ATP7B pourra excréter le Cu^+ dans les canicules biliaires qui amène au canal biliaire puis au canal cholédoque. ⑥b Le Cu^+ sera transporté par le canal cholédoque pour être déversé dans le duodénum, où il pourra être réabsorbé ou éliminé par voie gastro-intestinale jusque dans les fèces.

3. Le rôle physiologique/pathologique

Le cuivre dans l'organisme est impliqué dans différents processus métaboliques où il joue un rôle de co-facteur de plusieurs enzymes. L'homéostasie du cuivre dans l'organisme est finement régulée par les nombreuses protéines chaperonnes qui le prennent en charge. Il intervient notamment dans la lutte contre le stress oxydatif, dans la respiration mitochondriale, le fonctionnement du système immunitaire et le maintien des tissus conjonctifs (Lutsenko 2010). Un dérèglement de son homéostasie est à l'origine de maladies lourdes de conséquences. Ainsi, la Maladie de Menkes, liée à une mutation du transporteur ATP7A, entraîne une carence en cuivre responsable d'une neurodégénérescence et d'une anomalie des tissus conjonctifs (Kaler et DiStasio 1993). La Maladie de Wilson quant à elle, est due à une mutation du gène ATP7B codant pour la protéine ATP7B (aussi appelée protéine Wilson) conduisant à un dysfonctionnement du transporteur d'efflux ATP7B et une accumulation du cuivre dans les hépatocytes. Cette surcharge hépatique en cuivre pouvant provoquer une insuffisance hépatique ainsi qu'une maladie neuropsychiatrique secondaire liée un excès de cuivre dans le cerveau (Czlonkowska et al. 2018).

4. Le rôle pathologique du cuivre en cancérologie

En cancérologie, une relation certaine existe entre le métabolisme du cuivre et le développement d'un cancer. Une augmentation des taux de cuivre retrouvés dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains est observée dans plusieurs types de cancers (Blockhuys et al. 2017). En effet, il a été démontré que le cuivre était capable de réguler la prolifération cellulaire via différents processus cellulaires. Tout d'abord, le cuivre est un co-facteur du cytochrome c mitochondrial impliqué dans la respiration mitochondriale à l'origine de la production d'énergie nécessaire à la réplication cellulaire (Ishida et al. 2013). Il a aussi été montré qu'il permettait d'activer la prolifération cellulaire. En effet, la protéine chaperonne Atox1 activée par le cuivre est un facteur de transcription de la cycline D1 impliqué dans l'activation du cycle cellulaire (Itoh et al. 2008). De même, l'activation de la cascade de kinases RAS-RAF-MEK-ERK résultant d'une prolifération cellulaire est médiée par MEK1, une kinase activée par deux ions cuivre (Turski et al. 2012). Le cuivre intervient aussi dans le phénomène de métastase tumorale par l'intermédiaire de la lysyl oxydase (LOX), des métalloprotéines activées par l'ATP7A qui remodèle la matrice extracellulaire et les tissus conjonctifs (Shanbhag et al. 2019). Enfin, il existe des implications du cuivre dans l'angiogenèse qui sont avérées à différents niveaux. Il va permettre la formation de vaisseaux sanguins essentiels pour le développement tumoral par l'activation de plusieurs facteurs d'hypoxie, comme le HIF-1 α (facteur 1 α inductible par l'hypoxie), et proangiogéniques comme le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), le FGF1 (facteur de croissance des fibroblastes 1) ou l'IL-6 (interleukine-6) (Urso et Maffia 2015). Par exemple, l'enzyme redox MEMO1 (médiateur de motilité cellulaire) est activée par l'ion cuivre. MEMO1 agit sur les

protéines du cytosquelette de façon à augmenter la migration et l'invasion cellulaire ([MacDonald et al. 2014](#)). L'implication du cuivre dans ces différents aspects du processus protumoral a permis d'envisager l'adoption de thérapies inhibant le cuivre par chélation. Ce type de traitement entraîne une faible toxicité dans l'organisme et permet souvent de retarder la progression tumorale ([da Silva et al. 2022](#)).

5. Le cuivre-64

a. Les caractéristiques

À ce jour, 32 isotopes du cuivre sont connus et parmi ces isotopes, il existe plusieurs radioisotopes du cuivre ayant un intérêt pour une application médicale dont les principales propriétés sont détaillées dans le **Tableau 2**. Cependant, entre les demi-vies trop courtes et associées à des méthodes de production et/ou de purification difficiles à mettre en œuvre ou encore des problèmes de radioprotection, seule l'utilisation du cuivre-64 et du cuivre-67 est aujourd'hui possible pour des applications théranostiques. Dans le cas du cuivre-67 dont les propriétés physiques sont bien adaptées à la RIV, sa disponibilité actuelle reste limitée ([Ahmedova et al. 2018](#)).

Tableau 2. Propriétés des principaux radioisotopes du cuivre (CE : capture électronique)
(traduit et adapté de [Ahmedova et al. 2018](#) et [Jalilian et Osso Jr 2017](#))

Radioisotope	Demi-vie	Schéma de désintégration (%)	Rayonnement majeur (%) [keV]	Source de production	Applications
cuivre-60	23,7 mn	β^+ (93) CE (7)	β^+ 1980,5 (49) γ 1333 (88)	Cyclotron	Imagerie
cuivre-61	3,33 h	β^+ (62) CE (38)	β^+ 1215,2 (51) γ 283 (12) γ 656 (11)	Cyclotron	Imagerie
cuivre-62	9,67 min	β^+ (98) CE (2)	β^+ 2926 (97)	Générateur	Imagerie
cuivre-64	12,7 h	β^+ (17,52) CE (43,53) β^- (38,48)	β^+ 653,1 (17) γ 1346 β^- 578,7 (39)	Réacteur Cyclotron	Imagerie RIV
cuivre-67	62,01 h	β^- (100)	β^- 395 (50)	Réacteur Cyclotron	RIV

Le cuivre-64 présente quant à lui des propriétés physiques intéressantes pour des applications théranostiques. Sa période physique de 12,7 heures est idéale pour des applications aussi bien en imagerie qu'en thérapie avec un grand nombre de vecteurs selon les critères évoqués

précédemment. En effet, d'une part, le cuivre-64 se désintègre avec une probabilité de 17,52% en émettant des rayonnements β^+ pouvant être utilisés en imagerie TEP et de 38,48% par émission de rayonnements β^- d'énergie moyenne (0,579 MeV) adaptée au traitement de tumeurs de petite taille (**Figure 13**) (Jalilian et Osso Jr 2017). D'autre part, il se transforme aussi par capture électronique, ce qui aboutit à l'émission d'électrons Auger (43,53%) radiotoxique pour les cellules tumorales (Weeks et al. 2010). L'ensemble de ces caractéristiques font que le cuivre-64 a un réel potentiel théranostique (Gutflen, Souza, and Valentini 2018).

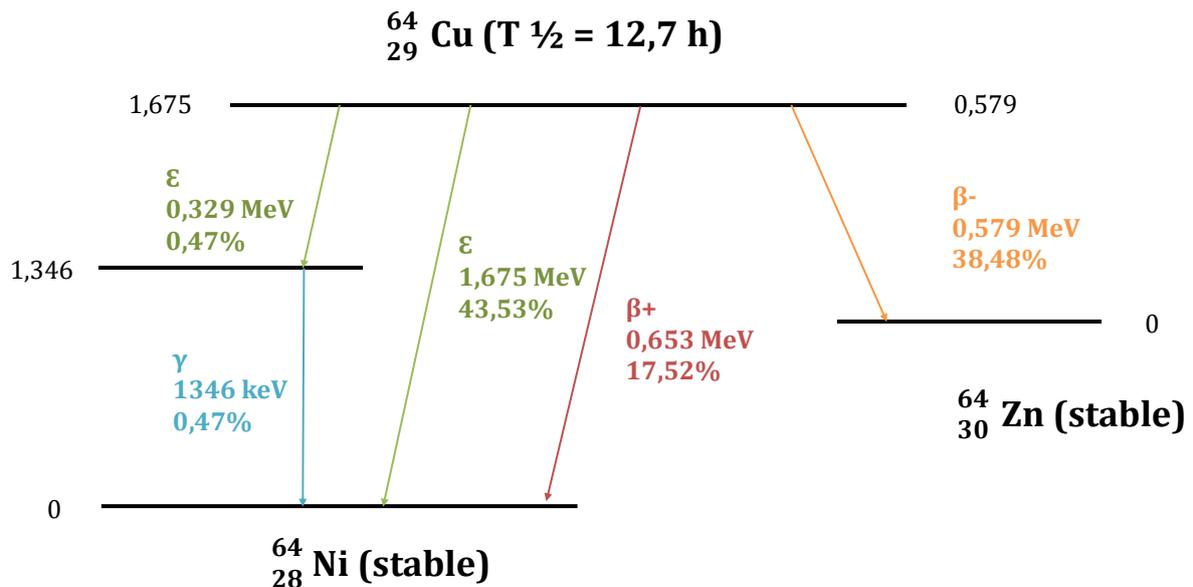


Figure 13. Schéma représentatif de la décroissance du cuivre-64 (adapté de Jalilian et Osso Jr 2017).

b. Les chélates du cuivre

La vectorisation du cuivre-64 pour l'imagerie ou la thérapie nécessite de fonctionnaliser les vecteurs avec des molécules capables de complexer le cuivre efficacement. Ces molécules sont des agents chélatants bifonctionnels, désignés par l'acronyme BCA (Bifunctional Chelating Agents). Il existe aujourd'hui un nombre important de BCA, et le développement de nouveaux agents toujours plus efficace pour améliorer la stabilité et la sélectivité des radiomarquages est encore d'actualité (Brechtel 2008). Les BCA disponibles peuvent être plus ou moins spécifiques du cuivre, et certaines de leurs caractéristiques sont résumées dans le **Tableau 3** ci-dessous :

Tableau 3. Propriétés des BCA disponibles pour le radiomarquage au cuivre

	BCA disponible pour des applications chez l'humain	Charge du complexe de cuivre	Stabilité du complexe chez l'humain	Radiomarquage à température ambiante
DOTA		négative		
NOTA		neutre ou négative		
TE1PA		positive		

Les BCA d'intérêt pour la chélation du cuivre, dérivés des molécules décrites dans la **Table 3** ci-dessus et qui appartiennent à la famille des azamacrocycliques sont : le S-2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid (p-SCN-Bn-NOTA); le 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (p-SCN-Bn-DOTA); et le 1-picolinate, 6-para isothiocyanatobenzyl tetraazacyclo tetradecane (p-SCN-Bn-TE1PA). Les BCA dérivés du NOTA et du DOTA sont actuellement les ligands les plus utilisés pour chélater le cuivre. Le DOTA est un cyclène largement utilisé pour le radiomarquage d'anticorps au cuivre-64, notamment en clinique pour l'imagerie du cancer du sein ou des tumeurs neuroendocrines (Mortimer et al. 2014; Pfeifer et al. 2012). C'est un ligand de référence pour évaluer la stabilité de nouveaux ligands. La cage moléculaire du DOTA présente l'avantage de pouvoir complexer de nombreux métaux avec une forte affinité, cela permet de modifier les vecteurs pour des applications impliquant plusieurs métaux radioactifs. Cet avantage est important pour des applications théranostiques, toutefois, cette caractéristique peut aussi entraîner in vivo des phénomènes d'échange de métaux, il s'agit de la transchélation (Cooper et al. 2012). La cage moléculaire complexante des dérivés du NOTA est plus petite que celle du DOTA, elle est aussi mieux adaptée à la taille de l'ion Cu^{2+} . Malgré cela, les dérivés du NOTA restent sensibles aux phénomènes de transchélation. In vivo, le NOTA reste plus stable cinétiquement et thermodynamiquement, sa réaction de formation avec un anticorps est plus rapide que pour le DOTA (Cooper et al. 2012).

Le TE1PA est un ligand à base de cyclam monopicolinate-N-alkylé, comme le NOTA, sa complexation au vecteur est rapide et sa stabilité thermodynamique et électrochimique est importante avec le cuivre. La cage moléculaire formée par le cycle tétra azoté du p-SCN-Bn-TE1PA (TE1PA) est parfaitement adaptée au rayon ionique du cuivre (Le Bihan et al. 2018). Les métaux avec un rayon ionique égal ou supérieur à celui de cette cage moléculaire ne seront pas complexés de façon efficace. Il faut aussi noter que contrairement au DOTA qui nécessite de radiomarquer les vecteurs à une température minimum de 37°C, pour le NOTA et le TE1PA, les radiomarquages

à température ambiante sont possibles. In vivo, les propriétés de chélation du TE1PA spécifique pour le cuivre ont montré des résultats prometteurs avec une très forte spécificité du ligand pour le cuivre par rapport aux autres métaux (Frindel et al. 2014). De plus, le ligand TE1PA montre une résistance in vivo à la transchélation supérieure à celles des deux autres ligands (Navarro et al. 2019). C'est pourquoi, dans cette étude, notre choix de ligand pour chélater le cuivre-64 s'est porté sur le ligand TE1PA.

6. Utilisation du cuivre-64 en précliniques et cliniques pour l'imagerie et la thérapie

a. Applications du cuivre-64 en clinique pour l'imagerie TEP

Plusieurs vecteurs radiomarqués au cuivre-64 ont été développés pour une utilisation clinique en imagerie TEP (Zhou et al. 2019).

Le premier a été le [⁶⁴Cu]Cu-diacetylbis (N4-methylthiosemicarbazone) ([⁶⁴Cu]Cu-ATSM) qui ciblait spécifiquement les tissus hypoxiques dans le cancer du col de l'utérus (Lewis et al. 2008). Tous les résultats tendent à montrer qu'en comparaison avec le [¹⁸F]F-misonidazole, la qualité des images TEP obtenues avec le cuivre-64 est supérieure. En effet pour une captation par les tissus tumoraux équivalente, le bruit de fond non spécifique est inférieur. Depuis, différents composés ont été développés en utilisant des peptides ou des anticorps monoclonaux parmi lesquels on peut citer :

Le [⁶⁴Cu]Cu-DOTATATE : un agent diagnostique en TEP composé d'un peptide reconnaissant les sous-types II des récepteurs à la somatostatine (décrit précédemment) que l'on retrouve fortement exprimé dans les tumeurs neuroendocrines (Pfeifer et al. 2012). La spécificité du [⁶⁴Cu]Cu-DOTATATE s'est révélée supérieure au [⁶⁸Ga]Ga-DOTATATE pour détecter les lésions tumorales (Johnbeck et al. 2017).

Le trastuzumab radiomarqué au cuivre-64 : différents radiopharmaceutiques ont été développés à partir de l'anticorps pour réaliser l'imagerie TEP de l'expression du récepteur HER2 chez les patientes atteintes du cancer du sein HER2 positif. Son radiomarquage au cuivre-64 a été effectué et testé en clinique avec différents ligands comme le DOTA (Mortimer et al. 2014; 2018), ou plus récemment le NOTA (Lee et al. 2021). Ces différentes études cliniques ont montré l'intérêt du cuivre-64 qui offre un contraste d'image intéressant.

b. Évaluation du potentiel thérapeutique du cuivre-64

Dans la littérature, peu de travaux ont été publiés sur l'étude du potentiel thérapeutique du cuivre-64. L'une des premières études a été réalisée, il y a plus de 20 ans, dans un modèle de cancer du pancréas chez le rat (Lewis et al. 1999). Un analogue de la somatostatine couplé au cuivre-64, le [⁶⁴Cu]Cu-TETA-Tyr3-Octreotate a été administré en dose unique ou répétée pour

traiter les rats porteurs de tumeurs pancréatiques. Les résultats de ces travaux ont montré que l'administration d'une dose unique (573,5 MBq) de [⁶⁴Cu]Cu-TETA-Tyr3-Octreotate induit un ralentissement significatif de la croissance tumorale par rapport aux rats contrôles qui ont reçu TETA-Tyr3-Octreotate non radiomarqué. En comparaison, la répétition de 3 doses de traitements (3 x 740 MBq à 2 jours d'intervalle) a entraîné un arrêt total de la croissance tumorale pendant 10 jours, avant qu'une repousse tumorale, néanmoins plus lente que chez les souris contrôles, ne reprenne. Les résultats de cette RIV ont montré l'efficacité du traitement, avec une toxicité hématologique et hépatique transitoire. Des travaux plus récents ont cherché à évaluer l'intérêt du [⁶⁴Cu]Cu-cetuximab, un anticorps ciblant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), comme traitement adjuvant après ablation de la tumeur primitive dans un modèle murin de xénotransgreffe de cancer pancréatique humain (Yoshii et al. 2019). Les résultats de l'étude ont montré que l'administration intrapéritonéale (i.p) de 22,2 MBq de [⁶⁴Cu]Cu-cetuximab, le lendemain de l'exérèse, permettait d'augmenter la médiane de survie de 40 jours par rapport aux souris contrôles qui n'ont bénéficié que de l'exérèse de la tumeur primitive.

Malgré ces résultats prometteurs, il faut noter que d'autres études ont montré des résultats mitigés concernant l'intérêt du cuivre-64 en RIV. Cependant, dans ces études, si l'utilisation d'une RIV au cuivre-64 seule n'a pas permis d'augmenter la survie des animaux dans différents modèles tumoraux, elle a montré un effet synergique en combinaison avec d'autres traitements anticancéreux. Par exemple, dans un modèle humain de cancer pancréatique chez la souris, la RIV au [⁶⁴Cu]Cu-NOTA-panitumumab (injection de 12,95 MBq), ciblant l'EGFR, n'était efficace que dans une combinaison thérapeutique avec un immunosuppresseur (Gemcitabine) associé à un inhibiteur de la réparation de l'ADN (Rucaparib) (Boyle et al. 2020). Cette combinaison thérapeutique a été administrée par voie i.p à raison de 6 cycles de traitement, espacés de deux semaines chacun. Ce protocole thérapeutique a permis d'augmenter la médiane de survie des animaux, par rapport au groupe non traité, de 36 jours, contre 9 jours pour l'association de chimiothérapies (Gemcitabine et Rucaparib) seule. Quant à l'administration du [⁶⁴Cu]Cu-NOTA-panitumumab seul, elle n'a pas permis d'améliorer la survie des animaux. Dans une autre étude, deux RIV ont été réalisées simultanément dans un modèle murin de glioblastome s.c, avec le [⁶⁴Cu]Cu-RaftRGD, un peptide ciblant des intégrines retrouvées dans les néovaisseaux de la tumeur, et le [⁶⁴Cu]Cu-ATSM, qui s'accumule spécifiquement dans les zones hypoxiques (Jin et al. 2018). L'administration i.v du [⁶⁴Cu]Cu-RaftRGD avec le [⁶⁴Cu]Cu-ATSM (18,5 MBq chacun) a permis d'augmenter significativement la médiane de survie des souris par rapport au groupe non traité, alors que l'injection seule de 37 MBq de l'un ou de l'autre des deux traitements n'a pas eu d'effet sur l'amélioration de la médiane de survie. Dans cette étude, c'est l'amélioration de distribution du cuivre-64 au sein de la tumeur, en ciblant deux aspects différents de son phénotype, qui permet d'augmenter l'efficacité thérapeutique.

Certaines études précliniques ont mis en évidence les propriétés théranostiques du cuivre-64. C'est le cas des travaux réalisés par [Lewis et al. en 2001](#), qui portaient sur l'étude du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-ATSM}$ dans un modèle tumeurs colorectales humaines greffées chez le hamster. Une étude d'escalade d'activité impliquant une administration i.p d'activités croissantes de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-ATSM}$ a permis d'identifier les activités efficaces pour améliorer significativement la survie des souris ($222 \text{ MBq} < \text{activité efficace} < 370 \text{ MBq}$). Ils ont ensuite évalué l'intérêt d'un fractionnement de dose ($3 \times 148 \text{ MBq}$) avec des injections réalisées tous les trois jours. En parallèle de ces protocoles thérapeutiques, 24 heures après une injection de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-ATSM}$ un suivi de l'évolution du volume et de la morphologie des tumeurs a été effectué par imagerie TEP. Dans cette étude, ce suivi par imagerie TEP a aussi permis d'évaluer de façon précise la dosimétrie au niveau de la tumeur. Une autre étude évaluant le potentiel théranostique du cuivre-64 a été publiée par [Yoshii et al. en 2018](#). Dans un modèle de cancer gastro-intestinal disséminé, l'administration intrapéritonéale d'une dose thérapeutique de $22,2 \text{ MBq}$ de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-PCTA-cetuximab}$ pendant la phase précoce du développement de la maladie a prolongé la survie des souris sans induire de toxicité aiguë. Sur ce même modèle, l'administration de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-PCTA-cetuximab}$ pendant la phase tardive du développement de la maladie a permis de pratiquer une microchirurgie des tumeurs disséminées guidée par l'imagerie TEP. L'administration du radioimmunoconjugué a d'abord servi à visualiser et localiser l'ensemble des tumeurs pour aider l'acte chirurgical, et dans un second temps à confirmer ou infirmer l'absence de résidus tumoraux après la chirurgie. Très récemment, un vecteur ciblant le PSMA $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA}\text{H}_2\text{-PSMA}$ a été évalué pour des applications théranostiques chez des souris porteuses de tumeurs LNCaP de la prostate, avec des résultats très prometteurs à la fois pour l'imagerie ([Milot et al. 2022](#)) et la thérapie ([Milot et al. 2023](#)). L'imagerie TEP a montré une fixation tumorale optimale à 4h p.i. et l'évaluation du potentiel thérapeutique a montré qu'une dose unique de 150 MBq $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA}\text{H}_2\text{-PSMA}$ ou de 120 MBq de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ augmentait significativement la médiane de survie des souris par rapport aux souris du groupe témoin de façon similaire et sans induire de toxicité importante.

7. La paire théranostique $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$

En plus de son potentiel comme agent théranostique, le cuivre-64 peut aussi être associé au cuivre-67 pour former une paire théranostique potentiellement plus efficace. Contrairement à la paire $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$, le comportement biologique du radiopharmaceutique pour l'imagerie avec le cuivre-64 aura le même comportement que celui pour la thérapie avec le cuivre-67. En effet, s'agissant du même élément chimique, la biodistribution sera identique pour les deux radionucléides. Le cuivre-67 ($E_{\text{max}} = 575 \text{ keV}$), comme cela a été évoqué précédemment, est un radionucléide émetteur à 100% de particules β^- d'énergie proche de celle du lutétium-177 ($E_{\text{max}} = 497 \text{ keV}$), et qui a donc un intérêt pour des applications thérapeutiques ([Pouget et al. 2011](#)).

L'utilisation du cuivre-67 pour la thérapie permettrait en théorie d'injecter des activités radioactives moins importantes pour obtenir une efficacité équivalente, voire supérieure, à celle que l'on obtiendrait avec le cuivre-64. Dans cette étude préclinique chez le hamster, l'efficacité thérapeutique d'un anticorps ciblant les cellules humaines du cancer colorectal radiomarké au cuivre-64 ou au cuivre-67 a été évaluée (Connett et al. 1996). Les résultats ont mis en évidence une efficacité thérapeutique similaire entre l'injection de 74 MBq du radioimmunoconjugué à base de cuivre-64 et l'injection de 14,8 MBq de celui à base de cuivre-67. L'effet thérapeutique comparable observé malgré la différence entre les activités injectées est notamment lié à la différence entre les demi-vies des deux radionucléides. La demi-vie du cuivre-67 de 61,8 heures permet un temps d'exposition des cellules tumorales aux irradiations qui favorise la réduction des activités injectées pour obtenir une dose absorbée au niveau de la tumeur similaire à celle obtenue avec le cuivre-64 qui a une demi-vie plus courte (12,7 heures). De façon plus générale, comme nous l'avons vu précédemment, l'évaluation du potentiel thérapeutique du cuivre-64 dans des modèles murins a montré que des activités supérieures à 20 MBq sont nécessaires pour observer un effet thérapeutique. Alors que, pour le cuivre-67 des activités comprises entre 10 et 20 MBq sont efficaces, et delà, sont toxiques (DeNardo et al. 1997; Jin et al. 2017).

Actuellement, la disponibilité limitée du cuivre-67 restreint son utilisation à l'échelle clinique, mais plusieurs études préliminaires ont montré des résultats très prometteurs. En effet, une étude préclinique publiée récemment, sur un modèle murin de carcinome colorectal, a montré une corrélation entre la captation tumorale d'un anticorps [⁶⁴Cu]Cu-huA33 (ciblant une protéine de surface des cellules tumorales) en imagerie TEP et la réponse thérapeutique observée avec le [⁶⁷Cu]Cu-huA33 (Keinänen et al. 2020). Dans une autre étude préclinique, sur un modèle de maladie résiduelle de neuroblastome exprimant le récepteur de la somatostatine, la paire théranostique ⁶⁴Cu/⁶⁷Cu associée à l'octreotate, un peptide analogue de la somatostatine, a été utilisée pour imager et traiter les tumeurs chez la souris (Dearling et al. 2021). Après avoir constaté une fixation spécifique du vecteur aux tumeurs grâce à l'imagerie TEP au cuivre-64, les souris ont été traitées avec le cuivre-67. Avec l'unique injection de 18,5 MBq de [⁶⁷Cu]Cu-SARTATE, le développement de la maladie a été ralenti ce qui a permis d'augmenter la médiane de survie des animaux de 13 jours par rapport aux souris non traitées. Ce résultat qui témoigne du potentiel thérapeutique du cuivre-67 sur de petites masses tumorales.

III. Myélome multiple

1. Physiopathologie et épidémiologie

Le myélome multiple (MM) a été décrit pour la première fois en 1889 par un médecin autrichien, Otto Kahler, c'est pourquoi l'on parle aussi parfois de maladie de Kahler. C'est un cancer hématologique défini par la prolifération excessive d'un clone plasmocytaire dans la moelle osseuse. Les plasmocytes clonaux vont tous sécréter une même immunoglobuline (Ig) monoclonale complète ou sous la forme de fragments qui sont le plus souvent représentés par les chaînes légères des IgG ([Kazandjian 2016](#)). Ces chaînes légères ayant une masse molaire faible vont être retrouvées dans les urines, on les appelle des protéines de Bence Jones. Quelle que soit la forme des immunoglobulines retrouvées, elles sont facilement détectées et quantifiées lors des examens biologiques notamment par électrophorèse des protéines du sang et ne changent pas la prise en charge des patients myélomateux. Le plus communément, une IgG kappa est sécrétée, mais dans de rares cas les patients présentent une très faible voire une absence de sécrétion, on parle de myélome non sécrétoire qui représente 1 à 5% des cas ([Kanase et Middela 2009](#)).

En France, on compte environ 5500 nouveaux cas/an (Institut National du Cancer, 2022). Si cette pathologie est rare et représente moins de 2 % des cancers, elle reste encore aujourd'hui de mauvais pronostic. Le myélome multiple est la deuxième hémopathie la plus répandue après le lymphome non hodgkinien, et représente, 10 à 15 % des hémopathies cancéreuses. C'est une maladie prédominante chez les personnes âgées avec un diagnostic à l'âge médian de 70 ans pour les hommes et 74 ans pour les femmes qui touche préférentiellement les hommes avec un ratio de 1,4 : 1.

Ce cancer appartient au spectre des gammopathies monoclonales qui inclut aussi deux stades asymptomatiques de la prolifération pré-maligne de plasmocytes : la gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) et le myélome multiple asymptomatique (SMM). Ces deux stades asymptomatiques précèdent presque toujours le myélome multiple ([Turesson et al. 2014](#)).

La MGUS est une pathologie à faible risque, mais retrouvée chez 3 à 4 % des personnes âgées de plus de 50 ans. L'« International Myeloma Working Group (IMWG) » ([Rajkumar et al. 2014](#)) définit la MGUS par la détection d'une Ig monoclonale < 30 g/L dans les urines et le sang, avec la présence de 10% de plasmocytes monoclonaux dans la moelle osseuse (MO) sans atteinte des autres organes. Le SMM est défini par la présence dans le sérum d'une Ig monoclonale ≥ 30 g/L ou de plasmocytes présents à plus de 10% dans la moelle osseuse.

Ce sont aussi les deux signes qui définissent le MM lorsqu'ils sont associés à au moins l'un des signes cliniques suivants désignés par l'acronyme « CRAB » pour : hyper**C**alcémie, insuffisance **R**énale,

Anémie et lésions osseuses (« Bone lesions » en anglais) (Kyle et Rajkumar 2009; Rajkumar et al. 2014) :

- Hypercalcémie > 0,25 mmol/L par rapport à la limite normale ou > 2,75 mmol/L
- Insuffisance rénale avec une clairance de la créatinine < 40 mL par minute ou une créatinine sérique > 177 µmol/L
- Anémie avec un taux d'hémoglobine > 20 g/L en dessous de la limite normale, ou < 100 g/L
- Lésions osseuses : au moins une lésion osseuse ostéolytique sur le bilan d'imagerie (radiographie, scanner ou IRM)

Aux signes « CRAB » viennent s'ajouter plusieurs biomarqueurs récapitulés dans la figure suivante (Caers et al. 2018).

	MGUS	SMM	MM	
			Biomarqueurs	Signes CRAB
Protéine-M < 30 g/L	✓			
Plasmocytes clonaux de la MO < 10%				
Protéine-M > 30 g/L	----->	✓		
Plasmocytes clonaux de la MO > 10%	----->	✓		
Plasmocytes clonaux de la MO > 60%	----->	----->	✓	
Ratio chaînes légères libres > 100	----->	----->	✓	
IRM ≥ 2 lésions focales	----->	----->	✓	
Hypercalcémie	----->	----->	----->	✓
Insuffisance rénale	----->	----->	----->	✓
Anémie	----->	----->	----->	✓
Lésions osseuses	----->	----->	----->	✓

Figure 14. Diagnostic différentiel du spectre des gammopathies monoclonales (Traduit et adapté à partir de Caers et al. 2018)

2. Le diagnostic du myélome multiple

La découverte d'un MM chez un patient arrive souvent de façon fortuite lors par exemple d'une radiographie qui présentera des lésions osseuses suggestives ou lors d'un prélèvement de sang où l'on observera une vitesse de sédimentation anormalement rapide. Il s'en suivra un diagnostic poussé qui permettra d'identifier de façon précise le stade du MM (Greipp et al. 2005) et les risques qui lui sont associés afin de mettre en place le traitement le plus adapté. L'Association européenne d'hématologie et la Société européenne d'oncologie médicale (EHA-ESMO) ont publié en 2017 les directives concernant le diagnostic du MM qui comprend un bilan biologique et un bilan d'imagerie (Moreau et al. 2017).

Le bilan biologique est composé d'un test sanguin, un test urinaire et une biopsie médullaire :

1) Les tests sanguins

La numération de la formule sanguine est réalisée systématiquement puisqu'elle permet d'informer sur l'état d'avancement de la maladie. Au diagnostic, elle va mettre en évidence une anémie dans plus de 50% des cas et le plus souvent normocytaire. Une thrombopénie est parfois présente, dans 20 à 30% des cas, mais il est à noter que même si la numération plaquettaire est normale, des anomalies fonctionnelles qui se traduisent par des défauts de la coagulation peuvent être présentes. Pour contrôler cette anomalie, en parallèle du test sanguin, un contrôle du temps de saignement est réalisé. Quant aux leucocytes, ils sont souvent normaux au diagnostic avec de rares plasmocytes présents dans le sang périphérique. Ces anomalies des cellules sanguines sont dues au développement anormal des plasmocytes au sein de la moelle osseuse qui affecte surtout le processus hématopoïétique.

Un dosage des protéines sanguines associé à une électrophorèse des protéines sériques représente l'examen biologique sanguin le plus spécifique de la maladie. Une hypergammaglobulinémie monoclonale est retrouvée dans la plupart des cas, et est quantifiée. La caractérisation du type d'immunoglobuline est faite en examen complémentaire à l'aide soit de techniques d'immunofixation, soit de techniques d'immunoélectrophorèse. Le dosage des chaînes légères libres dans le sérum permettra de refléter l'état d'avancement de la maladie, plus la charge tumorale sera importante, plus la quantité de chaînes légères le sera aussi.

D'autres dosages sanguins sont systématiquement prescrits pour informer sur les critères pronostiques de la maladie, il s'agit principalement de β 2-microglobuline (β 2M) et des lactates déshydrogénases. Leurs taux sanguins sont corrélés avec la charge tumorale, et donc reflètent l'état d'avancement de la maladie. Les derniers dosages sanguins prescrits permettent de suivre les fonctions des organes qui sont le plus souvent atteints lors de l'évolution de la maladie. Ainsi l'état de la structure osseuse pouvant être dégradé par les lésions tumorales focales sera évalué

par le dosage de la calcémie. Les dosages de l'urémie et de la créatininémie associée au calcul de la clairance rénale refléteront les dégradations de la fonction rénale.

Les taux sériques de β 2M et d'albumine sont les deux paramètres pronostiques à partir desquels le stade du MM est établi par l'ISS (Greipp et al. 2005). β 2M reflète masse tumorale et fonction rénale (Durie et al. 1990), alors que l'albumine va refléter la fonction hépatique, la corrélation de ces deux tests a défini des valeurs limites précises permettant de distinguer significativement trois stades de pronostic de la maladie (**Tableau 4**).

2) Les tests urinaires

Les tests urinaires vont aussi permettre de détecter, quantifier et identifier les protéines M et les chaînes légères par électrophorèse et immunofixation des protéines totales. Ces analyses compléteront le diagnostic et donneront plus d'indications sur le fonctionnement rénal. Ce type de prélèvement moins contraignant aura notamment un intérêt dans le suivi de la maladie en révélant la charge tumorale corrélée à la quantité de chaînes légères dans les urines pendant et après traitement.

3) La biopsie de la moelle osseuse

Si les dosages sanguins et urinaires restent informatifs, le diagnostic est toujours confirmé à partir d'une biopsie de la MO. À partir de ce prélèvement, un myélogramme est réalisé pour évaluer et caractériser l'infiltrat plasmocytaire par immunohistochimie ainsi qu'une quantification et une identification des cellules myélomateuses par cytométrie en flux.

Sur ce même prélèvement de moelle osseuse, la technique cytogénétique d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) est utilisée afin d'établir le caryotype du patient. On retrouve chez les personnes atteintes d'un MM plusieurs anomalies génétiques qui pourront aider à évaluer le pronostic du patient. Les anomalies les plus fréquemment retrouvées concernent le chromosome 14 qui porte le locus du gène codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH). Ainsi, on retrouve des translocations interchromosomiques $t(4;14)$ et $t(11;14)$, ou intrachromosomique 14 (14q32.33). Un gain sur le chromosome 1q ou une délétion sur le chromosome 17p sont des anomalies génétiques fréquemment retrouvées et associées à un pronostic défavorable (Castaneda et Baz 2019). Ces différents risques cytogénétiques complètent la stadification établie par l'ISS (**Tableau 4**) pour consolider le pronostic lors du diagnostic.

Tableau 4. Classification des stades de facteurs de risque dans le MM par l'ISS et la prise en compte des risques cytogénétiques (adapté de Moreau et al. 2017).

	Stade ISS	Stadification de l'ISS mise à jour
I	$\beta 2M$ sérique < 3,5 mg/L et albumine sérique \geq 5,5 mg/L	Stade ISS + risques standard en anomalies chromosomiques
II	$\beta 2M$ sérique < 3,5 mg/L et albumine sérique < 3,5 mg/L ou $3,5 < \beta 2M < 5,5$ mg/L	Stade ISS
III	$\beta 2M$ sérique \geq 5,5 mg/L	Stade ISS + hauts risques en anomalies chromosomiques (del17p et/ou t(4;14))

Le bilan d'imagerie repose sur différentes techniques :

En complément du bilan biologique, lors du diagnostic, l'évaluation de l'atteinte osseuse du patient par la maladie est obligatoire. Il y a encore quelques années, la radiographie standard corps entier était l'examen de référence pour visualiser les lésions osseuses induites par le MM. Aujourd'hui, et depuis 2014, l'IMWG a inclus aux critères de diagnostic de la maladie des techniques d'imagerie plus sensibles et spécifiques des localisations de la maladie, tant au niveau osseux que dans les autres tissus. Actuellement, la TDM, l'IRM et la TEP au 2-[¹⁸F]F-fluorodésoxyglucose (2-[¹⁸F]F-FDG), qui met en évidence le métabolisme du glucose dans les tumeurs, sont toutes les trois utilisées et apportent chacune différentes informations qui orientent le clinicien dans son diagnostic (Rajkumar et al. 2014). Ces trois examens permettent de visualiser les lésions ostéolytiques \geq 5 mm. Le scanner corps entier à faible dose est aujourd'hui le seul examen d'imagerie obligatoire dans le diagnostic du MM (Moreau et al. 2017), c'est un examen réalisé sans l'injection de produit de contraste qui évite les contre-indications en cas d'insuffisance rénale chez le patient. En cas d'absence de lésions osseuses sur le scanner des patients, une IRM sera beaucoup plus sensible dans la détection des lésions cancéreuses des tissus mous et des lésions osseuses diffuses (Chaudhry et al. 2016). De plus, l'IRM pourra être capable de visualiser l'infiltrat plasmocytaire dans la MO responsable d'une compression pouvant être à l'origine de troubles neurologiques. En associant l'IRM à la TEP 2-[¹⁸F]F-FDG, l'imagerie fonctionnelle va augmenter la spécificité du diagnostic en limitant les risques de faux positifs en IRM (Behzadi et al. 2018). Compte tenu de la disponibilité des appareils de type TEP/IRM, la majorité du temps, le diagnostic repose sur l'imagerie TEP 2-[¹⁸F]F-FDG associée à la tomodensitométrie (TEP/TDM). C'est une méthode qui va permettre d'évaluer l'échappement des cellules cancéreuses dans des foyers extramédullaires, cette information sera importante pour le pronostic des patients (Jamet et al. 2020). De la même façon que pour l'IRM, l'imagerie

fonctionnelle TEP 2-^[18F]F-FDG va permettre d'augmenter la spécificité en limitant les erreurs d'interprétation des images de TDM. La TEP/TDM est aussi utilisée dans le cadre du suivi de la réponse thérapeutique et après traitement pour surveiller une éventuelle rechute.

3. Traitements

Les traitements actuels du MM ne sont pas curatifs, ils permettent néanmoins d'améliorer le confort et l'espérance de vie des patients. En France, entre 2010 et 2015, l'Institut National du Cancer registre une survie nette standardisée de 86% à 1 an et 60% à 5 ans chez les patients atteints de MM. Cette survie à 5 ans est fortement variable suivant l'âge du patient, elle passe de 80% chez les patients âgés de 50 ans au diagnostic à seulement 42% chez ceux de 80 ans et diminue encore avec l'âge.

La prise en charge thérapeutique est différente selon la classe d'âge et l'état des patients au moment du diagnostic. Chez les patients âgés de plus de 65 ans qui ne sont pas éligibles à la transplantation de cellules souches autologues de la MO, la stratégie thérapeutique est résumée dans la **Figure 15** suivante. Elle consiste en une association thérapeutique qui va agir sur différentes cibles tumorales elle associe le plus souvent un agent alkylant de l'ADN, un inhibiteur du protéasome et un agent immunologique capable d'amplifier la réponse immunitaire antitumorale. Peu importe le schéma thérapeutique choisi pour le patient, la corticothérapie est toujours présente associée à la chimiothérapie.

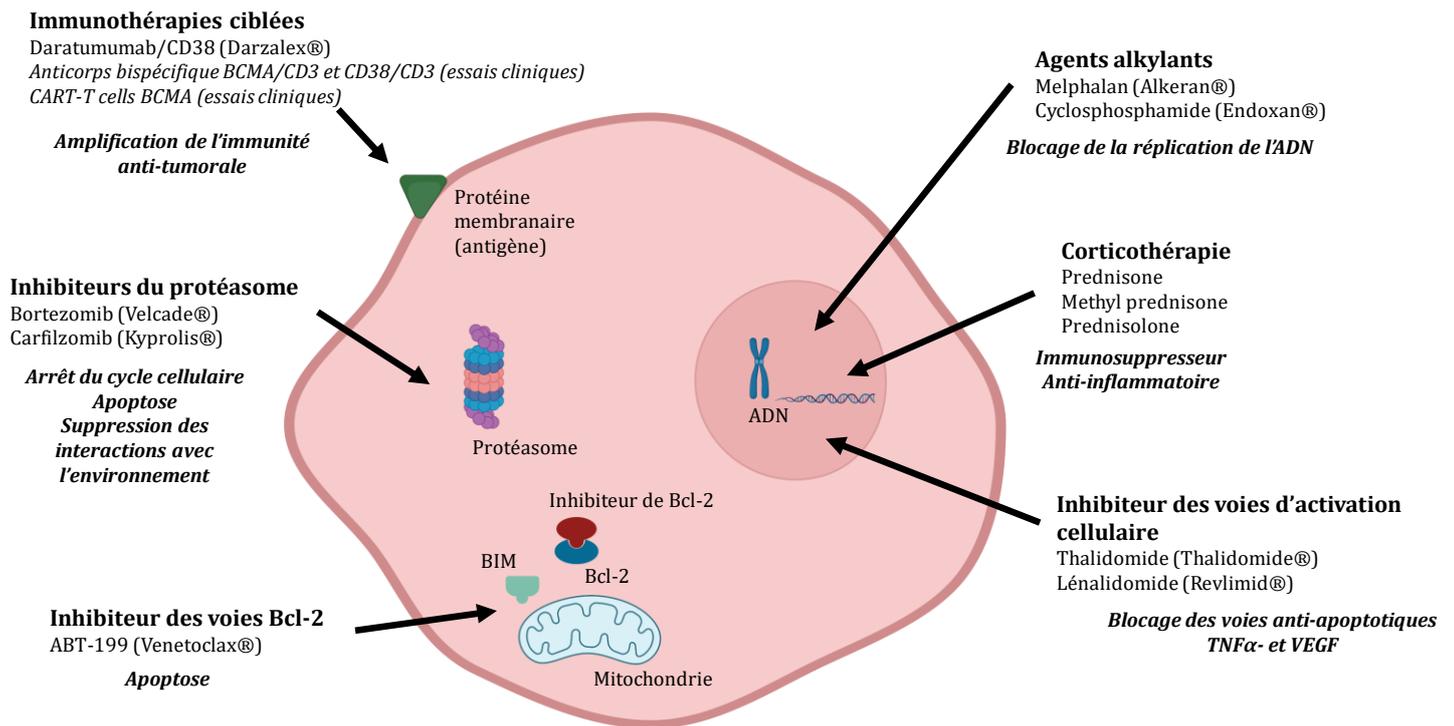


Figure 15. Représentation schématique de l'ensemble de la stratégie thérapeutique contre le myélome multiple (créée avec Biorender.com)

Ce schéma représente les principales stratégies thérapeutiques utilisées en clinique pour traiter le myélome multiple. Les différentes stratégies vont agir sur trois grands aspects biologiques au niveau de la tumeur : les immunothérapies ciblées et les corticothérapies vont favoriser une immunité anti-tumorale ; les agents alkylants vont inhiber la prolifération tumorale ; les inhibiteurs des voies d'activations cellulaires, les inhibiteurs du protéasome et les inhibiteurs des voies Bcl-2 vont induire l'apoptose des cellules tumorales.

Chez les patients éligibles à une greffe de cellules souches autologues, la ligne de traitement est composée de trois phases principales. Une première phase dite d'induction, il s'agit d'une phase de préparation à la greffe de cellules souches autologues, le but étant de diminuer au maximum la charge plasmocytaire présente dans la MO. La stratégie de traitement est la même que celle décrite précédemment, seules les posologies seront adaptées. La deuxième phase est le conditionnement à la greffe, le protocole le plus utilisé de nos jours repose sur l'association Daratumumab-bortézomib-thalidomide-déxaméthasone (D-VTD) qui a montré que les patients bénéficiaient d'une survie sans progression à 18 mois (Moreau et al. 2019) supérieure à celle des anciens protocoles (Moreau, Attal, et Facon 2015; Attal et al. 2017). Juste avant la greffe autologue de cellules souches de la MO, une phase de conditionnement par l'administration d'une forte dose de melphalan à raison de 200mg/m² qui met en aplasie les patients est réalisée. Après la greffe, une phase de maintien est proposée afin d'augmenter les taux de survie à long terme. En cas de rechute avérée, la stratégie thérapeutique reste identique à celle décrite précédemment. Cependant

aujourd'hui, de nouvelles molécules sont proposées afin de pallier les résistances aux molécules en première ligne. De ce point de vue, des progrès conséquents reflétés par le nombre croissant d'essais cliniques proposés dans les traitements des myélomes multiples ont été faits (**Figure 16**).

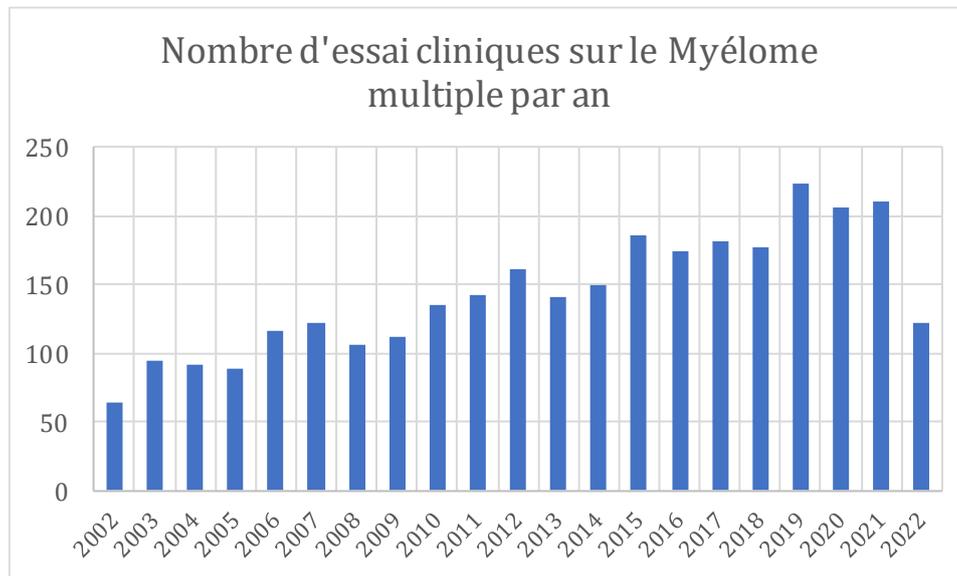


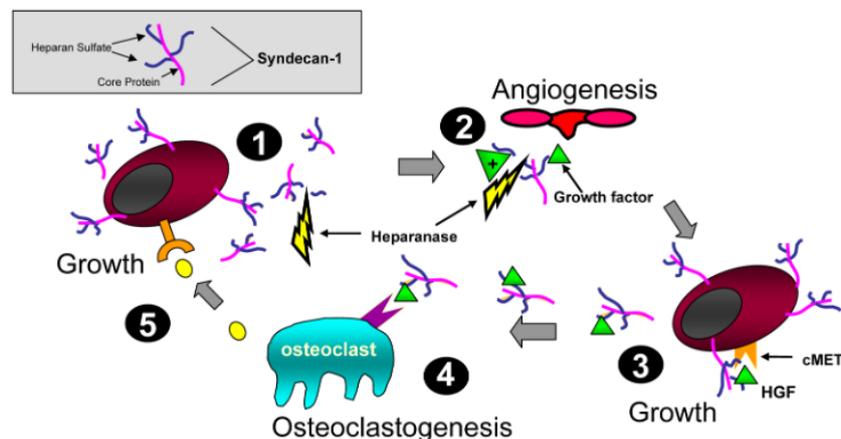
Figure 16. Évolution des essais cliniques sur le myélome multiple entre 2002 et 2022
(extrait de PubMed)

Parmi les dernières stratégies développées, l'immunothérapie par le ciblage de récepteurs membranaires présents sur les plasmocytes est la plus développée, on parle de thérapies ciblées. Deux principales protéines membranaires sont impliquées dans cette stratégie : le CD38 et le BCMA ([Palumbo et al. 2016](#); [Moreau et al. 2022](#); [Zhao et al. 2022](#)). Dans ce travail de thèse, nous sommes intéressés à deux autres cibles moléculaires connues pour être exprimées de façon importante par les plasmocytes des patients myélomateux : le syndecan-1 (ou CD138) et le CXCR4 (ou CD184).

IV. Cibles théranostiques dans le MM

1. Le syndécan-1 (CD138)

Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe précédent, le syndécan-1 est l'une des cibles d'intérêt choisies pour ce travail de thèse. Voyons plus en détail en quoi son ciblage est intéressant pour la mise en place d'une stratégie théranostique dans le MM. Le CD138 appartient à la famille des protéoglycanes transmembranaires qui joue un rôle important dans l'adhésion et la signalisation cellulaire par le biais de multiples interactions cellulaires, mais aussi avec la matrice extracellulaire (Carey 1997; Sanderson et Yang 2008). Chez l'humain, c'est une protéine abondante à la surface des cellules myélomateuses circulantes et de la MO, mais on la retrouve aussi exprimée par les plasmocytes sains, les cellules épithéliales et les précurseurs des cellules B (Sanderson, Lator, et Bernfield 1989; Kind et al. 2019). Le CD138 est aujourd'hui largement utilisé comme marqueur standard pour l'identification des cellules myélomateuses. Ses nombreuses interactions avec des chimiokines et des facteurs de croissance favorisent la survie et la prolifération des cellules tumorales dans la MO comme cela est succinctement montré dans la **Figure 17** (Derksen et al. 2002; Mahtouk et al. 2006). Ainsi il a été montré que l'inhibition de CD138 permettait de diminuer la croissance cellulaire *in vivo* et d'augmenter l'apoptose (Beauvais et al. 2016). L'implication du CD138 dans le développement du myélome multiple rend son ciblage intéressant dans le cadre d'une thérapie.



- 1 Excrétion du CD138 par les cellules du MM
- 2 Le CD138 piège les facteurs de croissance et chimiotactique dans le microenvironnement tumoral → Stimulation de l'angiogenèse
- 3 Prolifération des cellules tumorales en réponse aux facteurs de croissance
- 4 Activation des ostéoclastes médiée par le CD138
- 5 L'activation des ostéoclastes stimule la prolifération de ces du MM

Figure 17. Rôle du Syndécan-1 dans la prolifération des cellules du myélome multiple (Sanderson et Yang 2008)

Des premiers essais cliniques (Jagannath et al. 2019) avec un anticorps monoclonal associé à une molécule antimétabolite a montré la pertinence du ciblage du CD138 dans un cadre thérapeutique. Dans un essai de radiothérapie interne, l'étude dosimétrique d'un anticorps anti-CD138 radiomarqué à l'iode-131 injecté chez 4 patients a établi la pertinence du ciblage du syndécan-1 pour la mise en place d'une RIV (Rousseau et al. 2012). En préclinique, plusieurs travaux réalisés par notre équipe ont aussi montré l'intérêt de cibler le CD138 en RIV (Chérel et al. 2013; Gouard et al. 2014; Fichou et al. 2015; Gouard et al. 2020).

2. Le CXCR4 (CD184)

La deuxième cible sur laquelle nous avons choisi de travailler est le récepteur CXCR4, qui fait partie du sous-type des récepteurs à chimiokines CXC de la famille des récepteurs des chimiokines couplés aux protéines G (Ullah 2019, 4). Les chimiokines sont des cytokines chimioattractantes des cellules immunitaires largement impliquées dans le processus cancérigène (inflammation, migration et prolifération des cellules tumorales, angiogenèse ...) (Nagarsheth, Wicha, et Zou 2017). Le CXCR4 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires exprimé de façon ubiquitaire dans les différentes cellules hématopoïétiques, mais aussi dans les cellules hépatocytaires, pulmonaires, rénales, cérébrales et bien d'autres encore (Murphy et Heusinkveld 2018). Le CXCL12, ou SDF-1 (stromal derived factor 1), est le ligand endogène du CXCR4, cette voie d'activation intervient dans plusieurs processus physiologiques comme la réponse immunitaire, l'hématopoïèse ou la neurogenèse par exemple, mais aussi dans des processus protumoraux tels que l'angiogenèse, la survie et la prolifération cellulaire (Pozzobon et al. 2016).

Dans le MM, on retrouve une surexpression du CXCR4 par les cellules myélomateuses associées à un mauvais pronostic chez les patients (Zhang et al. 2020). Le CXCR4 joue un rôle important dans la prolifération et la migration des cellules tumorales. L'expression du CXCL12 par les cellules souches de la MO induit une migration des cellules myélomateuses exprimant le CXCR4 vers le MO à travers son endothélium (Peled et al. 2018). L'interaction du CXCL12/CXCR4 va entraîner l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire telle que la voie MAPK et Akt (Guo et al. 2016). L'implication de la signalisation CXCL12/CXCR4 a été établie depuis le début des années 2000 dans le phénomène métastatique osseux des cellules tumorales (Müller et al. 2001). L'expression du CXCR4 par les cellules myélomateuses joue aussi un rôle dans la résistance aux traitements (Waldschmidt et al. 2017). L'adhésion des cellules du myélome aux cellules souches de la MO médiée par l'interaction du SDF-1 et du récepteur CXCR4 s'accompagne d'une production accrue de facteurs de croissance et de cytokines protumorales à l'origine de cette résistance aux traitements (Dehghanifard et al. 2018).

En raison de l'ensemble de ces processus protumoraux induit par la voie de signalisation CXCR4/CXCL12, le défi des années à venir est de pouvoir proposer une thérapie ciblée anti-CXCR4 efficace dans le MM.

Dans cette optique, un intérêt autour de l'imagerie moléculaire du CXCR4 s'est développé afin d'affiner le diagnostic du MM. En effet l'association de l'imagerie métabolique avec la TEP 2-[¹⁸F]F-FDG à celle du phénotype CXCR4 des cellules cancéreuses permet de mieux sélectionner les patients pour des traitements spécifiques. Plusieurs études cliniques ont étudié l'intérêt de l'imagerie au [⁶⁸Ga]Ga-Pentixafor (**Figure 18**), un peptide anti-CXCR4, notamment pour établir ensuite une thérapie ciblée anti-CXCR4 (Buck et al. 2022). Depuis 2021, deux essais cliniques (PENTIMYELO ; PENTI-MIDAS) au CHU de Nantes évaluent la pertinence de la TEP au [⁶⁸Ga]Ga-Pentixafor en comparaison à la TEP 2-[¹⁸F]F-FDG.

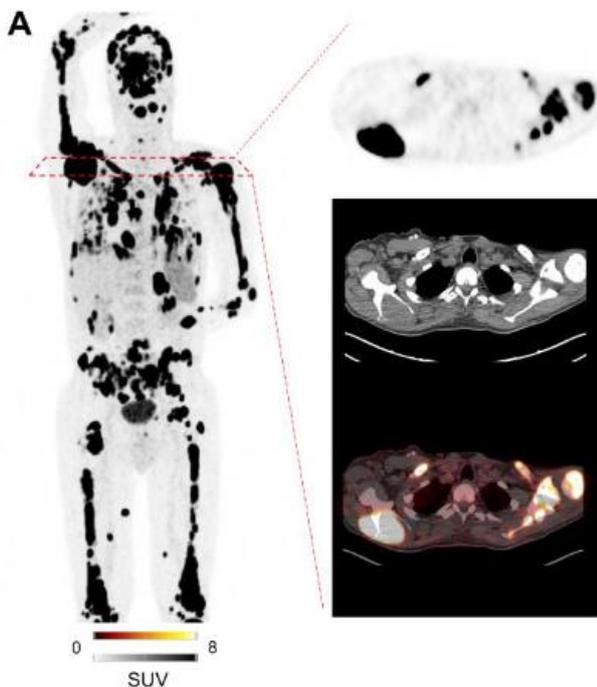


Figure 18. Imagerie TEP au [⁶⁸Ga]Ga-Pentixafor chez un patient atteint du MM (Buck et al. 2022)

Sur la base des résultats prometteurs de l'utilisation de ce peptide pour diagnostiquer les patients atteints d'un MM, des premiers tests thérapeutiques, combinant ce vecteur à des émetteurs β^- , ont été réalisés. Le prétraitement au [¹⁷⁷Lu]Lu-Pentixather en combinaison à une chimiothérapie et d'une autogreffe de cellules souches, a permis de réduire le caractère hypermétabolique des lésions tumorales (Herrmann et al. 2016). Ces premiers résultats sont encourageants pour l'optimisation de l'efficacité des traitements administrés en parallèle du radiopharmaceutique.

Objectifs de thèse

En médecine nucléaire, l'approche théranostique est un outil prometteur qui contribue à la médecine personnalisée en proposant de sélectionner, par l'imagerie moléculaire, des patients susceptibles de répondre à une radiothérapie ciblée. Dans ce contexte, la recherche constante de nouveaux radiopharmaceutiques est essentielle pour le futur transfert en clinique d'outils théranostiques innovants. Le cuivre-64 est un radionucléide intéressant avec un potentiel théranostique unique. Son intérêt pour des applications diagnostiques par l'imagerie TEP est déjà reconnu avec le [⁶⁴Cu]Cu-DOTATATE ou [⁶⁴Cu]Cu-DOTA-trastuzumab par exemple. Mais, même si quelques travaux ont montré l'intérêt du cuivre-64 associé à un vecteur pour une application thérapeutique, sa valeur en radiothérapie reste un sujet relativement peu étudié, et rien n'a clairement été démontré à ce jour.

L'objectif de ce travail de thèse, qui s'articule autour de deux axes d'études, est d'évaluer le cuivre-64 comme radionucléide émetteur de particules β^+/β^- pour réaliser des radiopharmaceutiques innovants à propriétés théranostiques dans des modèles précliniques. Les résultats de ce projet préclinique apporteront des informations essentielles et de nouvelles perspectives pour extrapoler ce qui pourrait se passer chez l'humain en clinique.

1. Le premier axe de ce travail a été consacré à l'évaluation préclinique d'un anticorps murin ciblant le CD138 radiomarké au cuivre-64 dans un modèle syngénique de MM, pour des applications diagnostiques par l'imagerie TEP-TDM, et des applications thérapeutiques en RIV. Dans un second temps, l'efficacité théranostique de ce même radioimmunoconjugué a été évaluée dans un modèle murin de tumeur solide de cancer du sein triple négatif qui présente une expression de la cible CD138 plus hétérogène.
2. Le deuxième axe est consacré à l'étude de la spécificité de ciblage d'un anticorps humain anti-CXCR4 radiomarké au cuivre-64 dans différentes lignées cellulaires de MM pour le diagnostic par imagerie TEP-TDM.

Partie II :
Évaluation théranostique
d'un anticorps anti-CD138
radiomarqué au cuivre-64

I. Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

Dans un premier temps, nous avons cherché à développer un modèle murin de myélome multiple. Pour cela, nous disposions au laboratoire de deux lignées murines (MOPC315.BM et 5T33) nous permettant de mettre en place un modèle syngénique murin. Nous avons comparé l'expression du CD138 dans ces deux lignées.

La lignée cellulaire murine de myélome multiple MOPC315.BM a été fournie par le Professeur Bjarne Bogen (Département d'immunologie, Centre de régulation immunitaire, Institut de médecine clinique, Université d'Oslo, Oslo, Norvège)([Hofgaard et al. 2012](#)). Les cellules MOPC315.BM sont des cellules non adhérentes qui ont un temps de doublement (Td) relativement rapide d'environ 13 heures. Elles ont été cultivées dans un milieu RMPI 1640 (Gibco, Life Technologies) complété de 2 mM de L-Glutamine (Gibco, Life Technologies), de 100 µg/mL de streptomycine et pénicilline (Gibco, Life Technologies), de 1 % d'acides aminés non essentiels (MEM NEAA) 100X (Gibco, Life Technologies), 1 % de pyruvate de sodium (Gibco, Life Technologies) et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (CVFSVF00-01, Eurobio Scientific).

La lignée cellulaire murine de myélome multiple 5T33 nous a été fournie par le Pr Harvey Turner (Département de médecine nucléaire, Fremantle Hospital, Australie occidentale) avec l'autorisation du Dr J. Radl (TNO Institute, Leiden, Pays-Bas). Ce sont des cellules en partie adhérentes, mais aussi en suspension qui présentent un temps de doublement plus long que les cellules MOPC315.BM d'environ 25 heures ([Manning et al. 1992](#)). Les cellules 5T33 ont été cultivées dans les mêmes conditions que les cellules MOPC315.BM, mais en absence de pyruvate de sodium et de MEM NEAA.

Dans un second temps, nous avons cherché à mettre en place un modèle du cancer du sein. Pour cela, nous avons caractérisé une des lignées disponibles au laboratoire et qui était décrite comme exprimant le CD138 : la lignée murine de cancer du sein triple négatif 4T1.

La lignée cellulaire 4T1 (ATCC ; American Type Culture Collection), a été cultivée dans les mêmes conditions que la lignée 5T33. Elles se présentent en culture sous forme de cellules adhérentes qui ont un temps de doublement aussi rapide que les cellules MOPC315.BM (environ 13 heures).

Toutes les cellules ont été repiquées trois fois par semaine et maintenues à 37°C sous 5% de CO2 et 95% d'humidité. De façon à être dans des conditions optimales d'expression du récepteur, elles ont été utilisées pour les expériences à une confluence maximale de 80% et avant d'atteindre plus de 12 repiquages.

Les cellules tumorales cultivées ont régulièrement été testées pour confirmer leur non-contamination par des mycoplasmes, à l'aide du kit de HEK-Blue™ détection (Invivogen, Toulouse, France). En cas de contamination, les cellules tumorales, les milieux de culture utilisés ainsi que les réactifs ont été éliminés et tout le matériel (incubateur, centrifugeuse et PSM) utilisé pour la culture cellulaire a été désinfecté.

2. Anticorps 9E7.4 et isotype IgG2A

L'anticorps monoclonal (AcM) 9E7.4 est une immunoglobuline (Ig) G-2a de rat qui reconnaît la protéine CD138 chez la souris et qui a été produit au sein de notre équipe Oncologie Nucléaire, à partir d'un hybridome, purifié sur protéine A et par gel d'exclusion diffusion pour être conditionné au final sous la forme d'une solution à environ 1,4 mg/mL en PBS. Le peptide 2 qui permet sa caractérisation est un peptide de 40 acides aminés (aa) (GeneCust, Luxembourg) dérivé de la protéine CD138 murine (aa 90-130) (GenBank : CAA80254.1). Ce peptide 2 a été fixé sur des billes magnétiques afin d'évaluer la fixation de l'anticorps sur sa cible après radiomarquage.

Pour les expérimentations in vivo, nous avons également utilisé un isotype de l'anticorps 9E7.4, une IgG2a de rat non spécifique du CD138 (Bio-Techne, clone 54447) afin de contrôler la spécificité de la fixation de notre anticorps d'intérêt en imagerie TEP.

3. Analyse par cytométrie en flux

L'expression de la cible CD138 par nos trois lignées cellulaires d'intérêt a été caractérisée avec l'AcM 9E7.4 par cytométrie en flux. Pour chaque lignée cellulaire, 500 000 cellules en tampon PBS/SVF 10% ont été incubées avec l'anticorps 9E7.4 pendant 45 minutes à 4°C sur glace en suivant une gamme de concentration de 6 points de 25 à 0,008 µg/mL (dilution en cascade au 1/5^e) ou une gamme en 5 points de 4 à 0.25 µg/mL (dilution en cascade au 1/2). Après la phase d'incubation, les cellules ont été lavées à deux reprises avec du tampon PBS/SVF 10% à 4°C pour éliminer les fractions non fixées d'anticorps. Les cellules ont alors été incubées avec un excès d'anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (FITC) (concentration à 5 µg/mL) et dans les mêmes conditions que précédemment (45 min à 4°C). Cet anticorps va se fixer spécifiquement sur les IgG de rat (Jacksonimmunosearch 112-096-143) pour révéler la fixation de l'anticorps 9E7.4 présent sur les cellules. En parallèle, sur des cellules encore non marquées, nous avons réalisé un contrôle de la fixation spécifique de l'AcM 9E7.4 par son fragment spécifique et non par son fragment Fc en utilisant un isotype IgG2a,k-FITC (BD Biosciences, 553929).

Après les phases d'incubation avec les anticorps fluorescents (anticorps secondaire et l'isotype), les cellules ont été lavées puis reprises dans du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dilué en tampon PBS/SVF 10% pour être à une concentration finale de 0,2 µg/mL. Le DAPI est un marqueur de viabilité, il pénètre dans les cellules mortes dont les membranes cytoplasmiques et

nucléaires sont perméables et se fixe spécifiquement à l'ADN. Les cellules ont ensuite été analysées à l'aide du FACS Calibur™ en utilisant le logiciel d'acquisition Diva (BD Biosciences) et sur le logiciel FlowJo™ (version 10.6.1, BD Sciences). Les cellules ont d'abord été triées selon leur taille, leur granulosité et leur viabilité. Dans un second temps l'expression spécifique du CD138 a été évaluée à partir du contrôle isotypique non spécifique.

4. Les modèles animaux

Toutes les expérimentations animales ont été réalisées en accord avec la directive européenne 2010/63/EU relative à la protection des animaux de laboratoire et sa transposition dans la loi française (décret n°2013-118). Les études précliniques ont été conduites sur la plateforme UTE (SFR François Bonamy, IRS-UN, Université de Nantes) (autorisation D44-278). Les autorisations du projet d'expérimentation animale (APAFIS #22766 pour les radiothérapies ; APAFIS #6145 pour les études de ciblage) ont été délivrées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, après avis favorable du comité d'éthique pour l'expérimentation animale (CEEA) local de Pays de Loire (CEEA-06).

Pour l'ensemble de nos expérimentations in vivo, nous avons utilisé des souris femelles BALB/cJrj achetées auprès des laboratoires Janvier. Elles ont été hébergées dans l'animalerie de l'UTE, à hauteur de 5 souris maximum par cage, dans des conditions stériles et exemptes de pathogènes.

Au début des expérimentations, les souris étaient âgées de 8 à 11 semaines et avaient un poids moyen de 19-20 g. Après réception, une période d'acclimatation des souris de 7 jours a été respectée avant toutes manipulations expérimentales.

- Modèles murins de myélome multiple

Deux modèles de greffes tumorales des cellules MOPC315.BM ont été mis en place : un modèle orthotopique et un modèle hétérotopique.

Le modèle orthotopique, qui mime plusieurs caractéristiques de MM chez l'humain, a été réalisé par injection intraveineuse (i.v) dans la veine latérale caudale de 2×10^5 cellules dans 100 μ L de NaCl 0,9%. Les cellules MOPC315.BM ont un tropisme pour la moelle osseuse conduisant au développement des lésions ostéolytiques chez l'animal avec une médiane de survie de 33 jours ([Hofgaard et al. 2012](#)).

Le second modèle utilisé, pour lequel il est plus facile de suivre l'évolution de la maladie, est un modèle de greffe hétérotopique, mis en place par l'injection sous-cutanée (s.c) de 2×10^5 cellules dans 100 μ L de NaCl à 0,9% au niveau de l'épaule de la souris. Ces injections s.c ont été réalisées sous anesthésie générale gazeuse avec un mélange d'isoflurane à 3% et d'oxygène. Le modèle s.c a été utilisé pour l'étude de la biodistribution ex vivo, de la dosimétrie et du suivi par imagerie

TEP de notre vecteur, [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4. Il a aussi été utilisé pour évaluer le potentiel thérapeutique de notre vecteur sur un modèle sous-cutané afin d'évaluer comment le traitement pourrait agir sur des tumeurs solides.

- Modèle murin de cancer du sein triple négatif

Après avoir vérifié l'absence de contamination des cellules 4T1 par des mycoplasmes, ces dernières ont été greffées par injection s.c au niveau de l'épaule droite des souris à raison de 5 x 10⁴ cellules dans 50 µL de NaCl à 0,9%. Les injections s.c ont été réalisées sous anesthésie générale avec un mélange d'isoflurane à 3% et d'oxygène.

5. Fonctionnalisation de l'AcM 9E7.4 par le 1-picolinate, 6-para isothiocyantobenzyl tetraazacyclo tetradecane (p-SCN-Bn-TE1PA)

L'anticorps 9E7.4 qui a été utilisé tout au long de cette étude est issu d'un même lot de production qui a été conservé en PBS (phosphate buffer saline) à 4°C à une concentration de 1,4 mg/mL. Avant son utilisation, la concentration de l'anticorps a été contrôlée par spectrométrie d'absorption à 280 nm (Nanodrop One, Thermo Scientific) et calculée avec la formule suivante :

$$[C] = \frac{A}{l \cdot \epsilon_M},$$

où A est l'absorbance de la solution mesurée à 280 nm et ϵ_M le coefficient d'extinction molaire d'une IgG estimée à 210 000 ($A = 1.4$ pour une solution à 1 mg/mL). La pureté de l'anticorps a été contrôlée par U-HPLC (Acquity, Waters) avec une colonne « Protein BEH SEC » (Waters). L'élution de l'anticorps sur la colonne est réalisée à un débit de 0,4 mL/min en tampon phosphate 0,1 M à un pH de 7,2. La détection UV a été faite à 280 nm et l'analyse des résultats a été effectuée sur le logiciel Empowers Pro 1154. Compte tenu des résultats obtenus dans le laboratoire lors de travaux précédents, nous avons choisi de modifier notre anticorps avec un ligand qui engendre des complexes de cuivre particulièrement stables in vivo. Ce ligand est un dérivé picolinate du cyclam qui présente une certaine spécificité vis-à-vis du cuivre, une très bonne inertie du complexe de cuivre formé et une formation de ce complexe à température ambiante. Le ligand a été fonctionnalisé par les chimistes du Laboratoire CEMCA (UMR 6521) de Brest dirigé par le Pr. Raphaël Tripier, sous la forme d'un dérivé para-benzyl-isothiocyanate greffé sur le squelette carboné du cyclam.

La greffe du dérivé fonctionnalisé, que l'on nommera par la suite TE1PA, sur les amines libres des résidus lysine de l'anticorps 9E7.4, a été réalisée selon une méthode développée et standardisée dans notre laboratoire (Frindel et al. 2014; Navarro et al. 2019). Tout d'abord, dans une solution contenant 10 mg d'anticorps (66,67 nmoles ; 7,15 mL) en tampon PBS, nous avons ajouté un excès d'Ethylène Diamine Tetra Acétique acide (EDTA ; 7,15 µmoles ; 0,715 mL) sous forme de solution

aqueuse (10mM ; pH 6) afin de complexer les métaux présents dans les solutions d'anticorps dus aux différentes étapes de production. Après 1 heure d'incubation sous agitation à température ambiante, l'EDTA a été éliminé et, dans la même opération, l'anticorps a été concentré en tampon carbonate de qualité « trace select » (0.3M ; pH 8) par ultracentrifugation sur membrane (Amicon Ultra-4, PLGC, membrane Ultracel-PL, 10 k, Millipore). Le choix du tampon carbonate a été fait pour que le milieu réactionnel soit à un pH supérieur au pH-isoélectrique des IgG de rat afin qu'un maximum de résidus amines primaires de l'anticorps soient non ionisés et donc réactifs vis-à-vis du TE1PA. Pour cela, le filtre est d'abord conditionné en eau milliQ avec 3 mL à 3000 g pendant 3 minutes pour humidifier la membrane du filtre, puis avec 3 mL de tampon carbonate à 3000 g pendant 3 minutes. L'anticorps est ensuite placé dans le filtre et l'EDTA est éliminé par 10 cycles d'ultracentrifugation à 3000 g à 7 minutes en tampon carbonate. La concentration de l'anticorps a ensuite été ajustée avec du tampon carbonate à une concentration maximale de 5 mg/mL pour garantir la qualité de son stockage.

Pour le couplage, 5 mg (8,45 μ moles) du ligand p-SCN-Bn-TE1PA (PM : 591,7 g/mole) ont été dissous en acide chlorhydrique « trace select » (0.1M). 80 μ L (1,33 μ moles, 20 équivalents) de cette solution ont été ajoutés au 2 mL (10 mg ; 66,67 nmoles) de la solution d'anticorps en tampon carbonate. Après avoir vérifié son pH (compris entre 8 et 8,5), la solution a ensuite été incubée pendant 15 heures à température ambiante sous agitation. Afin de retirer l'excédent de ligands non couplés à l'anticorps, une purification sur gel d'exclusion-diffusion à l'aide d'une colonne PD-10 avec un seuil d'exclusion à 10kD (GE Healthcare) a été réalisée. Pour éviter la fixation non spécifique de l'anticorps sur la phase stationnaire, 10 mL de PBS/BSA 0,1% ont été injectés dans la colonne avant de la conditionner en acétate de sodium « trace select » (0,1 M ; pH 6,5), ce qui nous permettra ensuite de réaliser les radiomarquages sans avoir besoin de changer à nouveau de conditionnement. Après dépôt de 1 mL de la solution d'anticorps à purifier en tête de colonne (2 colonnes ; 5 mg d'anticorps par colonne), ces dernières ont été éluées par 19 fractions de 0.5 ml de tampon acétate. L'anticorps conjugué au ligand a été récupéré dans le volume de rétention de 3 à 4,5 mL, et les ligands libres, qui sont d'un poids moléculaire inférieure à 10kD, ont été récupérés dans les volumes de rétention de 7 à 10 mL. Un contrôle de l'absorbance des fractions contenant l'Ac couplé a été réalisé et les fractions ont été rassemblées en prenant garde à ce que la concentration finale ne dépasse pas 5mg/mL pour éviter tout phénomène d'agrégation.

6. Radiomarquage de l'anticorps 9E7.4 au cuivre-64

Le dichlorure de cuivre-64 ($[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$) est fourni par le cyclotron ARRONAX (Saint-Herblain, France) en solution d'acide chlorhydrique 0,1 M. La pureté radionucléidique est vérifiée avant livraison par spectrométrie gamma à l'aide d'un détecteur DSPEC-JR-2.0 type 98-24B HPGE

(AMETEK), de même que la pureté chimique, vérifiée par ICP-OES en utilisant un iCAP 6500 DUO (Thermo Fischer Scientific).

Dix pour cent d'acétate de sodium « trace select » (2,5 M) ont été ajoutés au volume de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ pour maintenir un pH à 6. En fonction des quantités de métaux présents dans la source reçue, une quantité calculée de 9E7.4-TE1PA a été ajoutée à la solution d'acétate de cuivre afin d'obtenir un rapport anticorps/métaux totaux proche de 1 pour éviter une purification après le radiomarquage. Les volumes du mélange réactionnel sont ensuite ajustés avec de l'acétate de sodium à 0,1 M, puis incubés à 42°C pendant 30 minutes. À la fin du radiomarquage, 10 équivalents d'EDTA à 1 mM ont été ajoutés afin d'arrêter la réaction et complexer le $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ libre. Après le radiomarquage, une série de contrôles est effectuée avant l'utilisation du produit final. Enfin, suivant les besoins de l'expérimentation, l'ajustement des volumes de la solution de radiomarquage a été réalisé avec du NaCl 0,9%. De façon à respecter les protocoles d'injection aux animaux, chaque fois que cela était nécessaire, la solution d'anticorps radiomarquée a été complétée avec des quantités calculées d'anticorps « froid », afin de pouvoir respecter les activités ainsi que les quantités totales définies pour chaque plan expérimental.

Les radiomarquages des autres anticorps et protéines qui seront décrits dans cette thèse ont été réalisés selon la même méthode que celle décrite ci-dessus.

7. Contrôles des radiomarquages

Le premier contrôle réalisé sur la solution d'anticorps radiomarquée est celui de la pureté radiochimique. Pour cela, 1 μL de la solution de radiomarquage a été déposé à 1 cm du bas d'une plaque de chromatographie en couche mince (ITLC-SG) (Agilent Technologies). Le chromatogramme a été développé sur 10 cm en utilisant comme tampon de migration, du citrate (0,1M ; pH 4,5). Après migration, l'échantillon a été exposé 1 min sur un écran de phosphorescence avant d'être lu par un imageur radiométrique Cyclone Plus (PerkinElmer) et analysée par le logiciel Optiquant.

Un second contrôle consistait à vérifier que le site de reconnaissance spécifique de l'anticorps n'ait pas été altéré par le radiomarquage. Pour cela, nous avons réalisé des tests d'immunoréactivité à l'aide de billes magnétiques modifiées avec des esters d'acide de type N-Hydroxy Succinimide (NHS) (Thermo Fischer Scientific) préalablement conjuguées avec le peptide 2 décrit précédemment. Les billes conjuguées ont été placées dans du PBS à une concentration finale de 10 mg/mL. Ensuite, 1, 0,5 et 0,2 pmol de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ont été déposées sur 10 μL de la suspension de billes qui correspond à un large excès d'antigène par rapport à la quantité d'anticorps déposée. Enfin une solution protéique de saturation (PBS/BSA 0,1%) a été ajoutée aux échantillons pour éviter les fixations non spécifiques de l'AcM 9E7.4 et ce, jusqu'à obtenir un

volume final de 100 μ L. Les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant 30 minutes sous agitation. En utilisant un rack magnétique (MagRack, GE Healthcare), les surnageants et les billes ont été collectés séparément et comptés dans un compteur gamma (Wallac 1480 Wizard γ -counter, PerkinElmer). L'immunoréactivité a été calculée avec la formule suivante :

$$\text{Immunoréactivité} = \frac{\text{activité associée aux billes}}{\text{activité totale}} \%$$

8. Captation cellulaire du vecteur [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 par les cellules MOPC315.BM

Bien que le contrôle post-radiomarquage de l'immunoréactivité et de la pureté de notre vecteur soient suffisants pour son utilisation *in vivo*, nous avons aussi évalué la fixation du vecteur [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 sur les cellules MOPC315.BM au cours du temps *in vitro*. Pour cela, deux jours avant les expériences, des cellules MOPC315.BM ont été déposées sur des plaques de culture à 6 puits à raison de 1 x 10⁵ cellules/mL. Une quantité de 334 pmol de 9E7.4- TE1PA et de BSA-TE1PA ont été radiomarqués avec du [⁶⁴Cu]CuCl₂. Cette quantité d'anticorps a été choisie après une expérimentation de mise point. Elle permet la réalisation en triplicata d'une gamme complète de concentrations d'anticorps pour caractériser les sites de fixation CD138.

Ainsi, des concentrations croissantes de [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 (0,5 ; 1 ; 1,8 et 5,5 pmol d'anticorps/puits) ont été déposées sur les cellules (n=3 par conditions). Afin de rendre compte de la spécificité de la fixation de notre vecteur, différents contrôles ont été réalisés en parallèle. Sur des cellules incubées avec le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, un excès d'au moins 100 équivalents de 9E7.4 mAb seul a été déposé pour déplacer l'anticorps radiomarqué de sa cible. Enfin, afin d'évaluer la fixation non spécifique, nous avons décidé, pour des raisons de coût financier, d'utiliser l'albumine de sérum bovin (BSA) qui ne reconnaît pas spécifiquement le CD138 plutôt que l'anticorps isotypique. Les cellules ont été incubées, dans les mêmes conditions de concentrations que l'anticorps radiomarqué, avec de la BSA couplée au chélate TE1PA et radiomarqué au cuivre-64, le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-BSA.

Après 1h, 24h et 48 heures d'incubation à 37°C, les cellules ont été récupérées et un comptage cellulaire de chaque puits a été effectué sur une cellule de Malassez en diluant 50 μ L de la suspension cellulaire au demi dans de l'éosine à 0,15%. Les cellules ont ensuite été lavées à deux reprises et isolées du surnageant par des cycles de centrifugation à 1500 rpm de 5 minutes.

La radioactivité présente dans les culots cellulaires et les surnageants a été comptée à l'aide d'un compteur gamma automatique Hidex AMG (HIDEXn Finland) avec une fenêtre de comptage

centrée sur 511 keV. Pour évaluer l'efficacité de comptage de l'appareil, des tubes étalons dont l'activité a été mesurée au préalable à l'aide d'un activimètre et transformée en DPM (désintégration par minute), ont été mesurés dans les mêmes conditions à l'aide du compteur gamma. L'efficacité a été évaluée par le calcul suivant : $Efficacit\acute{e}\ de\ comptage = \frac{CPM\ compteur}{DPM} \%$

L'efficacité de comptage de l'appareil nous a permis d'exprimer l'absorption cellulaire en pourcentage d'activité déposée par millions de cellules. L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide d'un test t non apparié au niveau de signification de 5 %.

9. Biodistribution *ex vivo* dans le modèle de myélome multiple

L'étude de la biodistribution *ex vivo* du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ a été réalisée sur des souris saines (n=21) et des souris porteuses de tumeurs MOPC315.BM greffées en sous-cutanées (n=21) d'une taille moyenne de $306 \pm 95,8\ \text{mm}^3$ (13 jours après la greffe). Ces souris ont reçu une injection dans la veine latérale caudale de 25 μg de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ pour une activité de $8,48 \pm 0,61\ \text{MBq}$. Les souris saines ont quant à elles reçu 25 μg de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ pour une activité de $8,5 \pm 0,75\ \text{MBq}$. Les souris ont ensuite été sacrifiées à 5min, 30min, 3h, 24h, 48h (n= 4 souris par groupe) et 72h post-injection (p.i) (n= 5 souris). Le sang, la tumeur et différents tissus et organes d'intérêts ont été prélevés, pesés sur une balance de précision (Adventurer™ Precision, OHAUS) et la radioactivité présente dans chaque tissu/organe a été comptée à l'aide d'un compteur gamma automatique (HIDEX). L'efficacité du compteur a été évaluée en utilisant des références standard (n=10). Les résultats ont été corrigés de la décroissance au moment de l'injection et exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu.

10. Imagerie par tomographie par émission de positons (TEP)

Pour réaliser l'imagerie séquentielle TEP de la biodistribution du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, nous avons utilisé 5 souris portant des tumeurs s.c MOPC315 .BM qui ont été imagées à 5 min puis à 3, 24, 48 et 72 h p.i. Après l'imagerie au temps 72h p.i, les souris ont été sacrifiées pour réaliser une biodistribution *ex vivo* dont les résultats ont été intégrés à l'étude décrite ci-dessus. Dans les mêmes conditions, l'imagerie TEP de l'isotype $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-IgG2A}$ a aussi été réalisée.

Dans le modèle de CSTN 4T1, l'imagerie au cours du temps du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ (n=3 souris) et de l'isotype $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-IgG2A}$ (n=3 souris) a été réalisée aux mêmes temps post-injection (5min, 3h, 24h, 48h et 72h) que pour le modèle MOPC315.BM.

L'acquisition des images a été réalisée avec l'imageur IRIS TEP-TDM (Iris, Inviscan, France) selon un mode d'acquisition corps entier statique de 10 minutes, combiné à une acquisition TDM de 20 secondes. Les souris sont maintenues sous anesthésie générale avec un mélange d'isoflurane à 2% et d'oxygène 5% pendant toute la durée de l'acquisition. Les images TEP ont été reconstruites avec

l'algorithme 3D Ordered Subsets Expectation Maximization (3D-OSEM). Une normalisation ainsi que des corrections pour le temps mort, la diffusion, la décroissance et l'atténuation ont été appliquées à toutes les données TEP. Les images TEP et TDM ont été converties au format DICOM et analysées avec le logiciel OsiriX Medical Imaging.

11. Dosimétrie dans le modèle MOPC315.BM de myélome multiple

À partir des résultats de la biodistributions ex vivo du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ chez des souris porteuses de tumeurs MOPC315.BM sous-cutanées, une étude dosimétrique a été réalisée. Les doses moyennes absorbées par la tumeur et les principaux tissus/organes ont été calculées selon le formalisme du MIRD (Jan et al. 2004). Les courbes activité-temps pour chaque organe/tissu ont été déduites des biodistributions ex vivo et ajustées avec une fonction exponentielle unique ou une somme de deux exponentielles en utilisant le logiciel GraphPad PRISM 7 (GraphPad Software Inc). Les activités cumulées dans chaque organe/tissu ont été calculées en intégrant ces fonctions mono- ou bi-exponentielles entre 0 et l'infini. Les facteurs S pour les différents tissus d'intérêt ont été calculés avec le code Monte Carlo GATE (v 9.0) (Jan et al. 2004) en utilisant un fantôme de souris réaliste Moby de 20 g (Segars et al. 2004). Pour les tumeurs, les glandes salivaires et les ganglions, les facteurs S correspondant à la dose auto-absorbée ont été calculés avec le logiciel IDAC-Dose 2.1 (Andersson et al. 2017) en supposant que ces tissus ont une forme sphérique.

12. Radiothérapie interne vectorisée au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle de myélome multiple

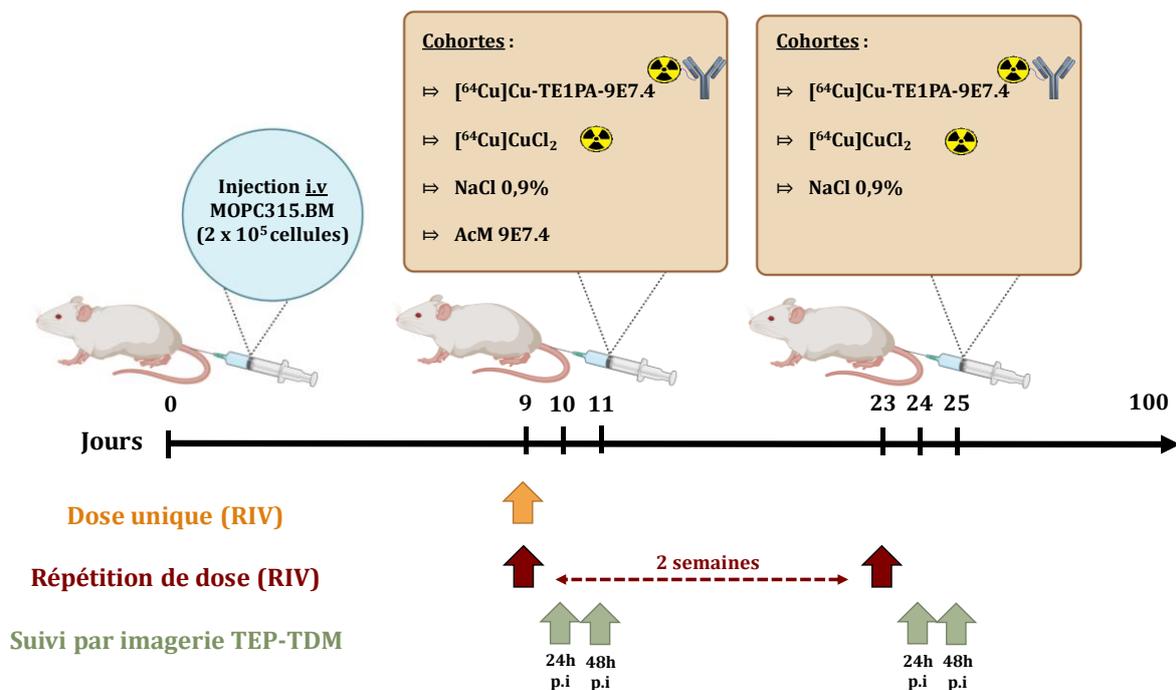


Figure 19. Schéma représentatif du protocole de RIV dans le modèle orthotopique de myélome multiple murin MOPC315.BM

Concernant l'étude du potentiel thérapeutique de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, dans un premier temps, une escalade de dose a été réalisée dans le modèle murin orthotopique pour déterminer la dose la plus efficace. Neuf jours après la greffe tumorale, à un temps intermédiaire entre l'implantation des cellules tumorales et le développement de la maladie, les souris ont été randomisées en groupes expérimentaux. Chaque groupe expérimental a reçu une injection unique dans la veine latérale caudale d'une des activités suivantes : 22 MBq (n=10), 35 MBq (n=10), 55 MBq (n=5) ou 65 MBq (n=7) de 100 μg de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$.

Après avoir déterminé les doses les plus efficaces sans induire de toxicité, nous avons cherché à voir si une répétition de dose pouvait être plus efficace qu'une injection unique. Dans ce même modèle orthotopique, nous avons donc réalisé une répétition de deux doses thérapeutiques identiques injectées à 2 semaines d'intervalle. Les doses de 35 (n=6) et 55 MBq (n=6) de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ont été choisies.

Les groupes témoins de ces deux expérimentations ont reçu une injection i.v. soit de solution saline (n=22), soit de 100 μg d'AcM 9E7.4 (n=10) afin de voir si l'AcM anti-CD138 a une efficacité thérapeutique, ou de 35 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ (n=5) afin d'étudier les effets thérapeutiques du cuivre-64 lorsqu'il est transporté par les macromolécules sanguines, et ainsi de confirmer ou non l'intérêt de vectoriser le cuivre-64.

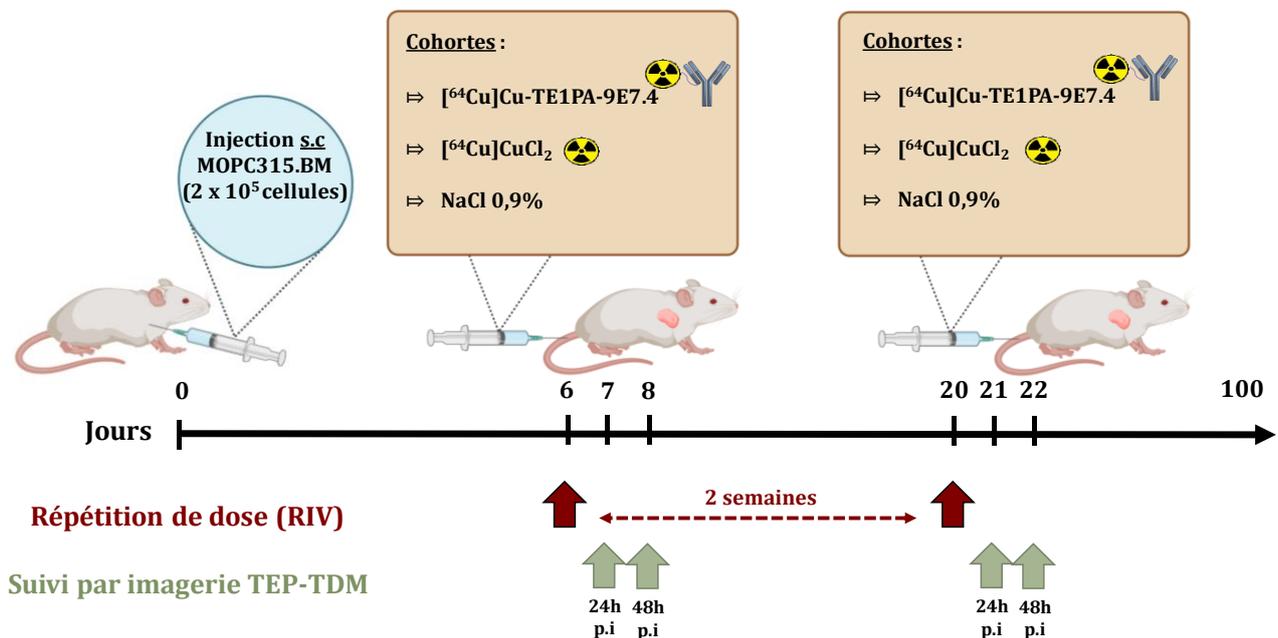


Figure 20. Schéma représentatif du protocole de RIV dans le modèle s.c ectopique de myélome multiple murin MOPC315.BM

L'efficacité thérapeutique de la répétition de doses a ensuite été évaluée dans le modèle sous-cutané de MOPC315.BM. Six jours après la greffe tumorale, quand les tumeurs sont palpables, une répétition de deux doses de solution saline (n=15), de 35 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ (n=3) ou de 35 MBq de 100 μg de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ (n=9) à 2 semaines d'intervalle a été effectuée.

Compte tenu des activités nécessaires pour ces deux expérimentations, les études thérapeutiques ont été réalisées en plusieurs fois. Cela explique notamment les différences d'effectif dans les cohortes, avec les contrôles (souris injectées avec du NaCl 0,9%) qui ont dû être reproduits pour chaque expérimentation. Les effectifs ont aussi dû être adaptés aux activités injectées qui devaient tenir compte de l'activité maximale dont nous disposions le jour de la thérapie.

13. Radiothérapie interne vectorisée au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle de cancer du sein triple négatif (CSTN)

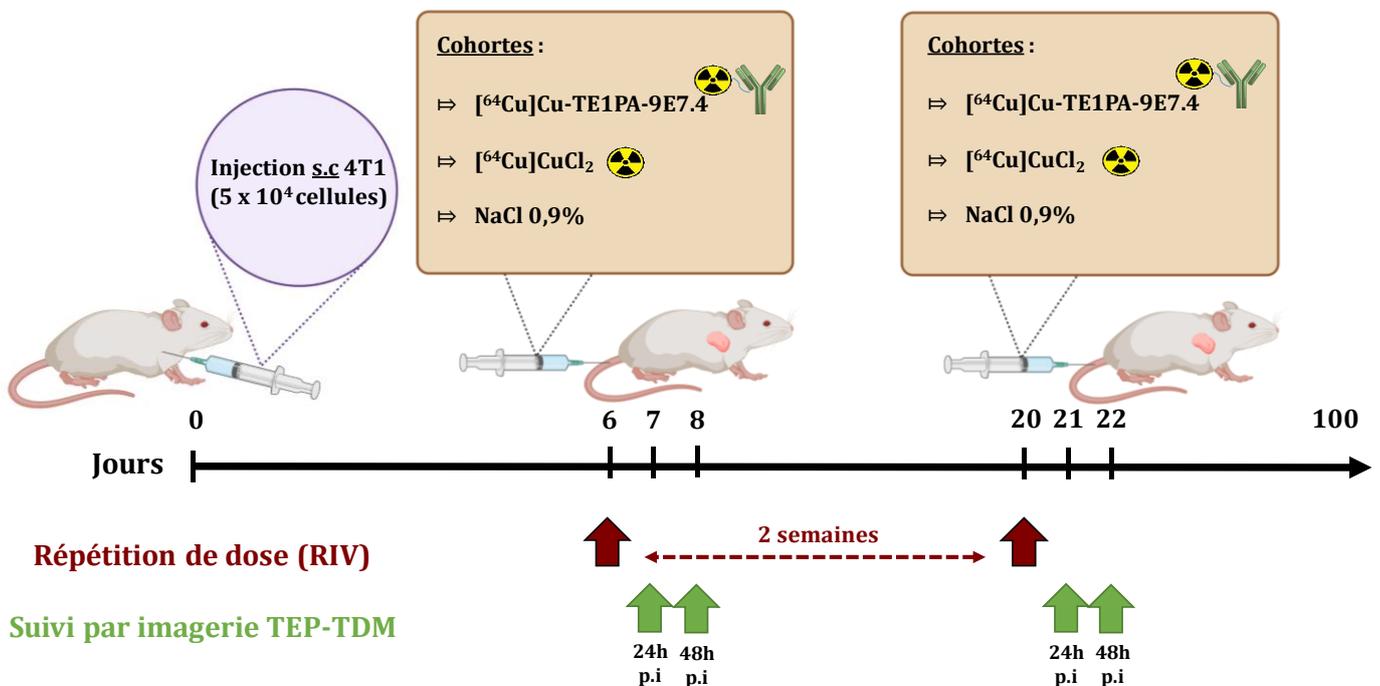


Figure 21. Schéma représentatif du protocole de RIV dans le modèle de tumeur solide du sein triple négatif 4T1

Dans ce protocole expérimental de RIV, l'objectif était d'évaluer le potentiel thérapeutique du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans un modèle de tumeur solide. Nous avons donc choisi de traiter les souris selon le protocole thérapeutique le plus efficace observé pour notre modèle de MM (orthotopique et ectopique) à savoir, le schéma thérapeutique qui consiste à traiter les souris 6 jours après les greffes de cellules tumorales en sous-cutané par deux injections de 35 MBq de

[⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 espacées de 2 semaines. Les groupes témoins ont reçu une injection i.v. soit de solution saline (n=10), soit de 35 MBq de [⁶⁴Cu]CuCl₂ (n=10).

Après traitement, le suivi des animaux a été identique à celui décrit ci-dessous. Nous avons en plus, dans ce modèle, pu réaliser un suivi par imagerie TEP-TDM 24h et 48h après l'injection, pour les souris ayant reçu une dose thérapeutique de [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 ou de [⁶⁴Cu]CuCl₂. L'acquisition des images a été faite dans les mêmes conditions que celles décrites plus tôt dans le document.

14. Suivi des animaux et contrôle de la toxicité

Pour l'ensemble des expérimentations de radiothérapie interne vectorisée, un suivi quotidien des souris a été assuré pendant la première semaine suivant l'administration du traitement, puis tous les deux jours les semaines suivantes. Ce suivi impliquait une vérification de l'état général des souris qui comprenait : la pesée des animaux, l'observation des réflexes et du tonus musculaire des pattes arrière (pour les souris du modèle orthotopique de MM), l'observation de l'aspect des tumeurs sous-cutanées et leur mesure au pied à coulisse, et plus généralement des signes visibles de mal-être, de douleur, d'apparition de grosseurs tumorales à d'autres emplacements du corps.

Les souris ont été sacrifiées dès l'apparition des premiers signes de paralysie des membres inférieurs (pour les modèles de MM), ou si une perte d'au moins 20 % de leur masse corporelle avant traitement était constatée. De plus, dans les modèles de tumeur sous-cutanée, la croissance tumorale a été contrôlée 3 fois par semaine par la mesure des tumeurs à l'aide d'un pied à coulisse. Le volume tumoral assimilé à un ellipsoïde a été calculé à l'aide de la formule suivante ([Tomayko et Reynolds 1989](#)) :

$$V = \frac{(L * W * h) * 3,14}{6}$$

Avec : L, la plus longue mesure, W, la largeur et h, la hauteur.

Les souris porteuses de tumeurs sous-cutanées ont été sacrifiées lorsque le volume de la tumeur était supérieur à 2000 mm³ ou à l'apparition d'une nécrose dans les tumeurs.

La toxicité hématologique potentiellement induite par le traitement a été contrôlée de façon hebdomadaire après la greffe tumorale, avec la numération des globules blancs, des plaquettes et des érythrocytes à l'aide d'un analyseur hématologique automatisé et quantitatif avec 25 µL de sang par test (Celltac-α mek-6500k, Nikon Kohden). Les échantillons de sang ont été collectés au niveau du sinus rétro-orbital de la souris sous anesthésie générale gazeuse à l'isoflurane à 2,5%

et d'oxygène 5% et recueillis dans des tubes contenant de l'EDTA (Laboratoires Melet Schlloesing, OSNY, France).

Durant les expérimentations thérapeutiques sur le modèle de MM, les reliquats de sang prélevés pour évaluer la toxicité hématologique ont été centrifugés à 2500 rpm pendant 10 minutes afin d'en récupérer le plasma qui a été conservé à -20°C jusqu'à leur analyse pour évaluer la toxicité hépatique et rénale. Pour les expérimentations thérapeutiques réalisées sur le modèle de CSNT 4T1, nous étions alors équipés de l'appareil d'analyse et celles-ci ont pu être réalisées avec 100 µL de sang frais juste après le prélèvement.

Le plasma ou le sang a été utilisé pour évaluer la toxicité hépatique et rénale en mesurant les paramètres biochimiques suivants : l'aspartate aminotransférase (AST) et l'alanine aminotransférase (ALT) pour contrôler l'état du foie, et l'azote uréique sanguin (BUN) et la créatinine pour les reins. Tout d'abord, les plasmas ont été décongelés sur glace, puis dilués ou non selon leur volume initial avec du NaCl 0,9% pour obtenir un volume final de 100 µL nécessaire à l'analyse. Des dilutions jusqu'au ¼ au maximum, ont été réalisées afin de ne pas atteindre la limite de détection de l'appareil. Le plasma de chacune des souris est ensuite placé dans un rotor (General Health Rotor, Scil) contenant les réactifs nécessaires aux différents tests. Le rotor est placé dans l'analyseur biochimique (Element RC, Scil animal care compagny) permettant la mesure des paramètres à l'aide de tests photométriques. Pour l'ensemble de l'étude, un panel fixe de souris BALB/cJrJ saines a été utilisé pour calculer les valeurs référence des paramètres étudiés. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de comparaison multiple de Sidak.

Lors du sacrifice, plusieurs organes d'intérêts (os des pattes arrière, poumons, tumeurs, foie et rate) ont été conservés dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 48 h avant d'être transférés dans de l'éthanol 70% pour l'étude histologique.

15. Histologie

Chez les souris impliquées dans les expérimentations de RIV, les organes (tumeurs, os, foie et rein) prélevés au moment du sacrifice ont été fixés dans du paraformaldéhyde 4% pendant 48 heures avant d'être transférés en éthanol 70% afin de conserver les antigènes présents à la surface des tissus. La préparation, la coupe et le marquage histologique par coloration HPS de l'ensemble des organes ont été réalisés par la Plateforme MicroPicell (SFR François Bonamy, IRS-UN, Université de Nantes).

II. Évaluation d'une RIV utilisant le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans un modèle murin myélome multiple

1. Évaluation par cytométrie en flux de l'expression par la lignée MOPC315.BM de la cible CD138 en comparaison à la lignée 5T33

Pour le ciblage du CD138, nous avons utilisé l'anticorps murin anti-CD138, le 9E7.4, dont la spécificité de ciblage pour le CD138 murin avait été établie notamment pour la lignée murine de MM 5T33 (Chérel et al. 2013; Fichou et al. 2015; Bailly et al. 2018).

Afin de choisir la lignée tumorale, nous avons comparé par cytométrie en flux, l'expression du CD138 in vitro par la lignée cellulaire 5T33 et la lignée MOPC315.BM (**Figure 22**). Pour évaluer l'expression de la cible en cytométrie, les cellules ont été mises en présence d'une concentration saturante de l'anticorps 9E7.4, puis d'anticorps secondaire anti IgG de rat ou d'un isotype IgG2a,κ, chacun couplé à la FITC. Les résultats ont montré que les deux lignées cellulaires exprimaient fortement le CD138 (**Figure 22.A**), mais avec des profils d'expression différents. On retrouve une expression du CD138 pour 95,9% des cellules de la lignée MOPC315.BM, contre 86,3% pour les cellules de la lignée 5T33. L'intensité de l'expression du CD138 est aussi plus importante pour les cellules MOPC315.BM, comme nous l'indique le décalage de l'histogramme représentant la fixation de l'anticorps 9E7.4 vers des valeurs d'intensité de fluorescence plus hautes que pour les cellules 5T33 (**Figure 22.B**). Enfin, pour la lignée cellulaire MOPC315.BM, l'expression du CD138 est plus homogène. La spécificité de la liaison se confirme avec l'absence de liaison non spécifique de l'isotype de contrôle et de l'anticorps secondaire seul (**Figure 22.B**).

Compte tenu de ces résultats, nous avons pris la décision de poursuivre notre étude uniquement avec le modèle cellulaire MOPC315.BM.

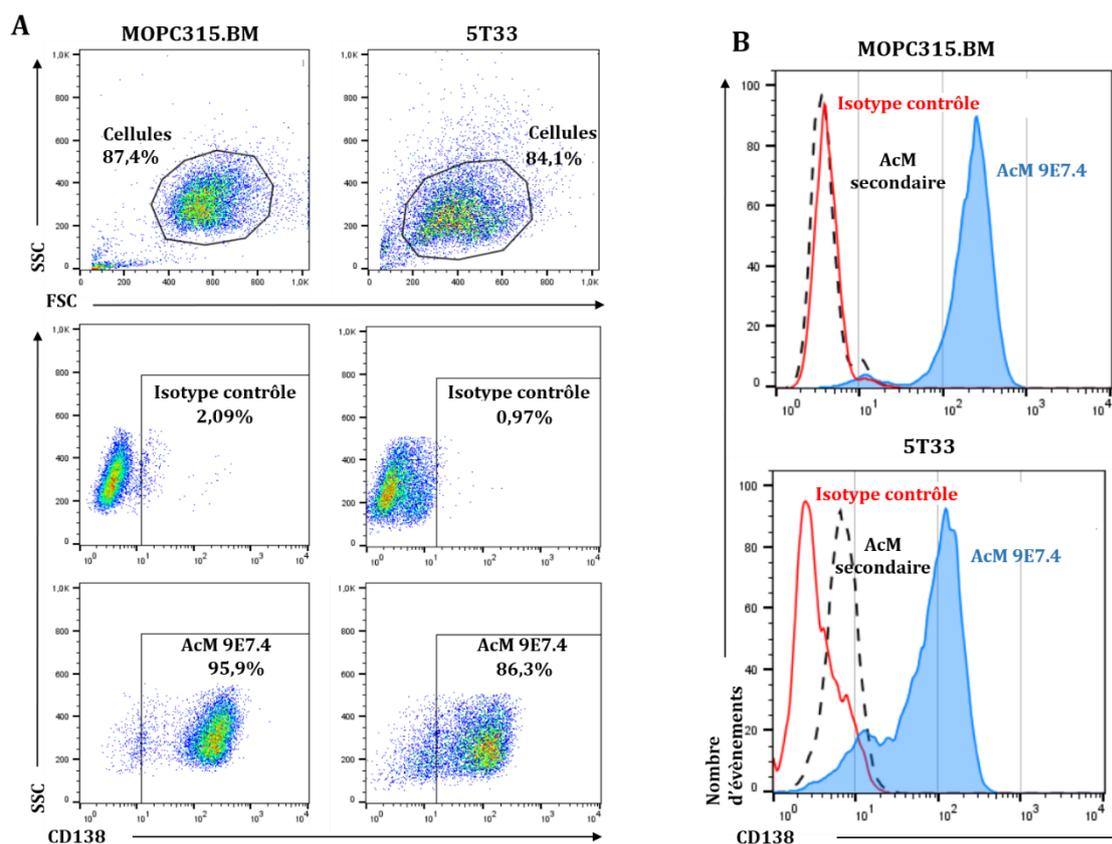


Figure 22. Caractérisation par cytométrie en flux de l'expression membranaire du CD138 par les lignées cellulaires 5T33 et MOPC315.BM in vitro

(A) Stratégie d'analyse des cellules par cytométrie en flux, les cellules ont été sélectionnées en fonction de leur taille (paramètre FSC) et de leur granulation (paramètre SSC) afin d'exclure les débris et les cellules mortes. Le marquage des cellules a été réalisé avec l'anticorps anti-CD138 9E7.4 et l'isotype IgG2a à une concentration saturante de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (B) Histogrammes représentatifs de l'intensité de fluorescence de la PE de l'isotype contrôle (courbe rouge) ou de l'anticorps 9E7.4 (en bleu) et de l'anticorps secondaire (courbe pointillée noire). L'acquisition a été réalisée sur un système de cytométrie en flux BD FACS Calibur™ et analysée à l'aide du logiciel FlowJo™ (version 10.6.1, BD Sciences).

2. Caractérisation de l'affinité de l'anticorps 9E7.4 pour la lignée cellulaire MOPC315.BM

L'affinité de l'anticorps 9E7.4 pour la cible CD138 sur la lignée cellulaire MOPC315.BM a été déterminée à l'aide des résultats de cytométrie en flux évaluant la fixation de l'anticorps sur les cellules selon avec des concentrations croissantes de l'anticorps. Les médianes de fluorescence reflétant la fixation de l'anticorps en fonction de la concentration déposée ont permis de reconstruire une courbe de saturation ajustée selon une équation de liaison spécifique à l'aide d'une régression non linéaire sur GraphPad Prism (version 8.0.0 for Windows, GraphPad

Software, San Diego, California USA) (**Figure 23**). Cette analyse a évalué l'affinité de l'anticorps pour sa cible sur cette lignée, avec une valeur de constante de dissociation (Kd) à 0,626 nM.

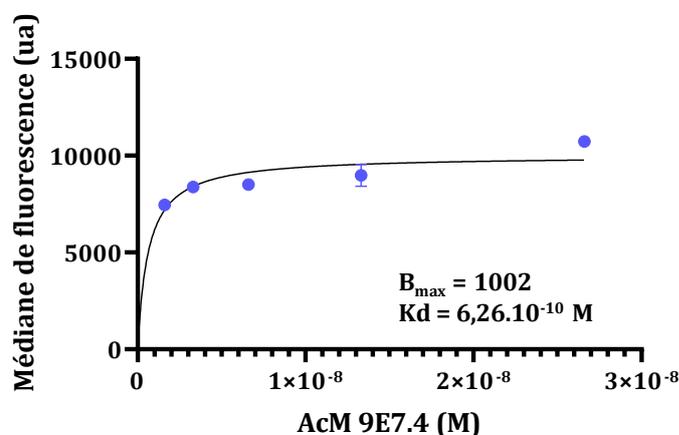


Figure 23. Caractérisation par cytométrie en flux de l'affinité de l'anticorps 9E7.4 pour la lignée cellulaire MOPC315.BM

Courbe représentant les médianes de fluorescence issues des résultats de cytométrie reflétant la fixation de l'anticorps 9E7.4 à la surface des cellules MOPC315.BM. L'expérimentation a été réalisée avec une gamme croissante de 5 concentrations d'anticorps déposées sur les cellules de 4 µg/mL à 0,25 µg/mL (dilution au ½). L'analyse de l'affinité de l'anticorps a été effectuée sur le logiciel GraphPad Prism (version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA) avec une courbe de régression non linéaire (« One site - Specific binding »). Les barres d'erreurs représentent l'écart type des médianes de fluorescence.

3. Radiomarquage et immunoréactivité

Pour l'ensemble des expériences réalisées au cours de cette thèse, la pureté du radioimmunoconjugué, le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, était supérieure à 98% et le rendement de radiomarquage était compris entre 90 et 100%. Après radiomarquage, un contrôle de l'intégrité de l'anticorps 9E7.4 a été réalisé en estimant sa fraction immunoréactive à l'aide de billes magnétiques recouvertes de l'antigène CD138. Ce contrôle a été réalisé après chaque radiomarquage et a permis de confirmer qu'après radiomarquage, plus de 75% du radioimmunoconugué produit était capable de se fixer spécifiquement sur l'antigène CD138.

4. Captation cellulaire du vecteur $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ par les MOPC315.BM

Afin de s'assurer que le radiomarquage n'affectait pas la reconnaissance par l'anticorps 9E7.4 de l'antigène CD138 présent à la surface des cellules MOPC315.BM, nous avons réalisé une étude in vitro de captation cellulaire du radioimmunoconjugué.

Des concentrations croissantes de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ont été déposées sur les cellules MOPC315.BM avant que celles-ci ne soient incubées à 37°C pendant 1, 24 ou 48 heures (**Figure 24.A**). Les fractions du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ retrouvées fixées aux cellules ont démontré une

liaison rapide de [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dès 1 heure d'incubation pour toutes les conditions de concentration. Dans l'ensemble des conditions de l'expérience, on observe une augmentation significative, par rapport au temps 1 heure d'incubation, de la fraction du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 fixée sur les cellules après 24 heures d'incubation. La fixation observée à ce temps d'incubation est maximale. Après 48 heures d'incubation, une diminution de la fixation par rapport au temps 24 heures est observée, mais celle-ci reste significativement supérieure aux fixations observées après 1 heure d'incubation. Par exemple, avec 1,8 pmol déposée par puits, on observe après 1 heure d'incubation, une fixation de $1,47 \pm 0,19$ % AD/million de cellules, alors que dans la même condition elle est de $4,07 \pm 0,18$ % AD/million de cellules à 48 heures d'incubation ($p = 0,0017$).

En parallèle, la spécificité de la liaison du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 a été vérifiée en ajoutant un excès d'AcM 9E7.4 non radioactif (**Figure 24.B**). Nous avons aussi réalisé un contrôle négatif en vérifiant la fixation du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-BSA, composé d'un vecteur non spécifique pour les cellules MOPC315.BM, la BSA (**Figure 24.C**). L'excès d'anticorps non radioactif a entraîné un déplacement important (>75% à 24 h d'incubation) de la captation de l'anticorps radiomarqué par les cellules qui confirme la spécificité de la fixation sur les cellules du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4. Par exemple avec 0,5 pmol/puits à 24 heures d'incubation, nous passons d'une fixation de $7,45 \pm 0,51$ % AD/million de cellules du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 à $1,72 \pm 0,14$ % AD/million de cellules, seulement, en ajoutant un excès de 9E7.4 non radiomarqué. Pour le contrôle négatif avec le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-BSA, aucune condition n'a excédé la fixation des $0,65 \pm 0,09$ %AD/million de cellules obtenu avec la concentration de 0,5 pmol/puits à 24 heures d'incubation.

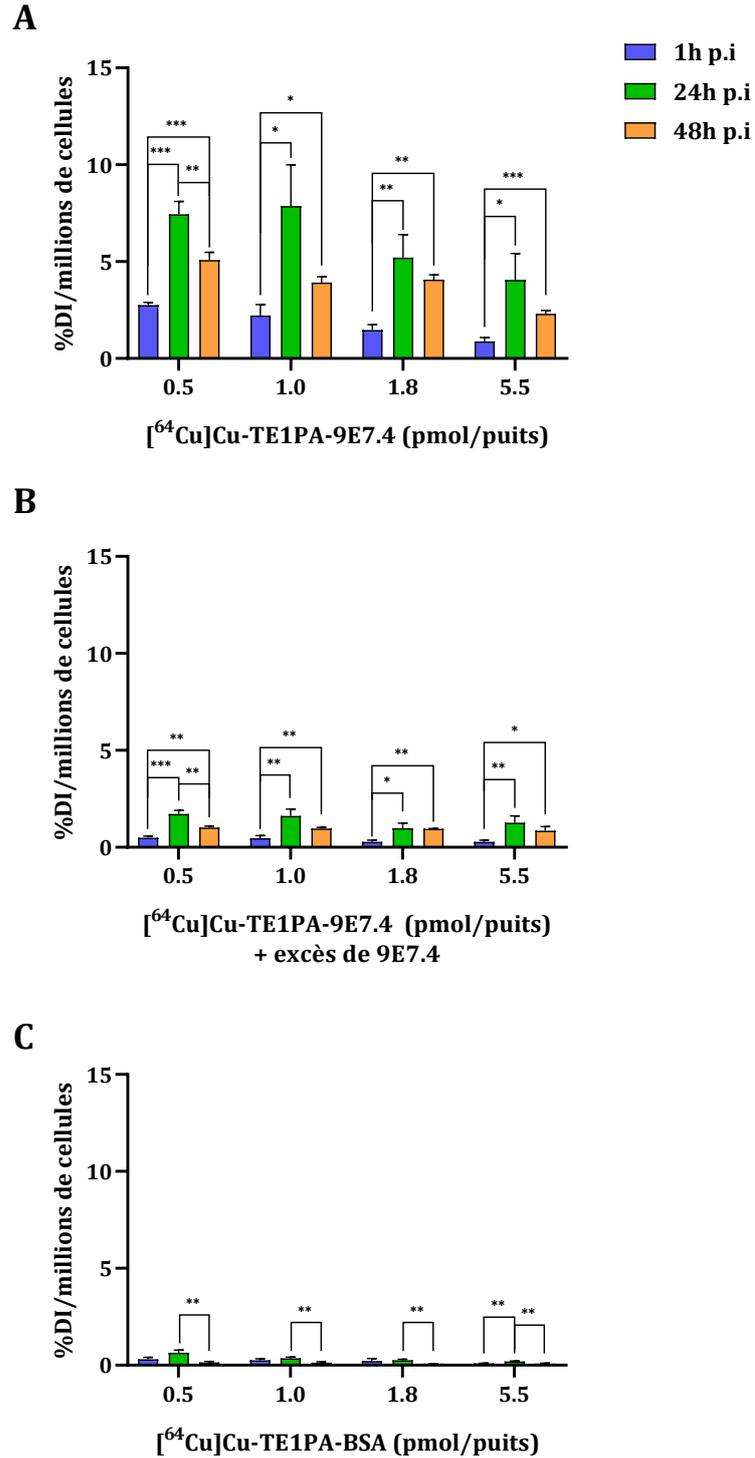


Figure 24. Liaison spécifique in vitro du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 sur les cellules MOPC315.BM

L'expérience a été réalisée à 37°C avec 4 concentrations de (A) [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, (B) [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 + un excès de 9E7.4, (C) [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-BSA à 3 temps différents de post-incubation. Les résultats sont exprimés en % d'activité injectée par millions de cellules (n=3 ; test t multiple, (*)p<0.02 ; (***)p<0.0007).

5. Biodistributions ex vivo du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans un modèle de tumeurs MOPC315.BM sous-cutanées

La biodistribution ex vivo du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 a été étudiée à différents temps post-injection, chez des souris saines (**Figure 25.A**) et chez des souris portant des tumeurs s.c MOPC315.BM (**Figure 25.B**) afin d'évaluer un éventuel impact de la tumeur sur le profil de distribution du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 (**Annexes 3 et 4**).

Dans les deux modèles, le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 présente une clairance sanguine rapide, avec un %DI/g maximum dans le sang 5 minutes après l'injection qui diminue ensuite rapidement. Chez les souris saines, la distribution sanguine est maximale aux premières minutes post-injection, avec un pourcentage de dose injectée par gramme de tissu estimé à $26,64 \pm 7,84$ %DI/g à 5 min p.i. le radioimmunoconjugué quitte progressivement le sang, entraînant une baisse du %DI/g à 2 h p.i. ($14,62 \pm 8,2$ %DI/g). Pour les souris portant une tumeur MOPC315.BM cette baisse est significativement plus importante en passant de $27,75 \pm 2,91$ %DI/g à $10,93 \pm 0,43$ %DI/g entre 5 min et 2 h post-injection ($p < 0,000001$). Ce même type de profil cinétique est observé dans les organes vascularisés comme le cœur, les poumons, le foie et les reins. Le profil de fixation dans la rate, l'intestin et l'estomac est différent : on observe une augmentation relative de la fixation du radioimmunoconjugué au cours du temps dans ces organes pour les souris non greffées, jusqu'à 24 h p.i. avant que celle-ci ne diminue. Par exemple, dans la rate, on passe de $6,91 \pm 1,72$ %DI/g à 5min p.i. à $13,67 \pm 2,77$ %DI/g à 24 h p.i. Entre les deux modèles on observe aux temps tardifs après l'injection du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 des différences significatives de fixation dans le foie, le sang, la rate et l'intestin pour lesquels la fixation est plus importante chez les souris saines, et ce dès le temps 24 h p.i. et jusqu'à 72 h p.i. Par exemple, 24 h après l'injection du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 on retrouve dans le foie $21,82 \pm 5,31$ %DI/g chez les souris saines et $10,4 \pm 2,09$ %DI/g chez les souris portant des tumeurs ($p < 0,000001$).

Chez les souris saines, c'est au niveau du foie que l'on retrouve la fixation la plus importante du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, et ce dès 5 min p.i. avec $35,79 \pm 8,44$ %DI/g, et, jusqu'à 72 h p.i. avec $15,68 \pm 1,39$ %DI/g.

Chez les souris greffées, on retrouve $9,2 \pm 0,66$ % DI/g de tumeur à 5 min après l'injection. Cette fixation augmente rapidement pour atteindre $45,64 \pm 5,14$ % DI/g 2 h après l'injection et reste importante jusqu'à 72 h p.i., avec $33,17 \pm 12,53$ % DI/g. La captation tumorale observée à 24 h après l'injection est presque 12 fois plus importante que dans le sang. Le signal résiduel, assimilable à la fixation retrouvée au niveau des muscles, est très faible, de l'ordre de $0,71 \pm 0,33$ % DI/g à 24 h après l'injection, soit 65 fois moins que le signal dans la tumeur au même temps. Bien que la fixation hépatique soit importante, 24 h après l'injection on retrouve 3 fois plus de radioimmunoconjugué au niveau de la tumeur qu'au niveau du foie. À 48 h post-injection, la

fixation tumorale est de $62,49 \pm 17,15$ % DI/g et présente un rapport tumeur/foie très favorable ($6,7 \pm 1,46$) (**Tableau 5**).

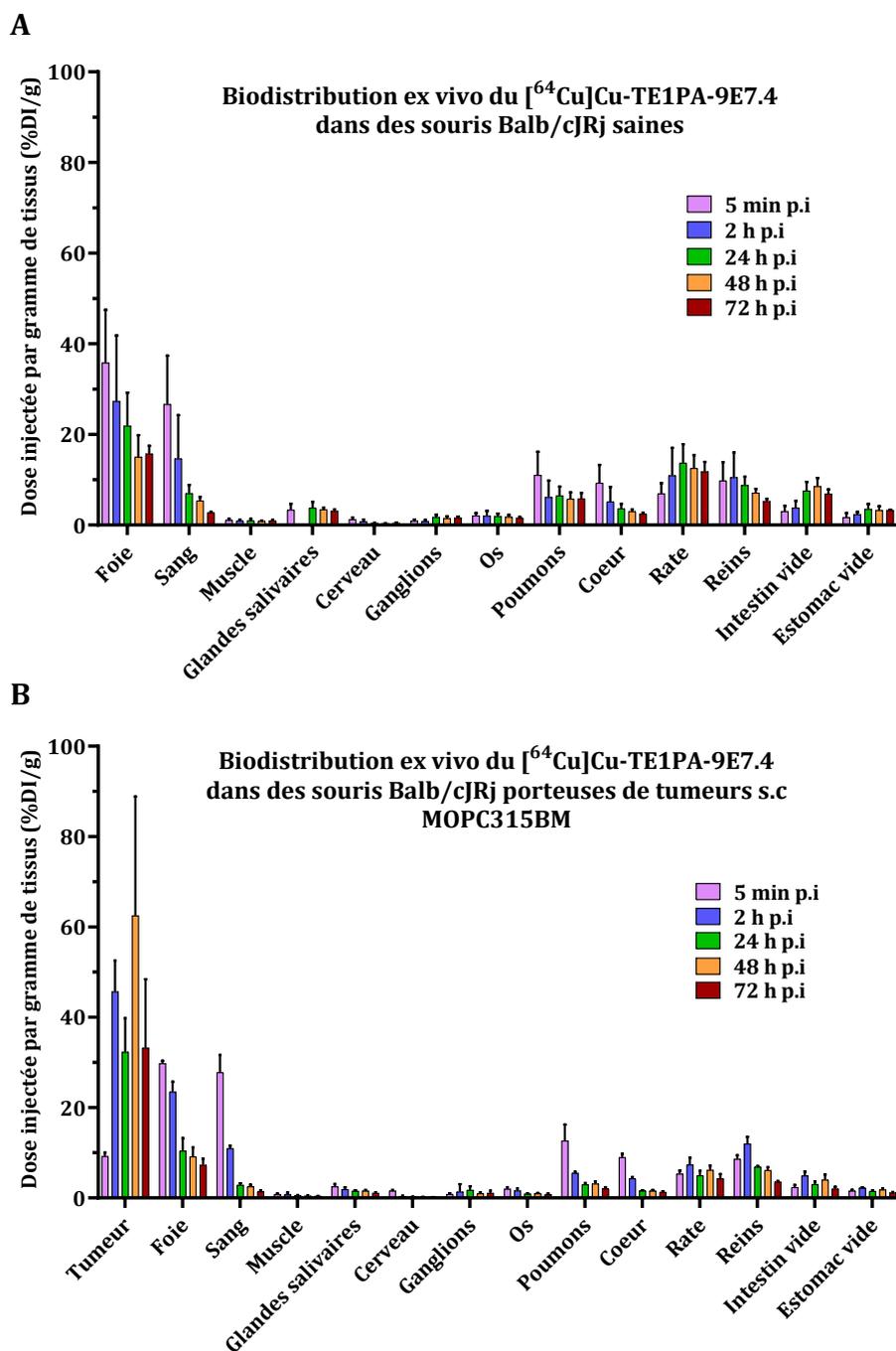


Figure 25. Biodistribution ex vivo du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle MOPC315.BM

(A) Chez des souris sans tumeurs et (B) chez des souris greffées avec des tumeurs MOPC315.BM s.c. ($n = 4$ pour chaque groupe). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu, à 5 min, 2, 24, 48 et 72 h après l'injection de $8,48 \pm 0,61$ MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ et présentées en moyenne \pm écart-type. L'ensemble des valeurs et des données statistiques sont présentées dans les **Annexes 4** et **5**.

Tableau 5. Ratios de fixation du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ sélective au niveau de la tumeur

	Ratio tumeur/sang		Ratio tumeur/foie		Ratio tumeur/muscle	
	24 h p.i	48 h p.i	24 h p.i	48 h p.i	24h p.i	48 h p.i
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$	11,55 ± 2,04	24,21 ± 5,45	3,14 ± 0,13	6,7 ± 1,46	65,47 ± 22,09	145,44 ± 44,58

Les ratios moyens de la fixation du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ au niveau de la tumeur par rapport au sang, au foie, ou au muscle ont été calculés à partir des données de la biodistribution présentée dans la Figure 25.B (n = 4 souris/temps p.i)

6. Imagerie TEP-TDM du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ et $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-IgG2a,\kappa}$ dans le modèle s.c MOPC315.BM

Le suivi longitudinal de la biodistribution in vivo du radioimmunoconjugué $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ par imagerie TEP-TDM a été réalisé à différents temps post-injection, chez des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées (11 jours après la greffe s.c des cellules tumorales MOPC315.BM) (**Figure 26.A**). Afin de contrôler la spécificité in vivo de notre radioimmunoconjugué, nous avons en parallèle réalisé l'imagerie de l'isotype contrôle de l'anticorps 9E7.4, fonctionnalisé et radiomarqué selon un protocole identique (**Figure 26.B**).

5 minutes après l'injection, le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ est retrouvé essentiellement au niveau vasculaire, que ce soit au niveau des aortes ou des organes richement vascularisés, tel que le cœur, le foie, la rate et les reins et les poumons. En parallèle, on observe aussi 5 min après l'injection, un hypersignal au niveau de la tumeur. 24 heures après l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, le signal présent dans le compartiment vasculaire diminue drastiquement, excepté dans le foie, où la fixation reste très importante, et visible jusqu'à 72 h p.i.

L'hypersignal visible au niveau de la tumeur 5 minutes après l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, reste très stable jusqu'à 72 h p.i. Cette hyperfixation présente aussi un excellent rapport tumeur/bruit de fond jusqu'à 72 h p.i.

La spécificité de cette hyperfixation est confirmée grâce à l'image TEP-TDM réalisée chez des souris injectées avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-IgG2a,\kappa}$. Contrairement à l'hyperfixation du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ observée au niveau de la tumeur 24 heures après son injection, le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-}$

IgG2a, κ ne montre pas de fixation tumorale spécifique. À 24 h post-injection, la captation hépatique est intense et équivalente pour les deux radioimmunoconjugués.

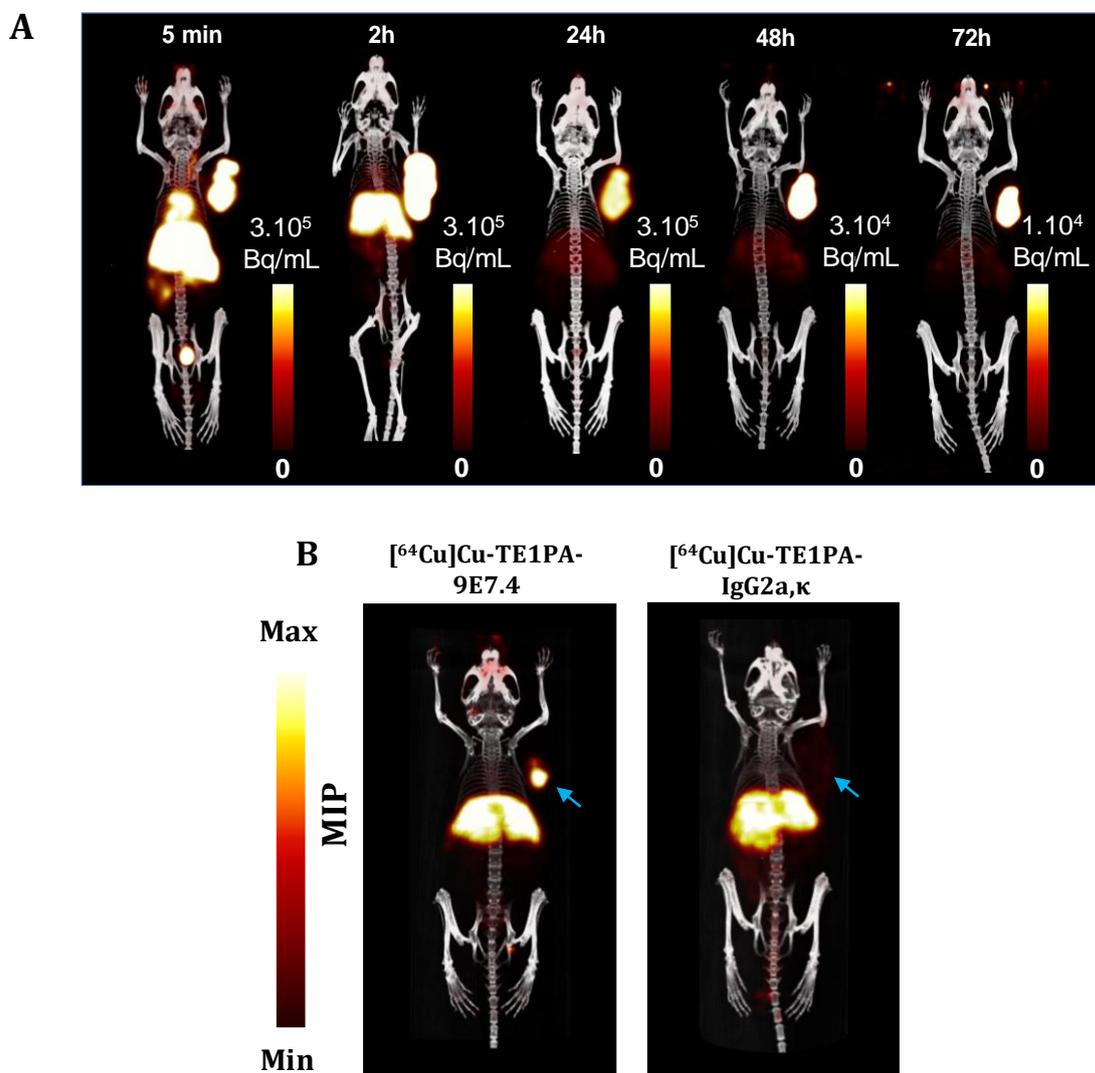


Figure 26. Suivi longitudinal par imagerie TEP-TDM de la biodistribution in vivo du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ et comparaison avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-IgG2a,\kappa}$ chez des souris porteuses d'une tumeur s.c MOPC315.BM

Le suivi par imagerie TEP-TDM a été réalisé 11 jours après la greffe s.c des cellules tumorales MOPC315.BM, les souris ont été imagées 5 minutes, 2, 24, 48 et 72 h après l'injection du (A) $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ (10,01 MBq ; 25 μg de 9E7.4). (B) Imagerie TEP du temps 24 h p.i du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ou du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-IgG2a,\kappa}$ (7,1 MBq ; 25 μg d'isotype IgG2a, κ). Les images TEP-TDM sont présentées en MIP (« maximum intensity projection »). Les flèches bleues indiquent l'emplacement de la tumeur MOPC315.BM.

7. Dosimétrie

Les calculs dosimétriques pour une injection unique de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ont été réalisés sur la base des données de la biodistribution ex vivo du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ (Figure 25). Les doses moyennes absorbées par MBq injecté ou pour une injection unique de 37 MBq sont

résumées dans le **tableau 6**. Les résultats ont montré que les organes ou tissus qui recevront les doses les plus élevées sont, dans l'ordre décroissant, la tumeur avec $0,58 \pm 0,14$ Gy/MBq, le foie avec $0,20 \pm 0,03$ Gy/MBq, la rate avec $0,14 \pm 0,01$ Gy/MBq et les reins avec $0,12 \pm 0,01$ Gy/MBq. Dans tous les autres organes sains, la dose moyenne absorbée est égale ou inférieure à $0,05$ Gy/MBq. Bien que la dose moyenne absorbée par le foie semble importante, le rapport tumeur/foie des doses absorbées est de 2,9, ce qui semble favorable à l'utilisation du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ pour des applications thérapeutiques.

Tableau 6. Estimation des doses absorbées du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans les tissus/organes des souris porteuses d'une tumeur s.c MOPC315.BM

Organe/tissu	Dose moyenne absorbée (Gy/MBq) \pm SD	Dose moyenne absorbée (Gy) \pm SD pour une activité de 37 MBq
Tumeur	0.58 ± 0.14	21.35 ± 5.05
Foie	0.20 ± 0.03	7.37 ± 0.95
Rate	0.14 ± 0.01	5.17 ± 0.50
Intestins	0.04 ± 0.01	1.47 ± 0.26
Reins	0.12 ± 0.01	4.49 ± 0.41
Ganglions	0.01 ± 0.00	0.53 ± 0.08
Poumons	0.05 ± 0.01	1.67 ± 0.43
Coeur	0.05 ± 0.01	1.94 ± 0.20
Estomac vide	0.03 ± 0.01	1.24 ± 0.13
Glandes salivaires	0.02 ± 0.00	0.85 ± 0.06
Os (fémur)	0.02 ± 0.00	0.83 ± 0.17
Pancréas	0.01 ± 0.00	0.46 ± 0.04
Cerveau	0.01 ± 0.00	0.24 ± 0.03

Les calculs dosimétriques ont estimé, à partir des résultats de la biodistribution ex vivo, les doses absorbées (en Gy) au niveau des tissus/organes par MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ injecté par voie i.v dans la veine caudale de la queue des souris ou pour une activité injectée totale de 37 MBq.

8. Expérimentation de la RIV utilisant le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans un modèle orthotopique de MM

- Évaluation de la survie des souris après traitement

Afin de déterminer le potentiel thérapeutique du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans notre modèle d'étude préclinique, nous avons dans un premier temps réalisé une escalade de dose avec une injection unique de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle orthotopique (**Figure 27.A**).

Pour cela, les souris ont reçu une injection i.v de 2×10^5 cellules de la lignée MOPC315.BM. Au neuvième jour post-greffe, les souris ont reçu soit une injection i.v d'une solution de 100 μ L contenant 100 μ g du [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 (de 21 à 65 MBq), ou de 100 μ g de 9E7.4 seul (non fonctionnalisé et non radiomarqué). Un troisième groupe de souris a reçu 100 μ L de NaCl 0,9%.

Les résultats (**Figures 27.A et B**) montrent que l'injection de l'anticorps 9E7.4 froid ou de 21 MBq de [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 ne permettent pas d'améliorer significativement la médiane de survie (ms) des souris (27,5 jours et 30 jours respectivement) par rapport au groupe contrôle NaCl 0,9% (ms= 27 jours, $p = 0,3251$ et $p = 0,4375$ respectivement). Aussi, tous les animaux de ces deux groupes ont développé des signes de la maladie et ont été sacrifiés dès l'apparition de signes de paralysie des membres inférieurs ou à l'apparition de masses tumorales extramédullaires.

Avec l'injection de 35 MBq de [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, on observe un léger effet positif sur la survie des souris. Ce traitement a permis de prolonger significativement de quelques jours la survie des souris avec une médiane survie de 33,5 jours ($p = 0,011$). Néanmoins, l'activité la plus efficace pour augmenter la médiane de survie des souris significativement est celle de 55 MBq, cette injection a augmenté de 18 jours la médiane de survie par rapport aux souris du groupe contrôle NaCl 0,9% ($p < 0,0001$). Malgré l'amélioration de leur survie, tous les animaux de ce groupe ont fini par développer une paralysie des membres inférieurs et des masses extramédullaires témoignant d'un échappement tumoral. Concernant le groupe injecté avec 65 MBq de [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, l'effet du traitement sur l'amélioration de la médiane de survie a été moins important que pour le groupe traité avec 55 MBq avec une médiane de survie de 33 jours. Toutes les souris de cette cohorte ont été sacrifiées lors de l'apparition des premiers signes de paralysie des membres inférieurs, à l'exception d'une souris qui a été sacrifiée 6 jours après l'injection du radioimmunoconjugué après avoir perdu 20 % de sa masse corporelle initiale. On peut voir sur la **Figure 27.C**, que la médiane de survie après l'injection d'une dose unique de [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 augmente progressivement avec la dose injectée jusqu'au seuil de 55 MBq, avant de diminuer.

Sur la base des résultats obtenus avec l'escalade de dose, un traitement avec répétition de dose a été mis en place en utilisant les deux doses qui ont montré une meilleure médiane de survie sans toxicité. Dans ce schéma thérapeutique, des activités de 35 ou 55 MBq ont été injectées à deux semaines d'intervalle (**Figures 27.B et D**).

L'injection de deux doses de 35 MBq de [^{64}Cu]Cu-THE1PA-9E7.4 a permis d'augmenter significativement la médiane de survie des souris de 15 jours (ms = 45 jours) par rapport au groupe contrôle NaCl 0,9% ($p < 0,0001$). Deux souris appartenant à cette cohorte ($n = 6$) ont survécu sans montrer de signe de la maladie jusqu'à la fin de l'étude. L'administration de deux

doses de 55 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ n'a pas augmenté significativement la survie par rapport à une injection unique de 55 MBq ($p = 0,3217$). Elle n'a cependant pas été moins efficace sur la survie et a permis d'augmenter la médiane de survie de 18 jours par rapport au groupe contrôle NaCl 0,9%.

En parallèle, l'intérêt de la vectorisation du cuivre-64 dans ce modèle a été évalué en comparant l'effet du traitement avec l'injection de deux doses de 35 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ à 2 semaines d'intervalle. L'injection de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ a augmenté significativement la survie médiane de 7 jours par rapport à celle du groupe contrôle NaCl 0,9% ($ms = 30$ jours)($p = 0,0096$).

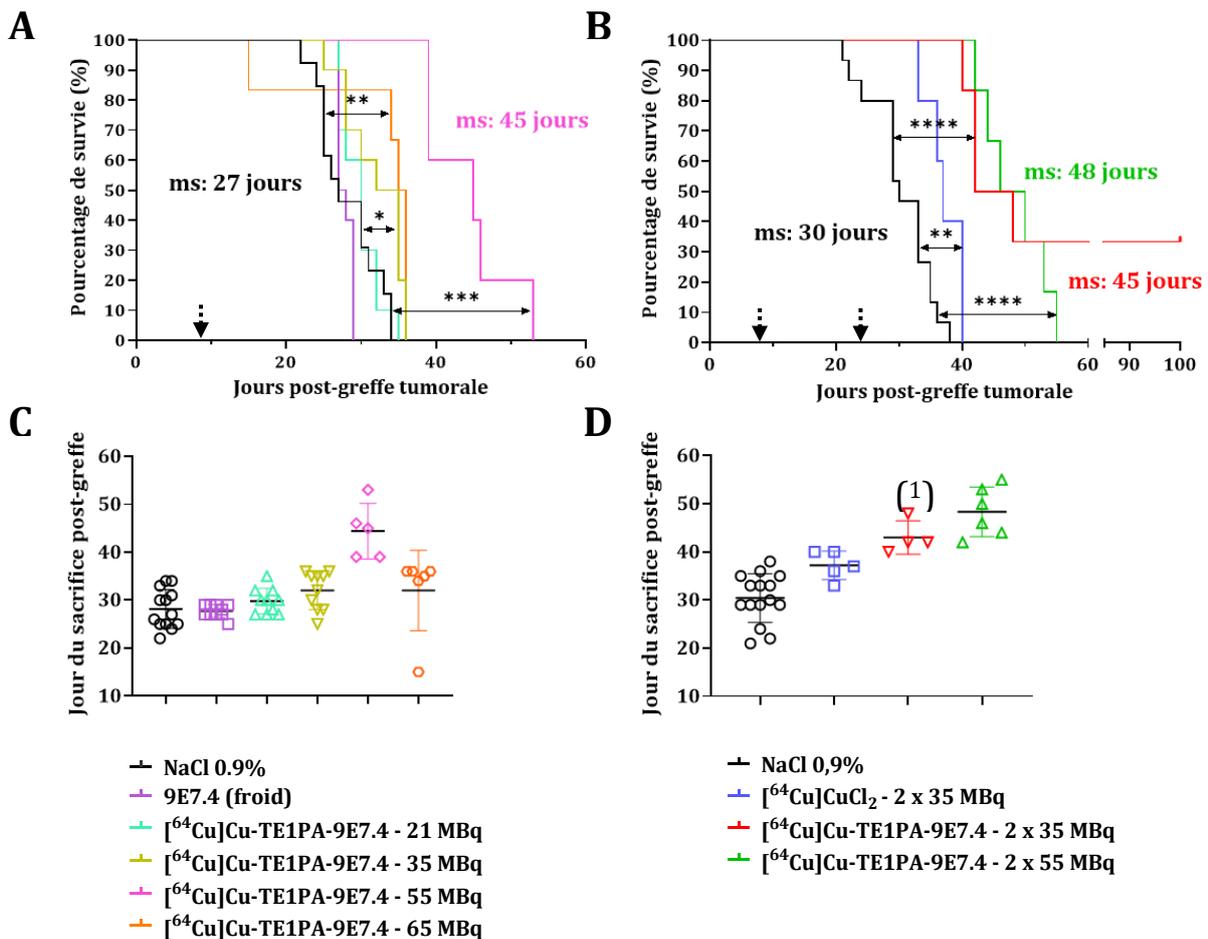


Figure 27. Survie des animaux après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle orthotopique MOPC315.BM

La survie des souris greffées en i.v avec les cellules MOPC315.BM est représentée par les courbes de Kaplan-Meier après (A) une dose, ou (B) une répétition de deux doses de traitement, les souris ont été suivies pendant 100 jours après la greffe tumorale et sacrifiées lors de l'apparition de signes de paralysie ou d'une perte de poids > 20% ($n=5-15$; * $P < 0,01$, ** $P < 0,005$, *** $P = 0,0004$, **** $P < 0,0001$, test Log-rank (Mantel-Cox)). Les flèches en pointillés représentent les jours d'injection du traitement. Les graphiques (C) et (D) représentent les médianes de survie des différents groupes avec la répartition du jour de sacrifice de chaque souris, (1) les souris qui ont survécu jusqu'à la fin de l'étude ont été exclues de ce graphique.

Tableau 7. Activités globales injectées dans les différentes cohortes en activités injectées par gramme de souris (MBq/g) greffées en i.v avec les MOPC315.BM

Cohortes	Activités injectées/g de souris (MBq/g)
21 MBq	1,07 ± 0,06
35 MBq	1,73 ± 0,26
55 MBq	2,91 ± 0,14
65 MBq	3,36 ± 0,12

Dans chaque cohorte, l'activité totale injectée par souris a été ramenée à son poids le jour de l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$. Les résultats sont présentés en MBq/g de souris \pm écart-type.

- Évaluation de la toxicité générale et hématologique

La toxicité générale et hématologique, après la greffe des cellules et durant tout le suivi de la thérapie, a été évaluée avec le suivi régulier de la variation pondérale des souris, ainsi que la numération hebdomadaire des éléments figurés du sang (globules blancs, globules rouges et plaquettes). Aucune perte significative de poids qui a atteint les 20% du poids initial n'a été observée lors du suivi post-thérapeutique dans aucun des groupes de souris (**Figure 28.A**). La baisse de poids la plus importante observée lors de ces expérimentations concerne les souris du groupe traitées avec 65 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ qui correspond à une activité de $3,36 \pm 0,12$ MBq/g de souris (**Tableau 7**). La perte de poids moyenne atteinte les 3 jours suivant l'injection thérapeutique dans ce groupe est de $7,56 \pm 0,4$ % par rapport au poids initial. Ce résultat montre que les souris de ce groupe ont plus de mal à récupérer comparativement à celles des autres groupes. Quelle que soit la cohorte, aucune variation significative du nombre de globules rouges n'a été observée lors du suivi (**Figure 28.B**). En revanche, concernant les globules blancs énumérés les semaines suivant l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ ou du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, on observe une diminution significative de leur nombre (**Figure 28.C**) et ce quelle que soit l'activité injectée. Cette diminution est transitoire et le nombre de globules blancs augmente à nouveau 1 à 2 semaines après l'injection. Comme pour les globules blancs, on observe une diminution significative, mais transitoire du nombre de plaquettes après l'injection du traitement, cependant cette diminution concerne uniquement les souris qui ont reçu une injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ avec une activité supérieure à 35 MBq (**Figure 28.D**). Une diminution relative du nombre de plaquettes et des globules blancs chez les souris témoins est observée au cours du temps.

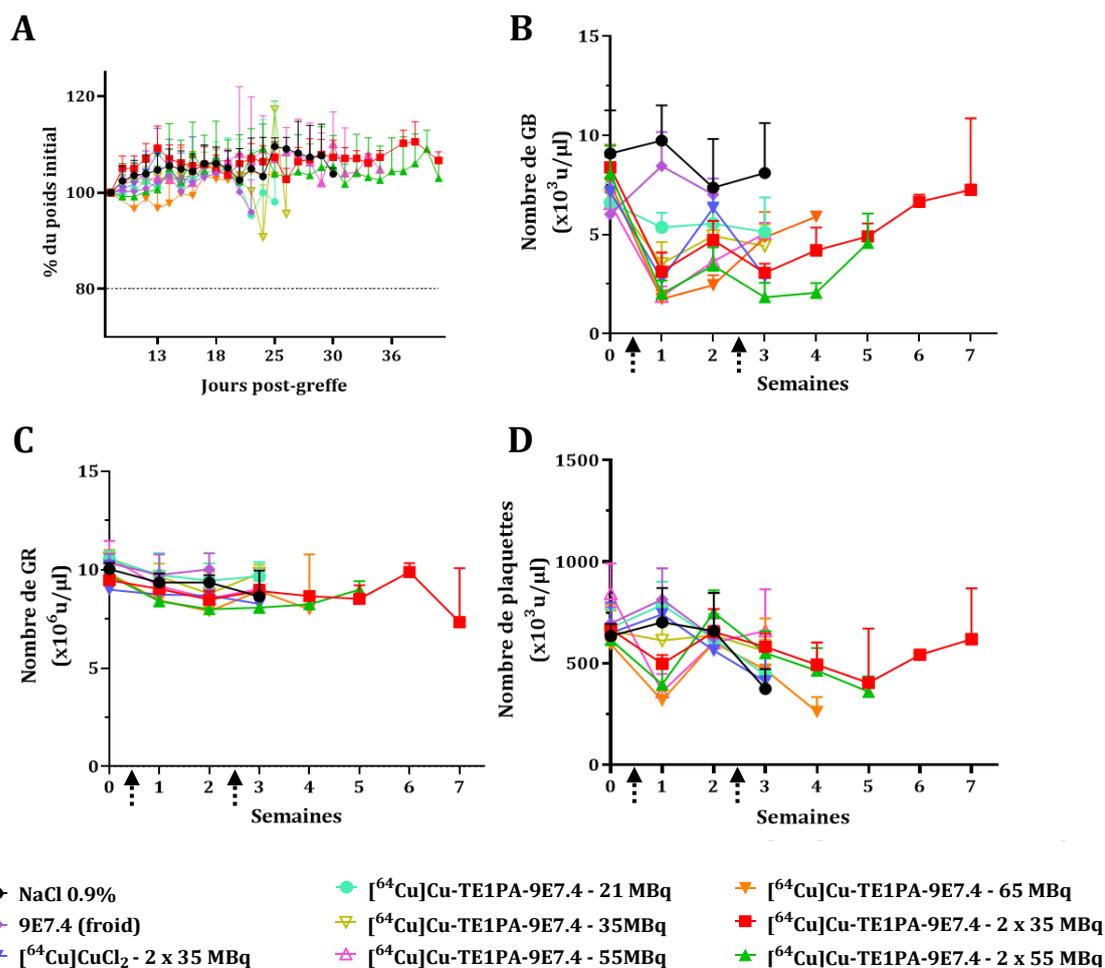


Figure 28. Suivi du poids et de la toxicité hématologique après thérapie au [64Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans le modèle orthotopique MOPC315.BM

(A) Suivi de la variation pondérale des souris pour chaque cohorte, exprimée en % du poids initial. L'hématotoxicité a été contrôlée par (B) la numération des globules blancs, (C) des globules rouges et (D) des plaquettes une fois par semaine après l'injection i.v des cellules tumorales MOPC315.BM (test de comparaisons multiples de Sidak, ANOVA à 2 facteurs). Les flèches en pointillés représentent les temps d'injections des différents traitements.

- Évaluation de la toxicité hépatique et rénale

Nous avons également étudié la toxicité hépatique et rénale au moment du sacrifice des souris en mesurant les taux d'aspartate aminotransférase (AST) et d'alanine transaminase (ALT) pour la toxicité hépatique et d'azote uréique du sang (BUN) et de la créatinine pour la toxicité rénale (Annexe 6). Ces valeurs ont été comparées aux valeurs de références mesurées avant l'inoculation des cellules tumorales (T0) (Figure 29).

Aucune augmentation significative de la créatinine ou du BUN n'a été observée après chaque condition de traitement ($p < 0,9999$) (Figures 29.B-D). En ce qui concerne la toxicité hépatique,

les taux d'AST au moment du sacrifice ont significativement augmenté par rapport aux valeurs de référence, excepté pour les groupes injectés avec 9E7.4 seul ou 35 MBq de [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 (**Figure 29.A**). Le taux d'AST de la souris issue du groupe injecté avec 65 MBq qui a été sacrifié relativement tôt après l'injection thérapeutique est faible et similaire aux valeurs références déterminées. Concernant les deux souris du groupe 2 x 35 MBq qui ont survécu, les niveaux d'AST sont similaires aux niveaux trouvés chez les souris à T0 ((s) valeurs sur le graphique). Quelques souris des groupes injectés avec 65 MBq (3 souris sur 6) et 2 x 55 MBq (2 souris sur 5) de [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 présentent des taux d'ALT significativement plus élevés par rapport aux valeurs mesurées avant le traitement (p = 0,0295 et p = 0,031 respectivement) (**Figure 29.C**).

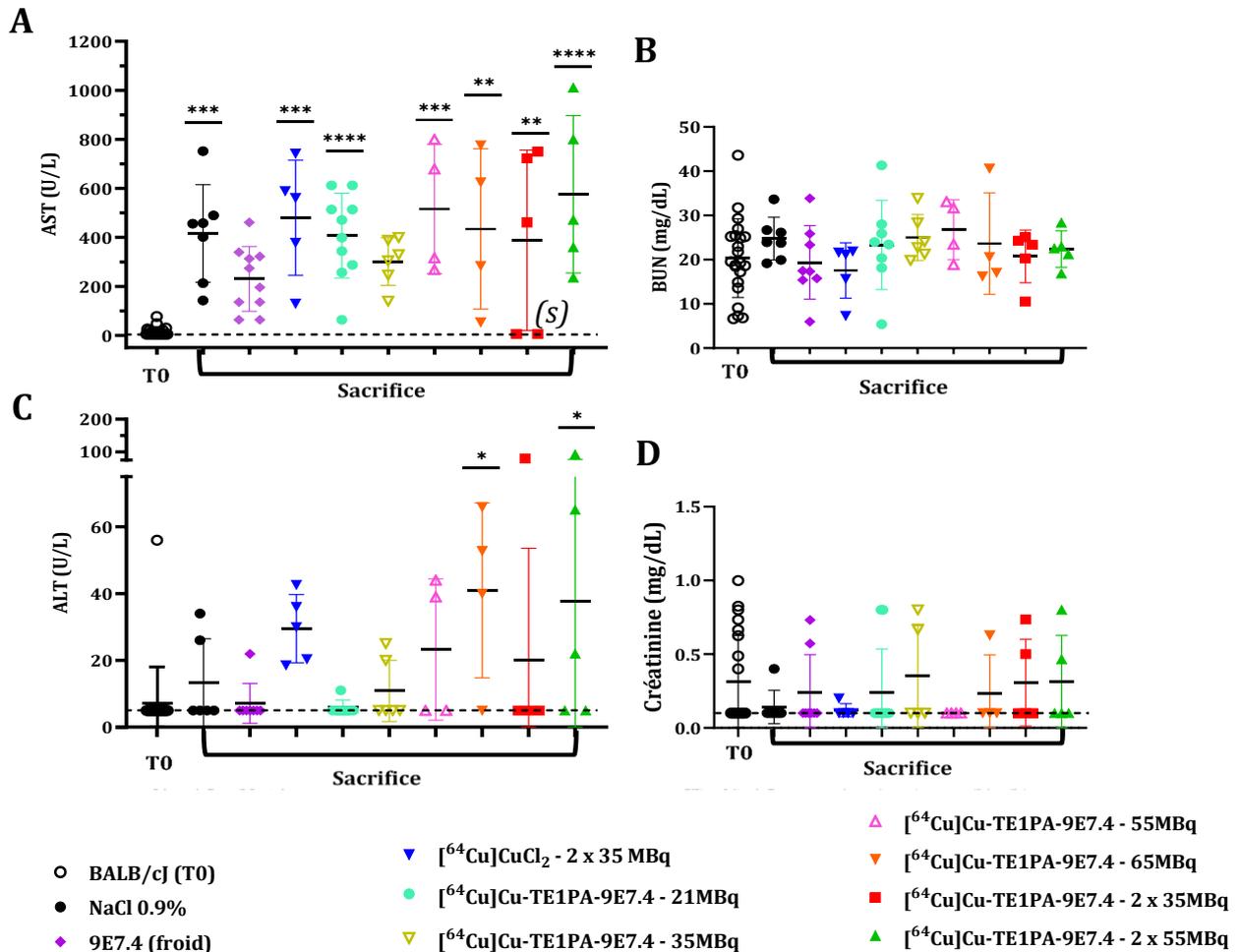


Figure 29. Suivi de la toxicité hépatique et rénale après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle orthotopique MOPC315.BM

Les taux plasmatiques (A) d'AST, (B) de BUN, (C) d'ALT et (D) de créatinine ont été évalués avant la greffe de la tumeur (T0) et au moment du sacrifice. Le (s) représente les valeurs des deux souris qui ont survécu jusqu'à la fin de l'étude. L'analyse statistique a été réalisée avec un test ANOVA à un facteur et les tests de comparaisons multiples de Sidak (les résultats statistiques indiqués sont significativement différents de T0, (*) $P < 0,03$; (**) $P < 0,0007$; (***) $P < 0,0003$; (****) $P < 0,0001$).

24 heures après l'injection des traitements, les souris ont été soumises à des sessions d'imagerie TEP-TDM (Figure 30). Ces images nous ont permis de visualiser les lésions tumorales présentes au niveau des os des souris, principalement le long de la colonne vertébrale, et dans les pattes arrière, et ce quelques jours avant que des signes de paralysie soient observés chez les souris.

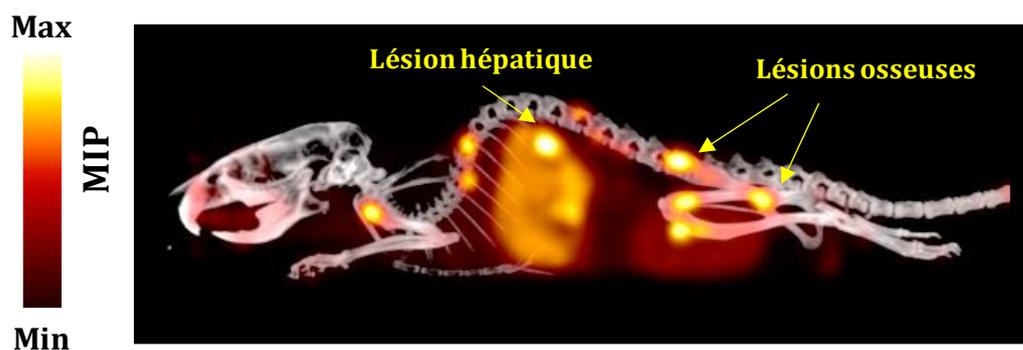


Figure 30. Suivi de l'évolution de la maladie dans le modèle orthotopique MOPC315.BM par imagerie TEP-TDM avec une injection thérapeutique du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$

Imagerie TEP-TDM, d'une souris de l'étude de RIV appartenant à la cohorte traitée avec 2 doses de 35 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, réalisée 24 h p.i de la deuxième dose thérapeutique, soit 24 jours après la greffe tumorale des cellules MOPC315.BM par voie i.v dans la veine caudale de la souris. Les images TEP-TDM sont présentées en MIP. Les flèches jaunes indiquent la présence de foyers tumoraux dans les os et dans le foie.

9. Expérimentation de la RIV utilisant le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans un modèle sous-cutané de MM

Après avoir déterminé les activités les plus efficaces et les moins toxiques dans le traitement de notre modèle orthotopique de MM murin. Nous avons souhaité évaluer la capacité du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ à traiter des masses tumorales solides et plus difficilement accessibles pour le radioimmunoconjugué. Pour cela, nous avons réalisé une expérimentation de RIV pour traiter des tumeurs MOPC315.BM s.c. Dans ce modèle ectopique, les injections thérapeutiques des différentes cohortes ont été réalisées 6 jours après la greffe s.c des cellules tumorales, lorsque les tumeurs étaient palpables. Les souris ont reçu par voie i.v dans la veine caudale latérale de la queue, le traitement qui a entraîné le meilleur rapport efficacité/toxicité lors de l'étude précédente, soit deux doses de 35 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ou de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ à deux semaines d'intervalles. Un groupe de souris contrôle a reçu des injections i.v de solution de NaCl 0,9% (**Figure 31**).

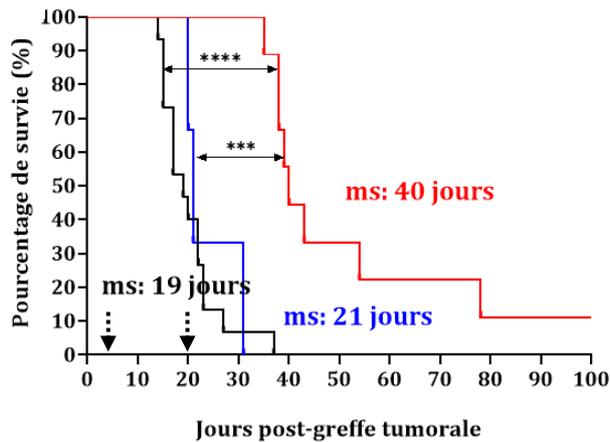
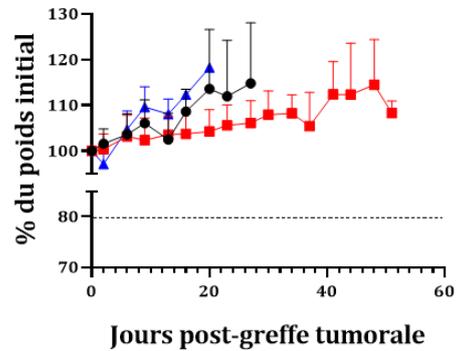
- Évaluation de la survie des souris et de la croissance tumorale après traitement

L'efficacité thérapeutique a été évaluée par le suivi de la survie (**Figure 31.A**) et de la croissance tumorale (**Figure 31.C**). Contrairement à ce qui a été observé dans le modèle orthotopique, l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ n'a pas augmenté la survie des souris (ms = 21 jours) par rapport au groupe contrôle NaCl 0,9% (ms = 19 jours) ($p = 0,5448$). En revanche, la survie médiane a été doublée avec l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ (ms = 40 jours) ($p < 0,0001$). Deux souris de ce groupe de traitement ont survécu, l'une jusqu'à 80 jours, après la greffe tumorale, avant que la maladie ne réapparaisse, tandis que l'autre a survécu jusqu'à la fin de

l'étude. Le suivi de la masse corporelle au cours du temps (**Figure 31.B**) n'a révélé aucune perte de poids significative dans nos différentes cohortes.

La première injection de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ a entraîné un ralentissement de la croissance tumorale avec un Td de $4,51 \pm 2,17$ jours par rapport aux groupes injectés avec du $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ (Td = $2,9 \pm 0,12$ jours, $p = 0,44$) ou du NaCl 0,9% (Td = $1,91 \pm 0,49$ jours, $p = 0,012$) (**Figures 31.C**). En moyenne, 18 jours après la greffe tumorale, soit 12 jours après l'injection de la première dose thérapeutique, des volumes tumoraux moyens significativement différents ont été mesurés entre le groupe témoin NaCl 0,9% et le groupe traité avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ avec respectivement, $925,7 \pm 381,6 \text{ mm}^3$ et $207,2 \pm 170,4 \text{ mm}^3$ ($p = 0,000004$). À ce même moment, on retrouvait un volume moyen de $678,6 \pm 141,7 \text{ mm}^3$ chez les souris traitées avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$.

La seconde injection de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, 20 jours après la greffe tumorale, a réduit de manière significative le volume tumoral de toutes les souris de cette cohorte en entraînant une réduction moyenne maximale de $70,68 \pm 21,34 \%$ du volume des tumeurs.. Une récurrence tardive de la croissance tumorale, avec un retard d'environ 20 jours, par rapport aux deux groupes contrôles a été observée chez la plupart des souris de cette cohorte. Concernant les autres souris de ce groupe, le volume de leur tumeur est resté très petit (environ 15 mm^3) jusqu'au moment du sacrifice. Cependant, à l'exception de la souris qui a survécu jusqu'à la fin de l'étude, pour l'ensemble des souris traitées avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, des signes de paralysie des membres inférieurs sont apparus. Le développement de cette paralysie chez des souris portant des tumeurs s.c reflète un échappement et une migration des cellules tumorales.

A**B**

— NaCl 0,9% — [⁶⁴Cu]CuCl₂ - 2 x 35 MBq — [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 - 2 x 35 MBq

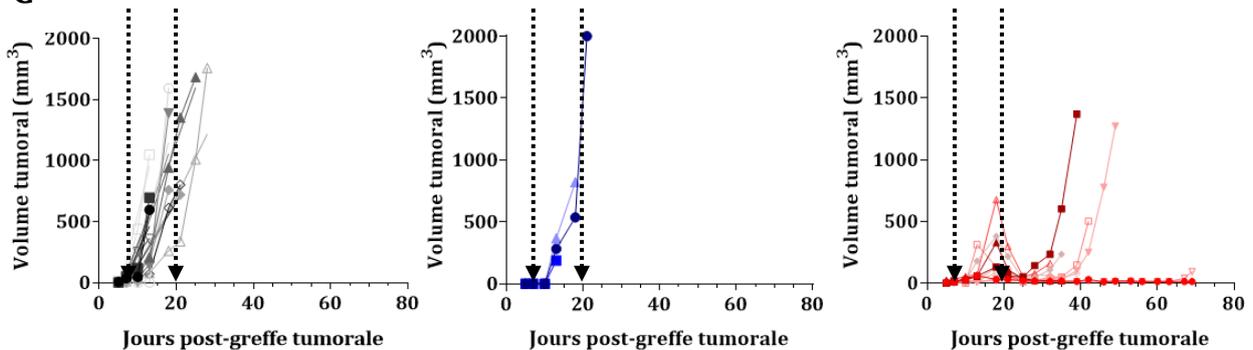
C

Figure 31. Suivi de la survie, de la variation pondérale et de la croissance tumorale chez les souris après thérapie au [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans le modèle s.c MOPC315.BM

Six jours après la greffe tumorale s.c, les souris portant des tumeurs s.c MOPC315.BM ont reçu deux doses thérapeutiques de 35 MBq de [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 (n= 9), [⁶⁴Cu]CuCl₂ (n= 3), ou de NaCl 0,9% (n= 15) pour les groupes contrôles, à deux semaines d'intervalles. La survie est représentée par (A) les courbes de Kaplan-Meier (**P < 0,0002, ****P < 0,0001, test Log-rank (Mantel-Cox). Le suivi de la (B) variation pondérale pour chaque groupe est exprimé en % du poids initial, au-delà d'une perte de poids supérieure à 20% par rapport au poids initial, les souris étaient sacrifiées. (C) Courbes de croissance tumorale pour les souris après la greffe tumorale, chaque courbe représente une souris. Le volume tumoral a été mesuré deux fois par semaine, l'apparition de signes de nécrose tumorale, de paralysie ou lorsque le volume atteignait 2000 mm³, les souris étaient sacrifiées. Les flèches en pointillés représentent les temps d'injections des différents traitements.

Tableau 8. Activités globales injectées dans les différentes cohortes en activités injectées par gramme de souris (MBq/g) porteuses de tumeurs s.c MOPC315.BM

Cohortes	Activités injectées/g de souris (MBq/g)
[⁶⁴ Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 – 2 x 35 MBq	1,68 ± 0,8
[⁶⁴ Cu]CuCl ₂ – 2 x 35 MBq	1,77 ± 0,04

Dans chaque cohorte, l'activité totale injectée par souris a été ramenée à son poids le jour de l'injection du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4. Les résultats sont présentés en MBq/g de souris ± écart-type.

- Évaluation de la toxicité hématologique

Comme dans le modèle orthotopique, l'injection du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 ou du [⁶⁴Cu]CuCl₂ a induit une diminution transitoire et modérée du nombre de globules blancs, mais n'a eu aucun effet sur les taux de plaquettes et de globules rouges (**Figure 32**). Une diminution des taux de plaquettes, de globules blancs et de globules rouges a été mesurée chez les souris du groupe témoin ayant reçu le NaCl 0,9% et semble donc corrélée avec la progression de la maladie.

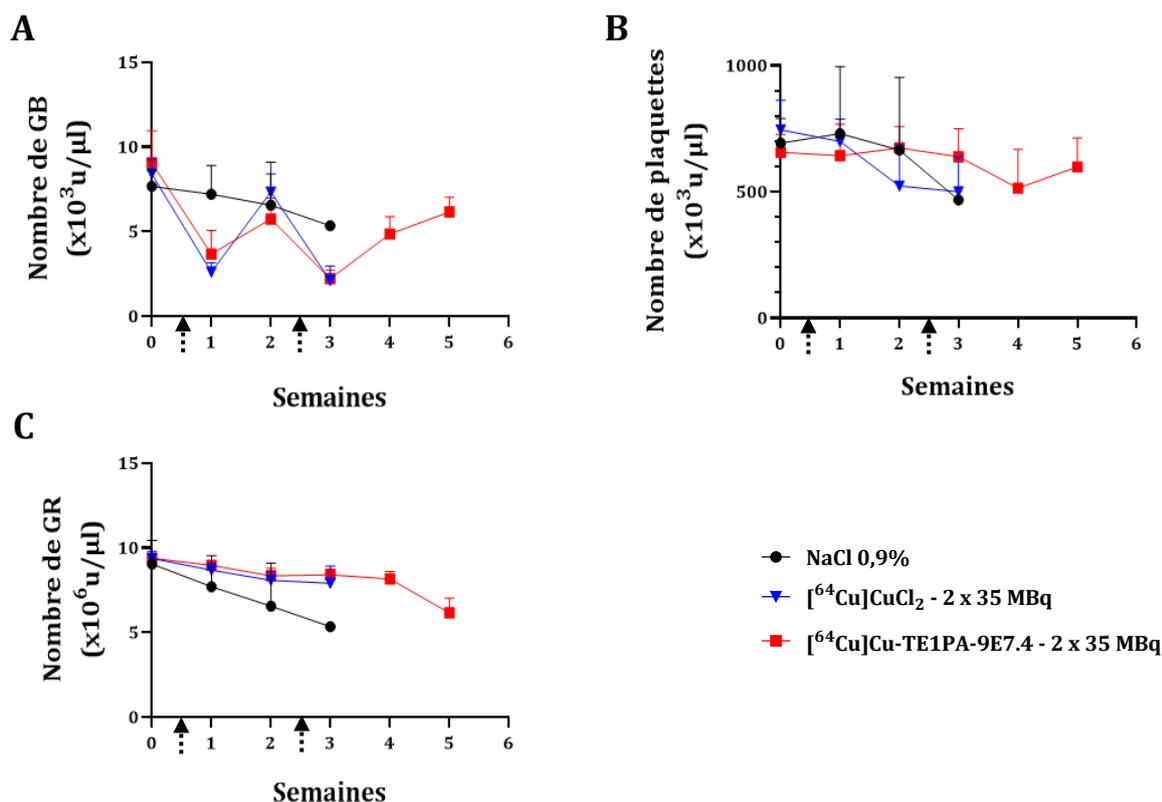


Figure 32. Suivi de la toxicité hématologique après thérapie au [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans le modèle s.c MOPC315.BM

L'hématotoxicité a été contrôlée par la numération hebdomadaire (A) des globules blancs, (B) des plaquettes (C) et des globules rouges après injection s.c des cellules MOPC315.BM au-dessus de l'épaule droite. La comparaison des résultats des différents groupes de souris a été réalisée avec un test de comparaisons multiples de Sidak, ANOVA à 2 facteurs. Les flèches en pointillés représentent les temps d'injections des différents traitements.

- Évaluation de la toxicité hépatique et rénale

L'analyse biochimique de la toxicité hépatique a montré une augmentation significative des taux d'AST moyens dans chacune des trois cohortes par rapport aux taux de référence retrouvés au temps T0 (**Figure 33.A**) avec une augmentation plus importante des valeurs concernant le groupe traité avec le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 qui passent de $14,35 \pm 12,75$ U/L à T0 à $386,18 \pm 196,17$ U/L ($p < 0,0001$). Encore une fois, pour la souris qui a survécu jusqu'à la fin de l'étude, le taux d'AST dosé au moment du sacrifice est équivalent à celui de la référence T0 (voir (s) sur le graphique). En ce qui concerne les dosages d'ALT de chaque cohorte au moment du sacrifice, les valeurs obtenues ne sont pas significativement différentes de celles des souris du groupe référence T0 (**Figure 33.C**). Comme dans le modèle orthotopique, aucune différence significative

n'a été observée dans les taux de créatinine ou d'azote uréique sanguin, qui sont des marqueurs d'une potentielle toxicité rénale (**Figures 33.B et 33.D**).

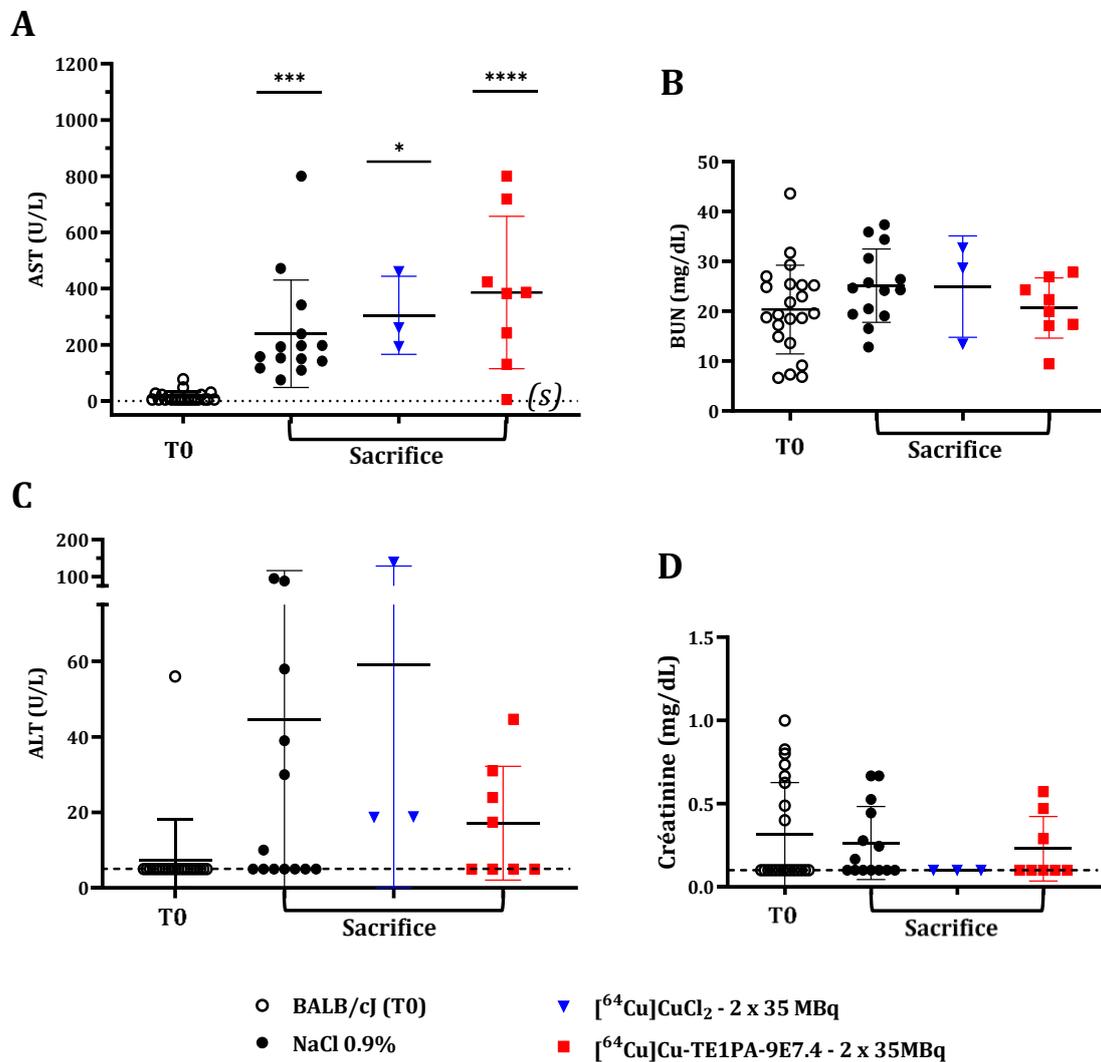


Figure 33. Suivi de la toxicité hépatique et rénale après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle s.c MOPC315.BM

Les taux plasmatiques (A) d'AST, (B) de BUN, (C) d'ALT et (D) et de créatinine ont été évalués avant la greffe de la tumeur (T0) et au moment du sacrifice. Le (s) représente la valeur du taux d'AST de la souris qui a survécu jusqu'à la fin de l'étude. L'analyse statistique a été réalisée avec un test ANOVA à un facteur et les tests de comparaisons multiples de Sidak (les résultats statistiques indiqués sont significativement différents de T0, (*) $P < 0,03$; (**) $P < 0,0007$; (***) $P < 0,0003$; (****) $P < 0,0001$).

24 heures après l'injection des traitements, les souris ont été soumises à des sessions d'imagerie TEP-TDM. Ce suivi nous permet d'appuyer les résultats observés lors de cette étude, et notamment concernant la souris traitée avec deux injections de 35 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ à deux semaines d'intervalles et qui a survécu jusqu'à la fin de l'étude (**Figure 34**). L'imagerie

TEP-TDM réalisée après l'injection de la première dose thérapeutique du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, soit 7 jours après le greffe s.c des cellules MOPC315.BM, montre une fixation importante au niveau de la tumeur (**Figure 34.A**). Cette image TEP permet de confirmer la prise de greffe des cellules tumorales. En effet, en deçà d'un volume d'environ 15 mm^3 mesuré manuellement au pied à coulisse, il existe une incertitude et une imprécision quant au volume tumoral. Cela est dû à la petite taille de la tumeur qui peut être confondue avec l'absence de tumeur et dont la mesure est biaisée par l'épaisseur de la peau de la souris, or, 6 jours après la greffe tumorale un volume de $6,3 \text{ mm}^3$ avait été mesuré pour la tumeur de cette souris (**Figure 34.B**).

Après la première injection de 35 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, le volume de la tumeur de cette souris a continué de croître lentement jusqu'à un volume maximum de 62 mm^3 atteint 14 jours après la greffe tumorale avant de décroître. L'injection de la deuxième activité thérapeutique, 20 jours après la greffe tumorale, a apporté une contribution supplémentaire à la régression tumorale. Le volume tumoral a ainsi continué à décroître jusqu'à atteindre, environ 30 jours après la greffe tumorale, un volume inférieur au seuil de précision de la mesure manuelle du volume tumoral. Jusqu'à la fin de l'étude, il n'a pas été observé de récurrence tumorale chez cette souris. Afin de confirmer la guérison complète de la souris, une imagerie TEP-TDM a été réalisée 126 jours post-inoculation, 24 h post-injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$. Aucun signal positif n'a été observé au niveau de l'épaule droite (**Figure 34.A**). Au moment du sacrifice, l'autopsie n'a pas révélé de tumeur visible, et le tissu conjonctif présent à l'emplacement initial de la tumeur a été prélevé. L'analyse histologique par coloration HPS du prélèvement (**Figure 34.C**) a mis en évidence la présence de tissus musculaires, conjonctifs ainsi que d'un nœud lymphatique (**Figure 34.D**), mais aucun tissu tumoral n'a été retrouvé localement.

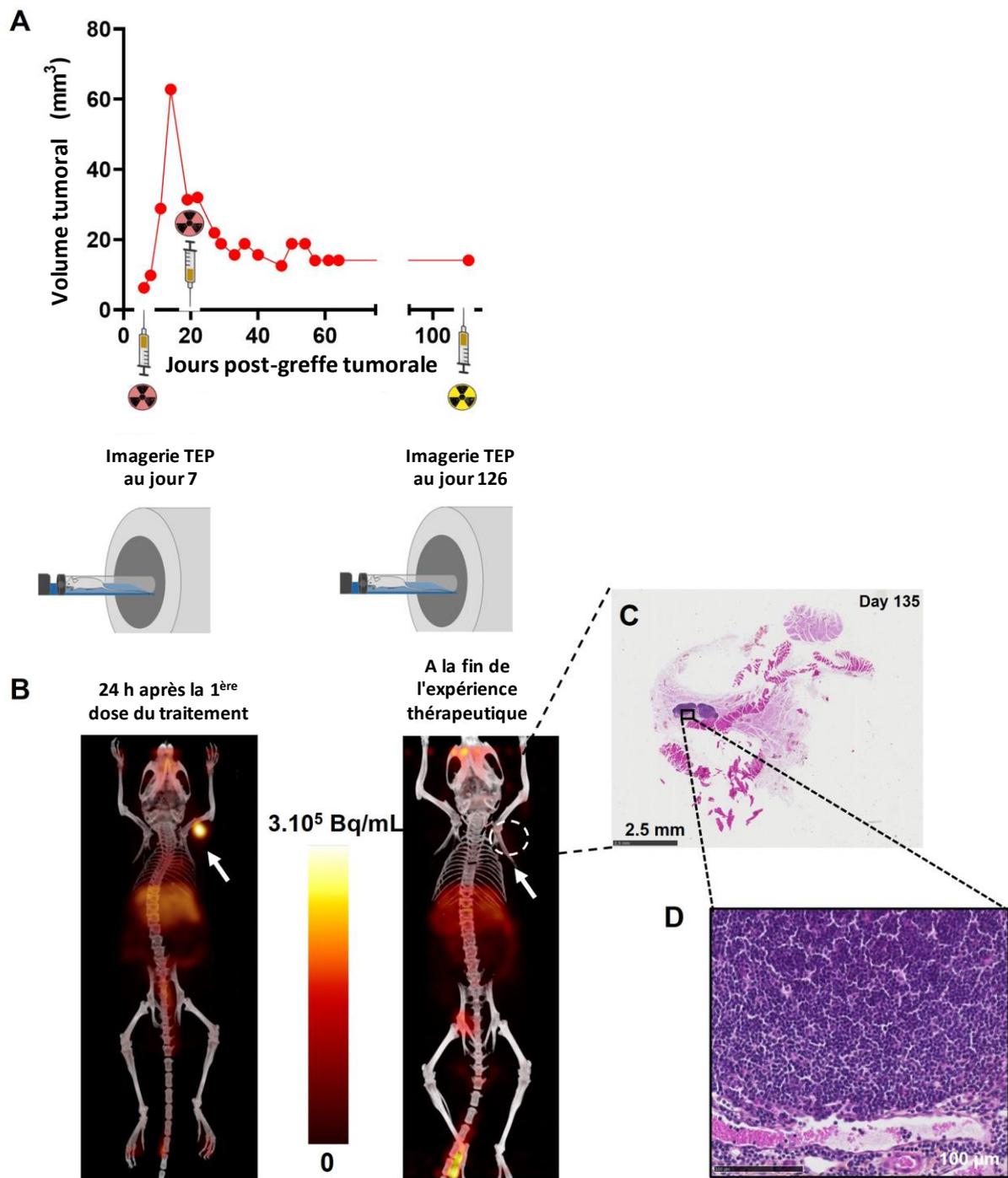


Figure 34. Théranostique et efficacité thérapeutique après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle s.c MOPC315.BM

L'ensemble de ces figures représente les résultats spécifiques à la souris de la RIV au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle MOPC315.BM s.c, qui a survécu jusqu'à la fin de l'étude (A) Courbe de l'évolution du volume tumoral de cette souris mesuré manuellement au pied à coulisse. (B) Imagerie TEP-TDM, 7 jours après la greffe des cellules MOPC315.BM avec la première dose thérapeutique de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ (29,65 MBq ; 100µg de 9E7.4), et, 126 jours après la greffe tumorale ($[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$; 8,4 MBq ; 25µg de 9E7.4). Les images TEP-TDM sont présentées en MIP. (C) Marquage histologique sur le tissu prélevé à l'emplacement initial de la tumeur par coloration HPS. (D) Grossissement du marquage histologique au niveau du nœud lymphatique.

III. Évaluation d'une RIV utilisant le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans un modèle murin de tumeur solide, le cancer du sein triple négatif

Dans le modèle préclinique de MM étudié, qu'il soit orthotopique ou sous-cutané, la RIV au [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 a permis d'augmenter la survie des souris et de retarder la progression tumorale sans induire de toxicité aiguë. Cette RIV a même permis à certains individus de survivre sur le long terme sans développer de signes apparents de la maladie. Compte tenu de ces résultats très encourageants, nous avons souhaité dans un deuxième temps, tester le potentiel thérapeutique du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans un modèle de cancer plus hétérogène. Après que l'efficacité de notre radioimmunoconjugué ait été démontrée, dans un modèle de cancer disséminé comme le myélome multiple, nous avons choisi de travailler sur un modèle de tumeur solide. Le cancer du sein nous est apparu comme favorable dans ce contexte, notamment dans le cas des cancers dits triples négatifs qui représentent encore aujourd'hui un challenge thérapeutique puisqu'ils restent difficiles à traiter efficacement. Des travaux préliminaires effectués dans notre équipe de recherche ont montré que le CD 138 était un marqueur très souvent présent dans ce type de cancer. C'est pourquoi nous avons sélectionné la lignée murine 4T1 de cancer du sein triple négatif disponible au sein de notre laboratoire.

1. Évaluation par cytométrie en flux de l'expression membranaire du CD138 par la lignée cellulaire murine 4T1 de cancer du sein triple négatif

Nous avons dans un premier temps, évalué l'expression membranaire de la cible d'intérêt du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 par cytométrie en flux avec l'anticorps 9E7.4 anti-CD138 murin. La stratégie d'analyse a aidé à éliminer les débris cellulaires, les cellules mortes marquées au DAPI et les doublets cellulaires (**Figure 35.A**). Le marquage de l'antigène CD138 sur la membrane des cellules 4T1 avec l'anticorps 9E7.4 indique que la population cellulaire exprime le CD138 de manière importante, mais la largeur de l'histogramme indique aussi une expression hétérogène des cellules (**Figure 35.B**). Le contrôle isotypique avec l'IgG2a, κ confirme la spécificité du ciblage avec l'anticorps 9E7.4. L'analyse de l'expression avec une gamme de concentrations croissantes de l'anticorps nous a permis d'établir une courbe de saturation des sites antigéniques (**Figure 35.C**) à partir de laquelle nous avons pu caractériser l'affinité de l'anticorps sur la cible CD138 pour la lignée 4T1. Les données ont été ajustées, selon une équation de liaison spécifique à l'aide d'une régression non linéaire en utilisant le logiciel GraphPad Prism (version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA), et les résultats ont mis en évidence une affinité importante de l'anticorps pour le CD138, avec une valeur de constante de dissociation (Kd) de $3,03 \cdot 10^{-9}$ M.

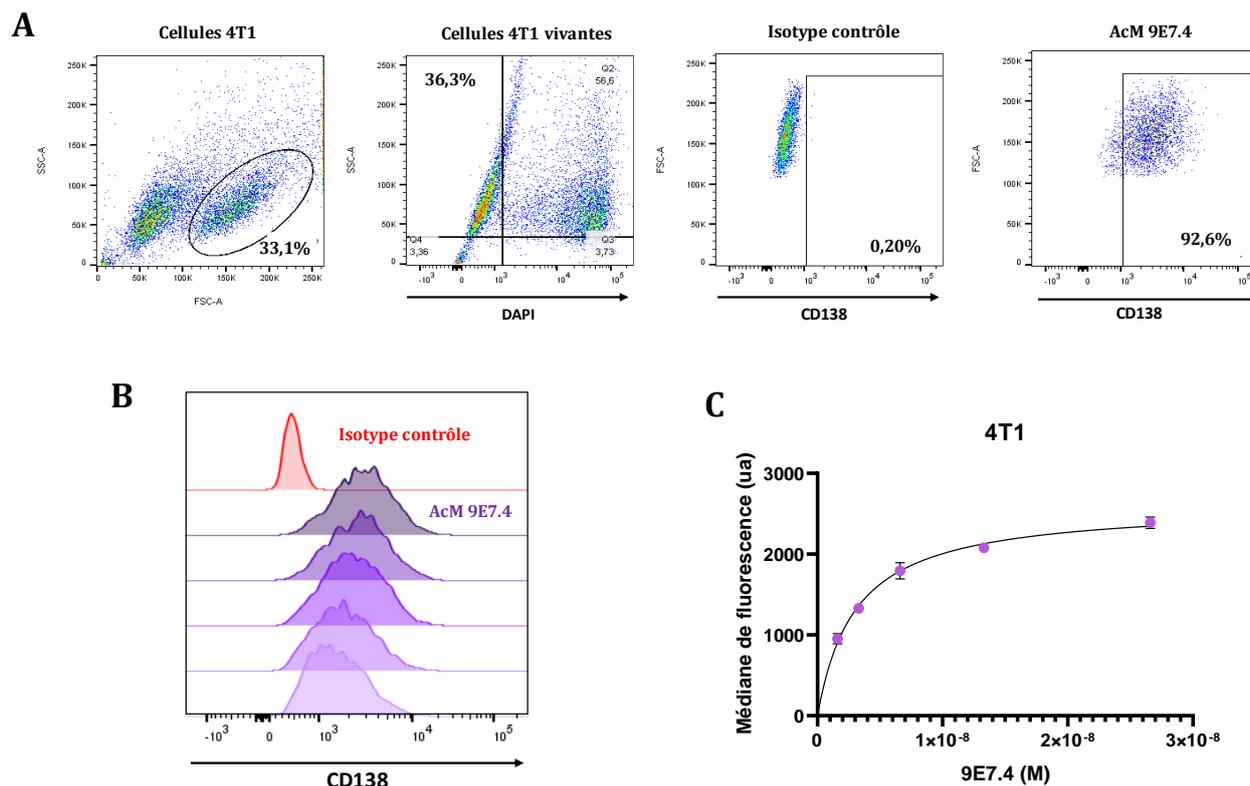


Figure 35. Caractérisation par cytométrie en flux de l'expression membranaire du CD138 par la lignée cellulaire 4T1 et de l'affinité de l'anticorps 9E7.4 pour la cible

(A) Méthode de tri et d'analyse des cellules par cytométrie en flux (B) Le marquage des cellules a été réalisé avec l'anticorps anti-CD138 9E7.4 avec une gamme de concentration de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et la spécificité de ciblage a été contrôlée avec un isotype IgG2a, κ . L'acquisition a été réalisée sur un système de cytométrie en flux BD FACS Canto II™ et analysée à l'aide du logiciel FlowJo™ (version 10.6.1, BD Sciences). (C) Courbes des médianes de fluorescence exprimant la saturation des antigènes CD138 de la lignée cellulaire 4T1 par des concentrations croissantes d'anticorps 9E7.4. L'analyse de l'affinité a été effectuée sur le logiciel GraphPad Prism (version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA) avec une courbe de régression non linéaire (« One site - Specific binding »). Les barres d'erreurs représentent l'écart type des médianes de fluorescence.

Une différence d'expression de la cible CD138 entre les cellules 4T1 et les cellules MOPC315.BM de notre premier modèle existe et a été mise en évidence dans la **Figure 36**. Les résultats montrent une expression membranaire du CD138 5 fois plus faible dans les cellules de la lignée 4T1 que dans celles de la lignée MOPC315.BM.

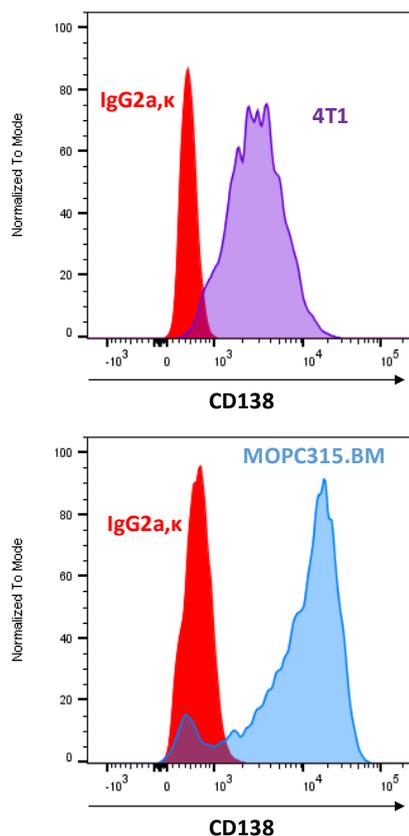


Figure 36. Comparaison de l'expression membranaire du CD138 entre les lignées cellulaires 4T1 et MOPC315.BM

Histogrammes représentatifs de l'expression du CD138 par les cellules tumorales MOPC315.BM et 4T1 déterminé par cytométrie en flux avec l'anticorps 9E7.4 (4µg/mL) révélé avec un anticorps secondaire anti-IgG de rat couplé à la FITC. L'acquisition a été réalisée sur un système de cytométrie en flux BD FACS Canto II™ et analysée à l'aide du logiciel FlowJo™ (version 10.6.1, BD Sciences).

2. Imagerie TEP-TDM du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ et du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-IgG2A},\kappa$ chez des souris portant une tumeur 4T1 s.c

Comme dans le modèle murin de MM décrit précédemment, le suivi longitudinal par imagerie TEP-TDM de la biodistribution in vivo du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ a débuté 11 jours après la greffe des cellules 4T1 (**Figure 37.A**). La spécificité de la fixation observée avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ a été contrôlée en réalisant en parallèle des images avec l'isotype IgG2A, κ fonctionnalisé et radiomarqué selon la même procédure que l'anticorps 9E7.4 (**Figure 37.B**).

L'inspection des images TEP réalisées à 5 minutes post-injection montre que le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ se distribue rapidement dans l'ensemble du système vasculaire, ainsi que dans les organes richement vascularisés. D'autre part, le signal radioactif est aussi observé au niveau de la vessie et y est toujours visible 2 heures après l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$.

Au niveau de la tumeur, on observe une captation importante, mais cependant hétérogène du radiotraceur deux heures après son injection. Un point d'hyperfixation tumoral, équivalent au

signal présent dans le foie, est observé. La captation tumorale n'est pas stable dans le temps, puisque 24 heures après l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, elle diminue fortement bien qu'elle soit toujours visible. En parallèle, le signal présent au niveau du foie 24 heures après l'injection est très intense. Par ailleurs, un signal de faible intensité est aussi observé dans le tractus digestif des souris. Les images réalisées à 48 heures après l'injection montrent une diminution drastique du signal radioactif dans le foie et un signal quasi inexistant dans la tumeur et le tube digestif.

Bien que la fixation au niveau de la tumeur à 24 heures après l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ soit relativement faible, celle-ci semble spécifique puisque l'imagerie TEP réalisée avec l'isotope $\text{IgG2a,}\kappa$ montre un signal tumoral moins important (**Figure 37.B**). Alors que, pour les deux radioimmunoconjugués, 24 heures après leur injection, on retrouve un signal intense et équivalent au niveau du foie.

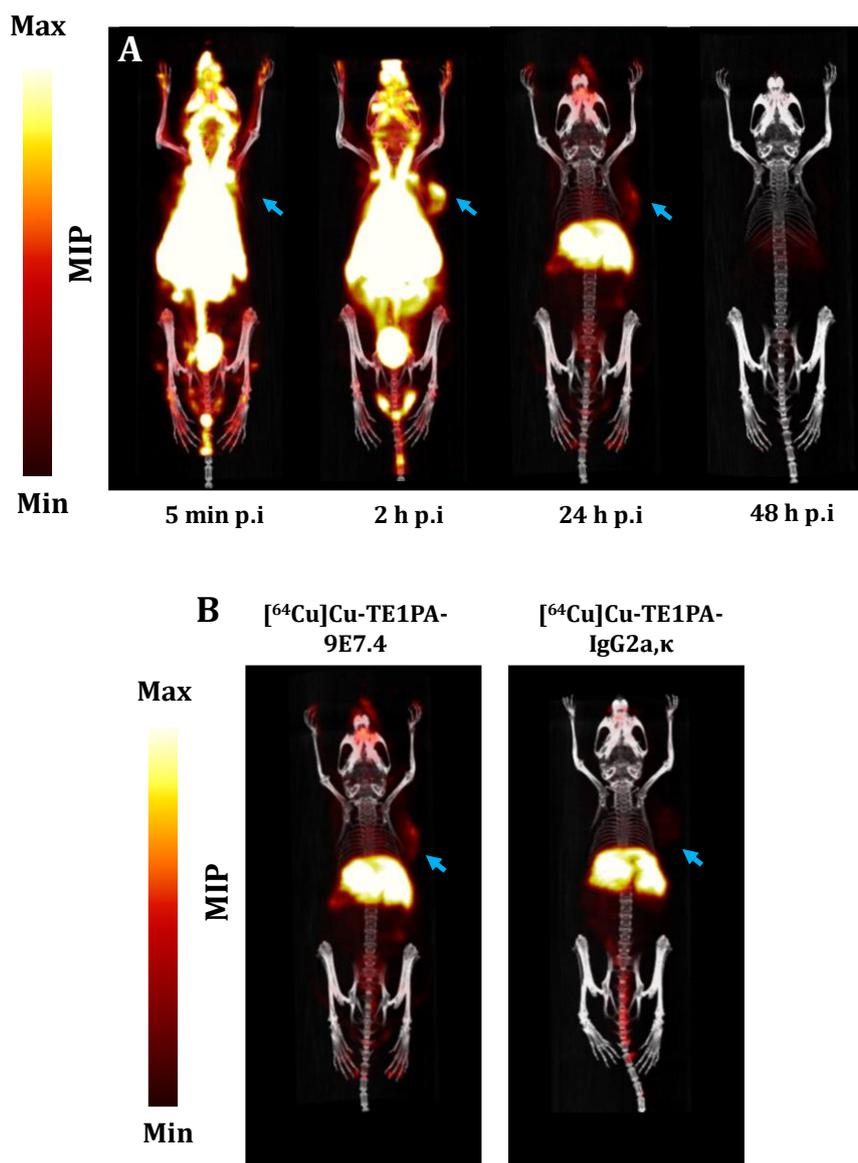


Figure 37. Suivi longitudinal par imagerie TEP-TDM de la biodistribution in vivo du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ et comparaison avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-IgG2a,}\kappa$

Le suivi longitudinal par imagerie TEP-TDM a été réalisé à partir de 11 jours après la greffe s.c des cellules tumorales 4T1, les souris ont été imagées 5 minutes, 2, 24, 48 et 72 h après l'injection du (A) $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ (6,9 MBq ; 25 μg de 9E7.4). (B) Imagerie TEP-TDM 24 h p.i du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ou du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-IgG2a,}\kappa$ (7,15 MBq ; 25 μg d'isotype IgG2a,κ). Les images TEP-TDM sont présentées en MIP. Les flèches bleues indiquent l'emplacement de la tumeur MOPC315.BM.

3. Expérimentation de la RIV utilisant le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans un modèle sous-cutané de CSTN

Dans ce modèle de tumeur solide greffée par voie s.c, les injections thérapeutiques dans nos trois cohortes ont été effectuées 6 jours après la greffe des cellules tumorales, lorsque les tumeurs étaient palpables. Comme pour le modèle s.c de MM, nous avons réalisé une RIV avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ en appliquant le protocole thérapeutique le plus efficace déterminé dans le modèle

orthotopique de MM. Les souris ont donc reçu par voie i.v dans la veine caudale de la queue, deux doses de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, à une activité de 35 MBq, à deux semaines d'intervalles. Les souris des deux cohortes contrôles ont quant à elles reçu deux injections de 35 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ ou de solution NaCl 0,9%. Le potentiel thérapeutique du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans ce modèle tumoral a été évalué par le suivi de la survie et de la croissance tumorale.

- Évaluation de la survie des souris et de la toxicité générale

Comme le montre la **Figure 38.A**, les souris traitées avec $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E.4}$ ou avec $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ présentent une amélioration équivalente et significative de la médiane de survie (29 et 27,5 jours respectivement) par rapport aux souris du groupe témoin qui ont reçu des injections de NaCl 0.9% (19,5 jours) ($p = 0,018$ et $p = 0,037$ respectivement). L'injection des différents traitements n'a entraîné aucune perte de poids significative des souris par rapport à leur poids initial.

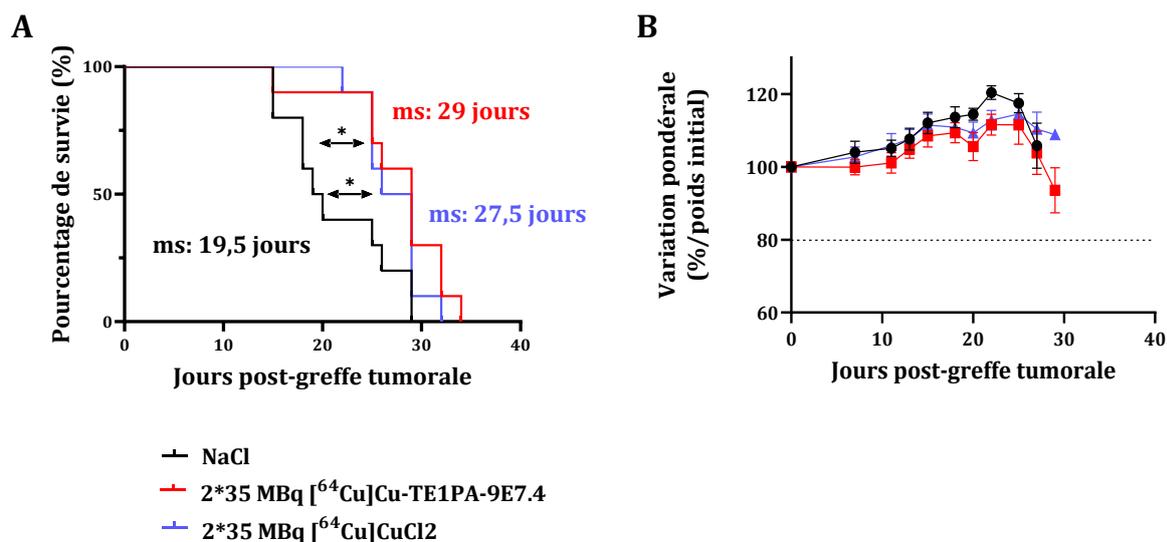


Figure 38. Suivi de la survie et de la variation pondérale après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle murin de CSTN

Six jours après la greffe tumorale s.c, les souris portant des tumeurs s.c 4T1 ont reçu deux doses thérapeutiques de 35 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ($n=10$), de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ ($n=10$), ou de NaCl 0,9% ($n=10$) à deux semaines d'intervalles. La survie est représentée par (A) les courbes de Kaplan-Meier (* $P < 0,04$, test Log-rank (Mantel-Cox)). Le suivi de la (B) variation du poids moyen pour chaque groupe est exprimé en % du poids initial, au-delà d'une perte de poids supérieure à 20% par rapport au poids initial, les souris étaient sacrifiées. Les flèches en pointillés représentent les temps d'injections des différents traitements.

Tableau 9. Activités globales injectées dans les différentes cohortes en activités injectées par gramme de souris (MBq/g) porteuses de tumeurs s.c 4T1

Cohortes	Activités injectées/g de souris (MBq/g)
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4} - 2 \times 35 \text{ MBq}$	$1,64 \pm 0,19$
$[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2 - 2 \times 35 \text{ MBq}$	$1,68 \pm 0,13$

Dans chaque cohorte, l'activité totale injectée par souris a été ramenée à son poids le jour de l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$. Les résultats sont présentés en MBq/g de souris \pm écart-type.

- Suivi par l'imagerie TEP-TDM des souris traitées

Au lendemain des injections thérapeutiques, les souris traitées avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ou avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ ont été imagées par TEP-TDM (**Figure 39**). Sept jours seulement après la greffe sous-cutanée des cellules tumorales 4T1, une fixation spécifique du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ est observée au niveau de la tumeur. Cette fixation spécifique est retrouvée 21 jours après la greffe tumorale avec la deuxième injection du traitement. Comme pour les imageries

diagnostiques présentées **Figure 37**, on retrouve un signal important dans le foie, et la fixation tumorale bien que spécifique est relativement faible. Pour les souris traitées avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$, les images TEP-TDM réalisées 24 heures après l'injection du radiotracer mettent en évidence un signal radioactif important au niveau hépatique. De plus, on observe chez ces souris un signal au niveau des intestins qui n'est pas visible sur les images des souris injectées avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$. Concernant la fixation du $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$, 7 jours après la greffe tumorale, aucun signal radioactif n'est observé au niveau de la tumeur. Toutefois, l'imagerie TEP-TDM réalisée 21 jours après la greffe tumorale met en évidence chez toutes les souris imagées une captation tumorale du $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ avec une intensité de signal équivalente au signal observé chez les souris traitées au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$.

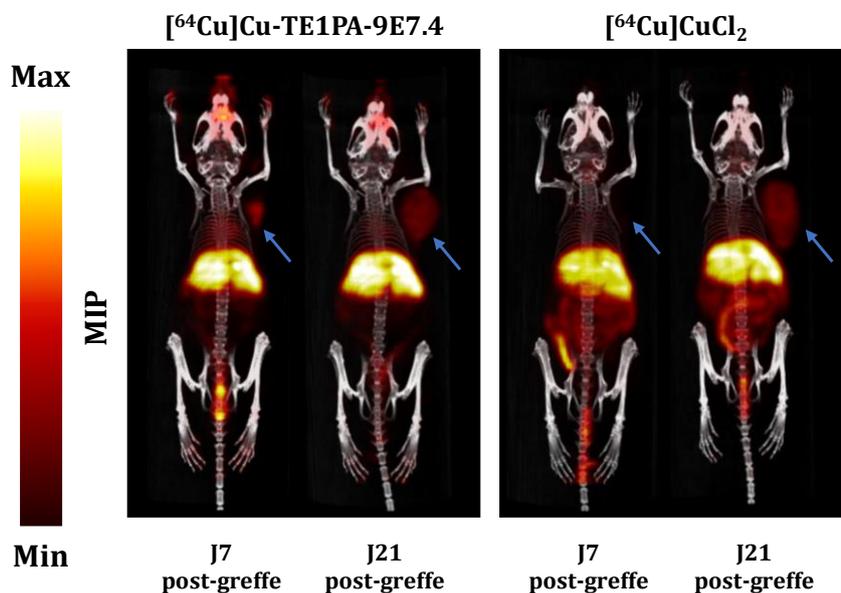


Figure 39. Imagerie TEP-TDM des souris traitées au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ et $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$

Suivi par imagerie TEP-TDM lors de la thérapie d'une même souris 24 h post-injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ou de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$, soit 7 jours ou 21 jours après la greffe des cellules 4T1 par voie sous-cutanée. Les images TEP-TDM sont présentées en MIP. Les flèches bleues indiquent l'emplacement des tumeurs 4T1.

- Évaluation de la croissance tumorale

Nous avons cherché à déterminer si l'augmentation des médianes de survie de ces deux cohortes s'accompagnait d'un ralentissement de la croissance tumorale (**Figure 40**).

Dans le groupe contrôle qui a reçu des injections de NaCl 0,9%, on observe une progression tumorale rapide et exponentielle dans le temps. À partir des courbes de croissance de chaque tumeur (**Figure 40.A**), nous avons pu calculer un temps de doublement in vivo des tumeurs de l'ordre de $2,83 \pm 0,62$ jours (**Figure 40.B**). Bien que la progression tumorale ait été rapide, une

seule souris de ce groupe a été sacrifiée lorsque le volume tumoral a atteint la limite de 2000 mm³. Toutes les autres souris ont été sacrifiées lorsque des signes de nécrose tumorale sont apparus. Un temps de doublement de $3,64 \pm 0,46$ jours a été calculé pour les tumeurs des souris traitées avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$. Ce temps de doublement n'est pas significativement différent de celui calculé pour le groupe contrôle ayant reçu des injections de NaCl 0,9%, l'injection du cuivre-64 non vectorisé n'a pas permis de ralentir significativement la croissance des tumeurs 4T1. Comme pour les souris contrôles du groupe injecté avec du NaCl 0,9%, toutes les souris ont été sacrifiées pour cause de nécrose, excepté une souris sacrifiée au motif d'un volume tumoral qui avait atteint la limite éthique. Un faible ralentissement du volume tumoral a été observé chez les souris traitées avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, avec un temps de doublement des tumeurs de $3,9 \pm 0,59$ jours significativement supérieur par rapport au groupe contrôle NaCl 0,9% ($p = 0,021$). Malgré ce ralentissement de la croissance tumorale, c'est pour des signes d'apparition de nécrose à la surface des tumeurs que l'ensemble de cette cohorte a été sacrifiée. Contrairement aux souris des autres cohortes, les souris qui ont été sacrifiées le plus tardivement présentaient aussi des signes de mal-être, elles étaient prostrées et avaient le museau froncé. Aussi, l'autopsie de ces souris a révélé la présence de métastases pulmonaires.

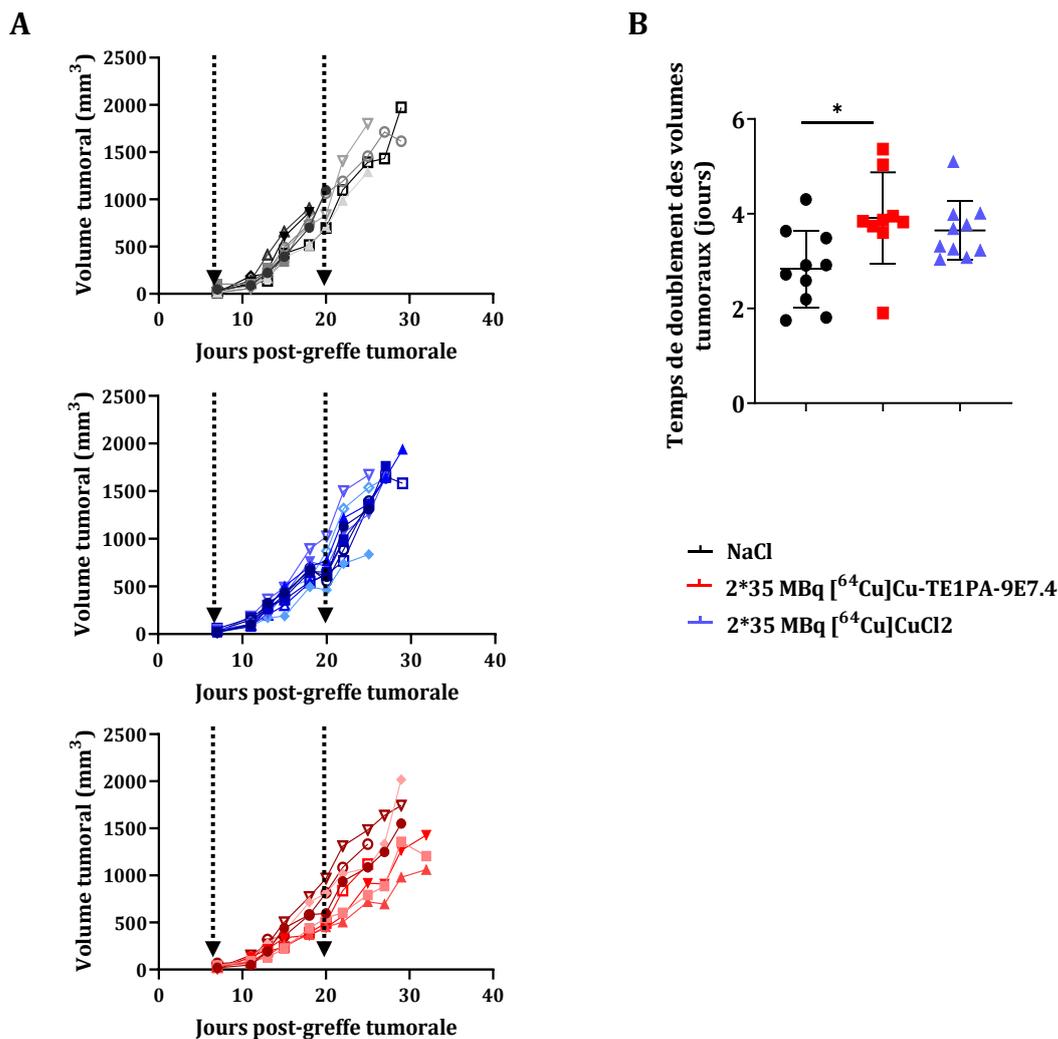


Figure 40. Suivi des volumes tumoraux après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle murin de CSTN

Six jours après la greffe tumorale s.c, les souris portant des tumeurs s.c 4T1 ont reçu deux doses thérapeutiques de 35 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ($n=10$), de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ ($n=10$), ou de NaCl 0,9% ($n=10$) à deux semaines d'intervalles. (A) Courbes de croissance tumorale pour les souris après la greffe tumorale, chaque courbe représente une souris. Le volume tumoral a été mesuré trois fois par semaine jusqu'à ce que des signes de nécrose tumorale apparaissent ou que le volume tumoral atteigne 2000 mm^3 . (B) Médiane des temps de doublement in vivo des 4T1 (Test ANOVA à 1 facteur et test de comparaisons multiples ; $*P=0,02$). Les flèches en pointillés représentent les temps d'injections des différents traitements.

- Évaluation de la toxicité hématologique

La toxicité hématologique a été évaluée par le suivi de l'hémogramme avant et pendant toute la durée de la thérapie. Ainsi, le nombre de globules blancs, de globules rouges et de plaquettes a d'abord été évalué avant la greffe s.c des cellules 4T1, puis toutes les semaines après la greffe (Figure 41).

Les souris du groupe contrôle injectées avec du NaCl 0,9% présentent une augmentation significative et progressive du nombre de globules blancs retrouvés dans leur sang. Cette augmentation n'a pas été observée dans les groupes traités avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ou le $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ (**Figure 41.A**). Aucune différence significative du nombre de globules rouges n'a été constatée entre les trois cohortes pendant le suivi des souris (**Figure 41.B**). Concernant le suivi des plaquettes au cours de l'étude, on a constaté que l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ou du $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ n'avait pas d'influence sur leur nombre. Cependant, 4 semaines après la greffe des cellules tumorales, une baisse significative des plaquettes dans ces deux cohortes a été observée par rapport au groupe qui a reçu des injections de NaCl 0,9%, soit plus d'une semaine après la deuxième injection du protocole thérapeutique (**Figure 41.C**).

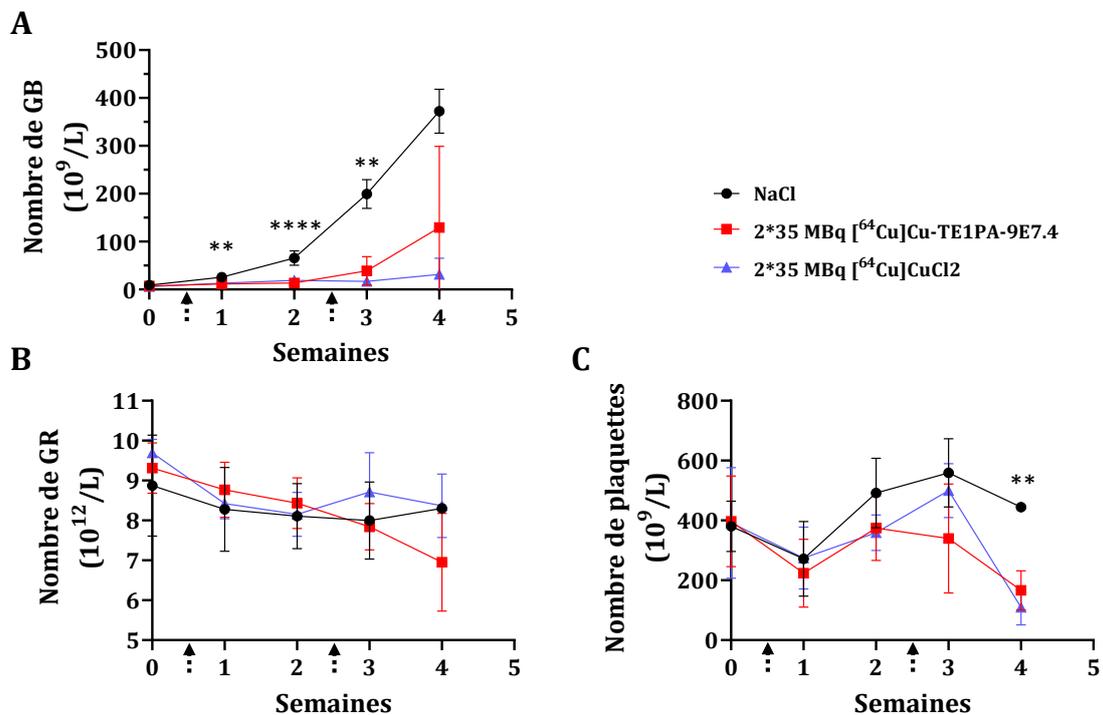


Figure 41. Suivi de la toxicité hématologique après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle murin de CSTN

La toxicité hématologique a été contrôlée par la numération hebdomadaire (A) des globules blancs, (B) des globules rouges (C) et des plaquettes après injection s.c des cellules 4T1 au-dessus de l'épaule (Analyse statistique avec un test ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples de Sidak, ** $P < 0,004$; **** $P < 0,0001$). Les flèches en pointillés représentent les temps d'injections des différents traitements.

- Évaluation de la toxicité hépatique et rénale

L'analyse des taux d'ALT au cours de l'étude n'a pas mis en évidence d'augmentation significative de ce biomarqueur qui reflète la toxicité hépatique (**Figure 42.A**). Une seule souris du groupe traité avec les injections de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ présentait un taux d'ALT important de 650 U/L au moment du sacrifice. Cette souris était la dernière de l'étude à avoir été sacrifiée (34 jours après la greffe tumorale). Concernant l'évaluation du fonctionnement rénale des souris au cours de l'étude, aucune différence significative des taux de créatinine et d'urée n'a été démontrée entre les différentes cohortes (**Figure 42.B.C**). Une diminution significative du taux d'urée dans les deux groupes contrôles a été mise en évidence au moment du sacrifice par rapport aux taux mesurés à T0 ($p = 0,037$) (**Figure 42.B**).

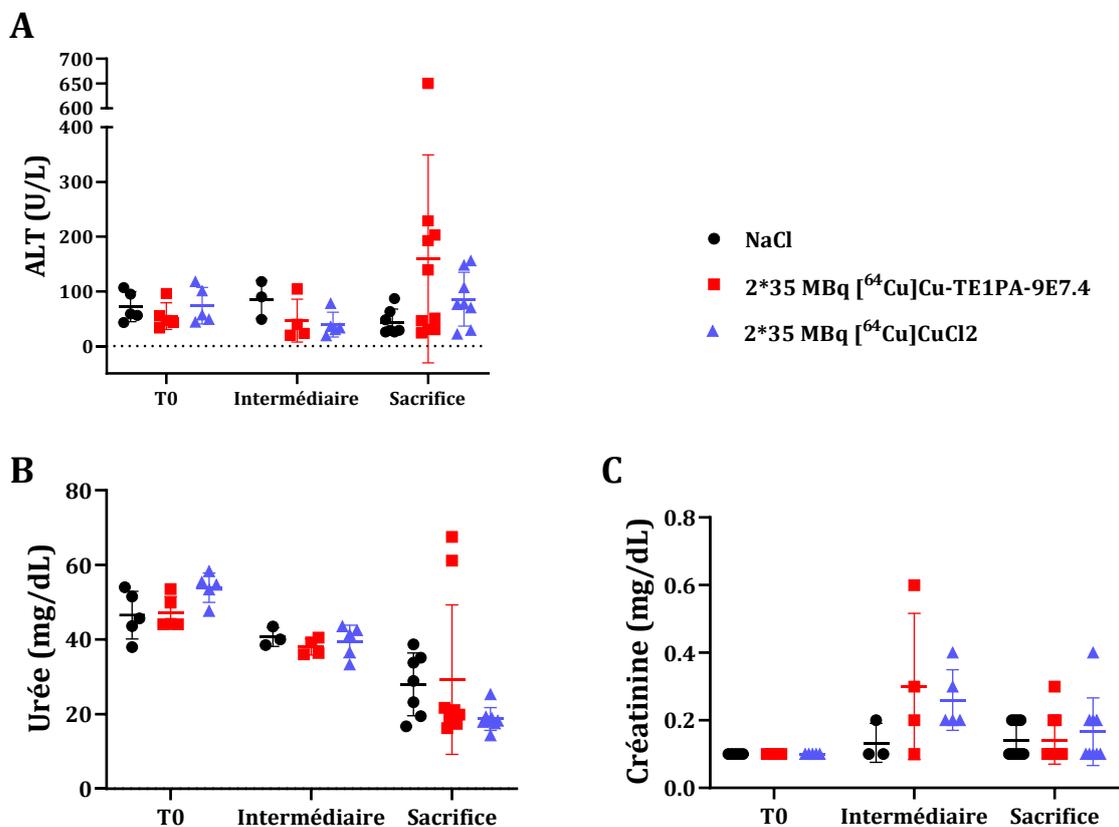


Figure 42. Suivi de la toxicité hépatique et rénale après thérapie au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle murin de CSTN

Les taux plasmatiques (A) d'ALT, (B) d'urée et (C) de créatinine ont été évalués avant la greffe de la tumeur (T0) et au moment du sacrifice. L'analyse statistique a été réalisée avec un test ANOVA à un facteur suivi de tests de comparaisons multiples de Sidak.

IV. Discussion

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'utilisation d'un anticorps anti-CD138 radiomarqué au cuivre-64, comme agent théranostique dans un modèle préclinique murin de myélome multiple, puis dans un modèle murin de cancer du sein triple négatif. Théoriquement, les propriétés de désintégration du cuivre-64 (β^+ 17,4 %, β^- 39,0 %) en font un radionucléide potentiel pour une utilisation théranostique (Gutfilen, Souza, et Valentini 2018). L'objectif de cette étude était d'apporter une preuve de concept du potentiel du cuivre-64 vectorisé dans une approche théranostique.

Afin de mener ces expérimentations, nous avons choisi de travailler sur un modèle murin syngénique de MM en étudiant le ciblage du protéoglycane transmembranaire CD138. Nous disposons au laboratoire de deux lignées cellulaires, qui présentent plusieurs avantages, la lignée 5T33 et la lignée MOPC315.BM. Ces deux lignées cellulaires sont implantables chez des souris immunocompétentes pour la mise en place de modèle syngénique murin de MM très agressifs, avec des caractéristiques similaires à la pathologie qui se développe chez l'humain (Paton-Hough, Chantry, et Lawson 2015). Elles sont notamment toutes les deux capables de par leur tropisme pour la moelle osseuse d'induire des lésions ostéolytiques (Manning et al. 1992; Hofgaard et al. 2012).

Pour mieux comprendre notre modèle d'étude, nous nous sommes d'abord intéressés à l'expression membranaire in vitro du CD138 sur ces deux lignées cellulaires. L'affinité de liaison de l'anticorps 9E7.4 sur la lignée cellulaire MOPC315.BM est comparable à celle mesurée pour les cellules 5T33 (Fichou et al. 2015), avec respectivement, $6,3 \times 10^{-10}$ M et $2,3 \times 10^{-10}$ M. Cependant, l'analyse comparative par cytométrie en flux de l'expression de l'antigène CD138 entre les deux lignées, a révélé une expression plus homogène et plus importante du CD138 par la lignée cellulaire MOPC315.BM.

Sur l'appui de nos résultats, nous avons choisi de travailler sur la lignée cellulaire MOPC315.BM pour la suite de l'étude. La caractérisation de la lignée MOPC315.BM a été complétée avec l'étude de la fixation cellulaire du radioimmunoconjugué, le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$. Les résultats obtenus nous ont permis de démontrer la spécificité de reconnaissance du radioimmunoconjugué pour l'antigène CD138 avec le déplacement de la liaison par l'anticorps natif ajouté en excès.

Dans la continuité des travaux de thèse de Anne-Sophie Navarro (Navarro et al. 2019), nous avons fait le choix de travailler avec l'anticorps 9E7.4 radiomarqué au cuivre-64 à l'aide du chélate TE1PA dont la stabilité in vivo avec le cuivre-64 est meilleure que celle du DOTA et/ou du NOTA. La stabilité du radioimmunoconjugué composé du chélate TE1PA réduit significativement le phénomène de transchélation à l'origine d'un relargage du cuivre-64 sous sa forme libre dans

l'organisme où il sera pris en charge par les métalloprotéines impliquées dans le transport du cuivre. Ce phénomène de transchélation est plus important pour les radioimmunoconjugués composés du chélate DOTA ou NOTA, et entraîne une redistribution du cuivre-64 libre dans le sang, les poumons et le cœur (Navarro et al. 2019).

Le radiomarquage du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ (Navarro et al. 2019) permet d'obtenir un radioimmunoconjugué d'une pureté de 98% qui ne nécessite pas de purification supplémentaire. Après radiomarquage, l'immunoréactivité calculée avec 1 pmol de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ n'est pas différente de l'immunoréactivité calculée avec 1 pmol de $[^{125}\text{I}]\text{I-9E7.4}$ lors de la qualification des billes magnétiques utilisées pour l'expérimentation (**Annexe 2**). Ce résultat nous indique que le couplage des chélates TE1PA sur l'anticorps 9E7.4 n'entraîne pas de diminution significative de son immunoréactivité pour l'antigène CD138.

Une fois préparé, le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ a été évalué dans des modèles murins de MM et de CSTN pour l'imagerie TEP in vivo et la biodistribution ex vivo. Les résultats obtenus ont validé notre modèle d'étude syngénique de MM et ont permis de définir les meilleures conditions pour étudier le potentiel thérapeutique du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$. Les trois modèles animaux utilisés dans le cadre de ces travaux de thèse ont été choisis pour leur complexité progressive. Le premier modèle orthotopique MOPC315.BM présentait l'intérêt d'induire des lésions tumorales diffuses de petite taille et plus accessibles au radioimmunoconjugué circulant qui fixent de façon importante et homogène le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$. Le modèle MOPC315.BM hétérotopique se caractérise par une tumeur localisée, de plus grande taille et moins accessible pour le radioimmunoconjugué, mais toujours capable de le capter de façon homogène et importante. Pour le troisième modèle, nous avons évalué le potentiel thérapeutique du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans un modèle de tumeur solide de cancer du sein triple négatif 4T1 qui forme des tumeurs de taille importante et qui présente une expression hétérogène de la cible CD138.

Avec la première lignée cellulaire MOPC315.BM, nous avons démontré dans nos études que le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ se liait efficacement aux cellules tumorales qui expriment le CD138, qu'elles soient disséminées dans l'organisme, sous forme de petites masses tumorales facilement accessibles ou de masses de taille plus importante et moins accessible. De plus, les résultats de l'imagerie TEP-TDM dans le modèle orthotopique nous ont permis de conforter le choix de lignée cellulaire en mettant en évidence la dissémination tumorale essentiellement dans la moelle osseuse, mais aussi dans des foyers extramédullaires, comme dans le foie (**Figure 28**), ce qui valide la simulation de la maladie chez l'humain. Dans ce modèle, on observe une fixation importante et homogène du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ aux sites tumoraux, une condition favorable pour la mise en place d'une RIV dans un modèle où les tumeurs sont facilement accessibles au radioimmunoconjugué.

Avec ce modèle, les contrastes d'imagerie TEP ont été excellents 24 heures après l'injection du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, avec de très bons rapports tumeur/ bruits de fond. Au même temps d'analyse et en accord avec les images TEP obtenues, nos études de biodistribution ex vivo ont démontré que la fixation tumorale du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 était 2,4 fois supérieure dans notre modèle MOPC315.BM, par rapport au modèle 5T33, avec respectivement $32,27 \pm 5,75$ %DI/g et $13,60 \pm 5,40$ %DI/g (Navarro et al. 2019). Ces études nous indiquent que cette différence de signal tumoral semble s'expliquer par la seule différence d'expression de la cible CD138 observée lors des études de caractérisation des deux lignées. De plus, les images TEP que nous avons réalisées dans les modèles MOPC315.BM et 4T1 montrent une répartition similaire du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans les organes et tissus sains. Cela nous indique que la biodisponibilité du radioimmunoconjugué est la même et que sa fixation sur la tumeur ne dépend que de son expression de la cible antigénique.

Indépendamment de la fixation tumorale, une fixation importante du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 est observée dans le foie, et comme pour la tumeur, cette fixation est stable dans le temps jusqu'à 48 h p.i. La fixation au foie dans ce modèle MOPC315.BM est comparable à celle retrouvée dans le modèle 5T33 avec le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, $10,40 \pm 2,09$ %DI/g et $12,00 \pm 1,00$ %DI/g respectivement (Navarro et al. 2019). L'expression du CD138 par les hépatocytes qui composent le parenchyme hépatique peut expliquer cette hyperfixation (Regós et al. 2020; Meyerholz et al. 2022). Dans l'ensemble des autres tissus et organes, la clairance du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 est rapide, notamment dans le compartiment vasculaire, et permet d'identifier les foyers tumoraux dès 2 h après l'injection puis avec un bon contraste tumeurs/organes à 24 h. La qualité du contraste est aussi due à l'énergie maximale relativement faible des positons émis par le cuivre-64. Cette propriété réduit ainsi le parcours dans la matière des positons avant leur annihilation, ce qui limite la diffusion du signal TEP.

L'étude dosimétrique réalisée à partir des résultats de biodistribution ex vivo confirme les résultats observés en imagerie TEP et nous a permis de mettre en place les différents protocoles thérapeutiques présentés dans ces travaux. Selon les calculs dosimétriques, le foie est l'organe critique en termes de toxicité, nous avons donc prêté une attention particulière aux signes de toxicité dans cet organe pendant nos études thérapeutiques en dosant les transaminases AST et ALT.

Les résultats obtenus dans notre étude thérapeutique sur le modèle orthotopique de MM avec la lignée MOPC315.BM ont démontré un effet anti-tumoral du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 puisque son administration a permis d'augmenter significativement la survie des souris dans plusieurs cohortes. L'efficacité observée est bien due au cuivre-64 vectorisé par l'anticorps 9E7.4 puisque ce dernier, seul et utilisé à la même dose (100 µg), n'a pas permis d'augmenter la survie des souris.

D'autre part, on a également pu montrer que le cuivre-64 non vectorisé ($[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$) n'avait qu'un effet très limité sur la survie. Cet effet thérapeutique est cependant plus marqué dans le modèle sous-cutané 4T1. L'efficacité potentielle du $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ comme agent thérapeutique repose sur les besoins en cuivre des cellules tumorales. Dans une étude préclinique sur des modèles de mélanome, la surexpression du transporteur du cuivre Ctr1 par les cellules tumorales a permis d'utiliser efficacement le $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ comme agent théranostique pour imager les tumeurs et augmenter significativement la survie des souris traitées en ralentissant la prolifération des cellules tumorales (Qin et al. 2014).

Dans notre étude, la dose limite de toxicité du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans le modèle orthotopique n'a pas été atteinte malgré l'importance des activités injectées. Seule une toxicité cutanée, localisée au niveau du point d'injection sur la queue a pu être observée chez quelques souris qui avaient reçu les activités les plus importantes. L'escalade d'activité administrée, réalisée avec une injection unique de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ a démontré que l'activité de 55 MBq est la plus efficace pour améliorer la survie des souris, sans pour autant entraîner de guérison. Dans les travaux antérieurs de notre équipe, des résultats similaires avaient été obtenus dans le modèle 5T33 de MM avec une activité de 18,5 MBq de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-9E7.4}$ (Fichou et al. 2015). Une étude préclinique récente a comparé l'efficacité thérapeutique du cuivre-64 et du lutetium-177 dans le traitement d'un modèle de cancer de la prostate (Milot et al. 2023). Les résultats ont montré que l'injection unique de 150 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTAH}_2\text{-PSMA}$ ou de 120 MBq de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ augmentait significativement la médiane de survie des souris par rapport aux souris du groupe témoin de façon similaire et sans induire de toxicité importante.

L'efficacité thérapeutique démontrée dans notre étude s'accompagne d'une toxicité hématologique modérée et transitoire qui touche les globules blancs et les plaquettes. Dans le modèle hétérotopique MOPC315.BM, la toxicité plaquettaire n'est pas observée. Elle semble indiquer une toxicité induite au niveau des précurseurs plaquettaires présents dans la MO où se trouvent aussi les cellules tumorales ciblées par le traitement dans le modèle orthotopique. Aussi, chez les souris témoins, on observe dans ce modèle MOPC315.BM une diminution progressive des plaquettes au cours du temps qui semble indiquer une toxicité induite par l'évolution de la maladie. Dans le modèle 4T1, la toxicité induite par le traitement sur les globules blancs n'est pas visible, puisqu'on observe en parallèle, notamment chez les souris témoins, une très forte augmentation de leur nombre, et plus précisément du sous-type neutrophile, avec l'évolution de la maladie. Dans le cancer du sein, l'augmentation du taux de neutrophiles circulants, qui vont s'accumuler dans les poumons, est associée au phénomène métastatique pulmonaire (Wculek et Malanchi 2015). Dans notre modèle nous retrouvons ce phénomène, nous avons pu observer au

moment du sacrifice chez plusieurs de nos souris greffées au moins trois semaines auparavant, traitées ou non, des métastases pulmonaires.

Au-delà d'une activité de 55 MBq en dose unique, le traitement n'est plus aussi efficace. Une absence d'efficacité thérapeutique a été mise en évidence pour les souris traitées avec 65 MBq qui ont développé des signes de paralysie. Contrairement à ce que l'on observe dans les autres cohortes, les souris qui ont reçu une activité de 65 MBq présentaient au moment du sacrifice, une augmentation significative du taux d'ALT qui traduit une toxicité hépatique. Comme pour les autres cohortes la toxicité sur le nombre de globules blancs et de plaquettes est transitoire, quoique relativement plus importante et plus lente à revenir à des taux physiologiques. Il est aussi important de noter que dans ce groupe 65 MBq, une souris qui présentait des signes de toxicité aiguë a dû être sacrifiée très tôt après une perte de poids rapide et importante. Ces résultats semblent indiquer que l'efficacité thérapeutique de 65 MBq est limitée par la toxicité que cette activité induit. Encore une fois, des résultats équivalents ont été observés avec l'injection de 27,75 MBq de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-9E7.4 (Fichou et al. 2015). Dans ces deux cas, les résultats semblent indiquer une toxicité délétère au foie et la moelle osseuse. Cette toxicité hépatique et médullaire induite par les émetteurs bêta a également été constatée en clinique. Notamment avec le [¹⁷⁷Lu]Lu-J591 dans le traitement du cancer métastatique de la prostate à l'origine d'une toxicité médullaire chez les patients qui conduit à limiter la dose administrée (Bander et al. 2005).

En médecine nucléaire, les protocoles thérapeutiques de RIV délivrent le traitement par fraction afin de préserver au mieux les tissus sains et de potentialiser son efficacité (DeNardo et al. 2002). Dans un essai clinique de phase I pour le traitement du cancer métastatique de la prostate, le fractionnement de dose du [¹⁷⁷Lu]Lu-J591 a permis d'augmenter la dose tolérée par les patients tout en réduisant l'aplasie médullaire induite par le traitement (Tagawa et al. 2010). C'est pourquoi nous avons donc cherché à évaluer l'intérêt d'une répétition de deux doses thérapeutiques du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans notre modèle préclinique orthotopique. Le suivi de la toxicité hématologique lors de l'escalade de dose nous a permis d'identifier le NADIR des éléments figurés du sang les plus impactés par le traitement, les globules blancs et les plaquettes, qui est atteint une semaine après l'injection du traitement. Nous avons choisi d'espacer nos deux injections thérapeutiques de deux semaines pour permettre aux souris de récupérer des effets de la première dose avant de traiter à nouveau. Ce protocole a ensuite été utilisé dans les deux autres modèles murins de tumeurs sous-cutanées.

Dans le modèle orthotopique, nos résultats ont démontré l'intérêt de la répétition de dose du traitement. Bien que notre étude ait été réalisée sur de petites cohortes, les répétitions de traitement avec 35 MBq (n=6) ou 55 MBq (n=6) de [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 ont amélioré significativement la survie des souris par rapport aux souris témoins. L'administration répétée de

35 MBq de [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 a entraîné la survie de deux souris, soit d'environ 30% de la cohorte, qui n'ont présenté aucun signe de toxicité jusqu'à la fin de l'étude. Chez ces deux souris, les taux d'AST mesurés au moment du sacrifice étaient équivalents à ceux des souris avant la greffe tumorale, en parallèle, nous avons pu observer que ces taux augmentaient chez les souris malades, que ce soit des souris témoins ou traitées. L'évolution de ce taux de transaminase n'a pas pu être évaluée régulièrement au cours de l'étude, mais il semble qu'il soit prédictif de l'évolution de la maladie, et qu'il puisse servir de facteur pronostique. Des études cliniques ont déjà pu mettre en évidence des anomalies hépatiques chez les patients atteints de MM qui augmentent les taux d'AST (Poudel et al. 2012). Une autre étude suggère que des taux élevés d'AST chez les patients sont associés à un mauvais pronostic vital (Kiba et al. 2014). De plus, l'agressivité et la robustesse du modèle MOPC315.BM, pour lequel il a été démontré qu'avec seulement 1000 cellules injectées chez la souris 100% des individus développaient une paraplégie en 3 à 4 semaines (Hofgaard et al. 2012), nous permet d'appuyer l'efficacité de notre traitement sur ces souris guéries qui auraient inévitablement développé les signes de la maladie si elles n'avaient pas été traitées.

La répétition de la dose avec une activité de 55 MBq n'a pas permis d'améliorer la réponse thérapeutique induite par une dose unique de 55 MBq. Comme pour la cohorte traitée avec 65 MBq, au moment du sacrifice, des taux d'ALT semblent indiquer une toxicité hépatique qui contrebalance l'efficacité thérapeutique. L'injection d'une troisième dose aurait très certainement pu améliorer davantage la survie des souris, tout en évitant d'être toxique au niveau du foie ou du sang. Cela a été démontré dans cette étude préclinique sur un modèle de xénogreffe de mélanome chez la souris (Rbah-Vidal et al. 2017), dans lequel l'injection de 3 doses de 25 MBq d'une petite molécule ciblant la mélanine exprimée par les cellules tumorales, radiomarquée à l'iode-131 a permis de ralentir encore plus la prolifération tumorale en passant d'un temps de doublement de $17,75 \pm 0,45$ jours avec 2 doses de 25 MBq à $26,46 \pm 7,85$ jours. Toutefois, la disponibilité des sources de cuivre-64 nous a contraint à garder ce rythme dans l'ensemble de nos protocoles expérimentaux et d'autres schémas posologiques incluant un délai plus court entre les injections ou encore une augmentation du nombre d'injections n'ont pas pu être envisageables dans le cadre de cette thèse. Dans nos conditions expérimentales, nous avons démontré le potentiel théranostique du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 avec des propriétés thérapeutiques comparables, voire plus efficaces à celles du lutetium-177 dans le modèle 5T33 (Fichou et al. 2015).

Néanmoins, dans le cadre d'études précliniques sur les émetteurs alpha et le modèle 5T33 de MM murin, il a été montré que l'administration de 3,7 MBq de [²¹³Bi]Bi-DTPA-9E7.4 ou 740 kBq de [²¹¹At]At-9E7.4 a guéri respectivement 60 et 65% des souris sans toxicité majeure (Chérel et al. 2013; Gouard et al. 2020). Cette différence d'efficacité observée entre les RIV- α et les RIV- β dans le MM peut s'expliquer par les caractéristiques des rayonnements α émis plus adaptés pour les

cancers hématologiques. Pour expliquer ces résultats, il faut aussi prendre en compte la différence du facteur de pondération permettant de calculer la dose équivalente à partir des doses absorbées qui est de 20 pour les émetteurs α et de 1 pour les émetteurs β et γ ([International Commission on Radiological Protection 2003](#)). Ainsi, pour être aussi, voire plus efficace des activités bien moins importantes peuvent être administrées. Cela a notamment été démontré en clinique dans le cas du traitement du cancer de la prostate métastatique résistant à la castration ([Kratochwil et al. 2016](#)). Chez un patient réfractaire au traitement par le $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ (2 cycles de 7,4 GBq), une efficacité thérapeutique a été obtenue avec 3 cycles de $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac-PSMA-617}$ à 6,4 MBq.

Malgré tout, les émetteurs bêta restent intéressants, car ils sont plus facilement disponibles, de plus à un moindre coût, et leur efficacité thérapeutique est avérée. Ainsi, après l'étude dosimétrique d'un anticorps anti-CD138 radiomarqué à l'iode-131 sur des patients atteints de MM réfractaires aux traitements de première ligne, la thérapie mise en place s'est montrée efficace chez un patient dont la maladie a pu être stabilisée pendant 1 an ([Rousseau et al. 2012](#)). Les propriétés des émetteurs bêta pourraient présenter un avantage notamment dans des stades plus avancés de la maladie avec des lésions tumorales plus grandes dans lesquelles le parcours des émetteurs bêta aurait un intérêt. Toutefois, nos résultats montrent que dans ce cas, l'efficacité thérapeutique va dépendre de l'accessibilité de la tumeur à l'anticorps, mais surtout de l'expression par les cellules tumorales de la cible antigénique. En effet, avec le modèle 4T1, nous n'avons pas pu montrer, dans les conditions expérimentales utilisées, que notre anticorps radiomarqué était aussi efficace. Les différences d'efficacité entre le modèle sous-cutané de myélome et celui de cancer du sein triple négatif sont très certainement dues aux différences d'expression de l'antigène par les cellules. Ces différences ont été mises en évidence *in vitro*, mais elles semblent être encore plus accentuées *in vivo*.

L'ensemble de nos données dans ce premier modèle orthotopique atteste du potentiel thérapeutique du cuivre-64 vectorisé avec un anticorps anti-CD138 dans le traitement d'un MM murin.

Dans le prolongement de la première étude du potentiel théranostique du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, l'idée était d'évaluer son potentiel thérapeutique sur des lésions tumorales plus grandes et moins accessibles, les cellules MOPC315.BM ont donc été injectées par voie s.c en utilisant la même souche de souris, les BALB/cJrj. Ce modèle présentait aussi l'avantage de pouvoir directement mesurer l'impact du traitement sur la masse tumorale et évaluer un éventuel effet anti-tumoral. Dans ce modèle hétérotopique, l'administration du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ a entraîné un effet anti-tumoral. Un ralentissement suivi d'une régression des volumes tumoraux a été observé, et cela a permis de retarder la prolifération tumorale d'une vingtaine de jours et d'améliorer significativement la survie des souris. En parallèle, bien qu'il faille prendre en compte

le petit nombre d'animaux dans cette cohorte (n = 3), l'administration du $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ a échoué à ralentir la progression tumorale et augmenter la survie des souris par rapport groupe témoin. Cette absence d'effet bénéfique peut s'expliquer par le manque d'accessibilité des cellules tumorales, puisque par opposition, dans le modèle orthotopique où les lésions tumorales sont plus accessibles et plus proches du secteur vasculaire, bien que peu efficace en comparaison du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, le $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ a permis d'augmenter significativement la survie des animaux.

Avec l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, mais aussi du $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$, une baisse modérée et transitoire des globules blancs est observée. Une étude préclinique évaluant le potentiel thérapeutique du cuivre-64 sur une masse tumorale primaire a obtenu des résultats similaires dans un modèle de cancer pancréatique chez le rat avec un peptide analogue de la somatostatine (Lewis et al. 1999). La répétition d'injection de 3 doses (3 x 740 MBq) à deux jours d'intervalle a permis de stopper la prolifération tumorale pendant une dizaine de jours durant lesquels les tumeurs n'étaient pas palpables, avant que celle-ci ne reprenne. Contrairement à ce que nous avons observé dans notre étude, une reprise de la prolifération des masses tumorales a été mesurée chez tous les rats de leur cohorte. Dans notre étude, la reprise d'une prolifération tumorale n'a pas été observée chez deux souris, dont l'une des deux a été guérie. Dans une autre étude préclinique (Boyle et al. 2020), l'utilisation d'un anticorps anti-EGFR radiomarqué au cuivre-64 pour le traitement d'un cancer pancréatique humain n'a permis ni de ralentir la croissance tumorale, ni d'améliorer la survie des souris. Bien que dans cette étude des répétitions de doses aient été administrées par voie i.p aux souris toutes les deux semaines, la plus importante activité utilisée (12,95 MBq) était deux fois moins importante que les 35 MBq que nous avons injecté dans notre étude ce qui pourrait expliquer l'inefficacité de cette RIV.

De façon intéressante, contrairement aux souris témoins, les souris traitées avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ont été sacrifiées lorsque des signes de paralysie des membres inférieurs sont apparus. Avec l'augmentation de la survie induite par le traitement, les cellules de la tumeur primitive qui ont un fort tropisme pour la moelle osseuse ont probablement eu le temps d'y migrer. Cette observation appuie encore les résultats de guérison obtenus dans le modèle orthotopique. En effet, même s'il restait une faible quantité de cellules au niveau de la moelle osseuse après traitement, la maladie aurait dû rapidement se développer à nouveau, compte tenu du caractère très invasif de cette lignée tumorale.

Dans le modèle de tumeur murine solide 4T1, bien que l'administration répétée de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ ait permis d'allonger d'une dizaine de jours la survie des animaux, les expérimentations thérapeutiques n'ont pas donné des résultats aussi efficaces que dans la modèle de MM orthotopique ou hétérotopique. De plus, la vectorisation du cuivre-64 par l'anticorps anti-

CD138 n'apporte pas d'avantage thérapeutique supérieur au $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ sur la survie des animaux. On a pu observer avec les images TEP-TDM réalisées 24 h après l'injection de la première dose de traitement que sur des tumeurs d'une taille moyenne de $29,23 \pm 14,03 \text{ mm}^3$, qu'il n'y avait aucune captation du $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ par la tumeur. Mais, sur les images TEP-TDM réalisées après la deuxième injection thérapeutique, une captation tumorale équivalente du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ et du $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ sur des tumeurs de tailles plus importantes ($619,95 \pm 167,42 \text{ mm}^3$) a été mise en évidence. Comme cela a été évoqué précédemment, certaines cellules peuvent présenter des besoins en cuivre beaucoup plus importants. Une étude a en effet démontré une expression d'un niveau non négligeable du transporteur du cuivre Ctr1 in vitro pour la lignée cellulaire 4T1 (Qin et al. 2014) qui pourrait expliquer le signal obtenu en imagerie TEP au niveau de la tumeur. Il serait ainsi intéressant de quantifier cette expression pour confirmer cette hypothèse.

Contrairement aux modèles précédents, aucun effet curatif n'a été observé dans les groupes traités. Malgré tout, l'injection du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ contrairement au $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ a permis de ralentir la croissance tumorale par rapport aux souris témoins ($T_d=2,8 \pm 0,6$ jours) avec un temps de doublement du volume tumoral significativement plus long, avec respectivement un T_d de $3,9 \pm 0,6$ jours et $3,64 \pm 0,5$ jours ($p = 0,015$). L'ensemble des souris a été sacrifié pour des signes apparents de nécrose tumorale dans ce modèle hautement agressif (Tao et al. 2008).

La différence d'expression de la cible CD138, en comparaison à la lignée cellulaire MOPC315.BM, retrouvée dans l'étude in vitro par cytométrie en flux se confirme dans les résultats d'imagerie TEP-TDM diagnostique et peut expliquer les différences de résultats observés en thérapie. Bien que la fixation de l'anticorps 9E7.4 à la surface des cellules 4T1 soit spécifique, comme le démontrent nos expérimentations utilisant l'isotype IgG2a, celle-ci n'est pas suffisante pour permettre une fixation importante du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$. Cette fixation est nécessaire à l'obtention d'images diagnostiques contrastées, mais aussi pour délivrer une dose thérapeutique au niveau de la tumeur susceptible d'être efficace. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser l'étude dosimétrique du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans ce modèle afin de confirmer cette hypothèse et d'évaluer la possibilité d'augmenter les activités administrées pour que les doses absorbées au niveau de la tumeur soient équivalentes aux doses qui ont eu un effet thérapeutique dans le modèle de MM. Cependant, les images TEP-TDM réalisées montrent un rapport tumeur/foie qui ne semble pas favorable à la mise en place d'une RIV au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ dans ce modèle.

Un autre aspect à prendre en compte dans la comparaison de l'efficacité du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ entre nos deux lignées cellulaires est la sensibilité des cellules tumorales à l'irradiation. En effet, des études ont montré que le CSTN était la forme de cancer du sein la moins radiosensible. La voie ERK1/2 activée par le récepteur EGFR présent sur les cellules tumorales est impliquée dans cette

radiorésistance (Sambade et al. 2010). L'irradiation du récepteur EGFR va activer cette voie de signalisation impliquée dans la survie cellulaire notamment par la production de protéines anti-apoptotiques (Ouellette, Zhou, et Yan 2022). La forte expression du récepteur EGFR par la lignée cellulaire 4T1 (Das et al. 2012) pourrait aussi expliquer le manque d'efficacité de notre traitement.

Toutefois, malgré les résultats que nous avons obtenus, l'intérêt de cibler le syndécan-1 pour traiter le CSTN avec une RIV- β a été établi dans un modèle de xénogreffe chez la souris (Rousseau et al. 2011). Dans cette étude, bien que l'expression de la cible CD138 dans la lignée humaine de CSTN MDA-MB-468 soit faible, de bons résultats thérapeutiques ont été obtenus avec un anticorps anti-CD138 radiomarqués à l'iode-131. Dans ce contexte, l'avantage de l'iode-131 sur le cuivre-64 peut notamment s'expliquer, en plus de par son émission β^- exclusive, par sa demi-vie plus longue (8,02 jours) qui permet une irradiation plus longue et donc plus importante.

Bien que les résultats que nous avons obtenus dans notre modèle de cancer du sein triple négatif soient moins efficaces que dans nos deux autres modèles, nous n'en observons pas moins une efficacité thérapeutique. Dans une étude récente, une thérapie innovante combinant un agent alkylant et une radiothérapie interne vectorisée par le radiomarquage au cuivre-64 de platine terpyridinique a été évaluée dans un modèle murin agressif de cancer colorectal (Khosravifarsani et al. 2022). L'administration de 137 MBq ou de 70 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NOTA-C3-TP}$ a permis d'augmenter respectivement la médiane de survie des souris de 8 et 6 jours par rapport au groupe contrôle sans induire de toxicité apparente. Si l'on compare ces résultats aux nôtres, avec l'administration d'une activité équivalente et même inférieure, notre radioimmunoconjugué a permis d'augmenter la médiane de survie de 9,5 jours par rapport au groupe contrôle, ce qui est prometteur. D'autre part, cette étude met aussi en avant l'intérêt de la combinaison thérapeutique pour potentialiser l'efficacité de la RIV au cuivre-64 ou du traitement associé. Dans cette étude, la thérapie au platine terpyridinique seul ne permet pas d'augmenter significativement la médiane de survie des animaux contrairement au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NOTA-platine terpyridinique}$. Dans une autre étude, l'intérêt de la combinaison thérapeutique avec une RIV au cuivre-64 ($[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NOTA-panitumumab}$) dans un modèle de cancer pancréatique a aussi été mis en évidence (Boyle et al. 2020). Pour potentialiser l'effet thérapeutique des rayonnements du cuivre-64 qui induisent des cassures de l'ADN des cellules tumorales, un traitement empêchant la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN a été administré ainsi qu'un immunosuppresseur. Ainsi, la combinaison thérapeutique a permis de doubler la médiane de survie des souris par rapport à celle des souris non traitées qu'avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NOTA-panitumumab}$. Ces études nous ouvrent des perspectives de travail pour améliorer la survie des souris dans nos modèles thérapeutiques en associant notre RIV au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ à un autre traitement, par exemple une chimiothérapie ou une immunothérapie.

Enfin, il faut prendre en compte que l'ensemble des études réalisées nous permettront aussi de préparer la mise en place des études thérapeutiques avec le $[^{67}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ chez des souris préalablement diagnostiquées par imagerie TEP avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, qui permettra aussi de réaliser le suivi de l'évolution de la maladie. Une étude préclinique récente a utilisé le potentiel théranostique de la paire de radioisotopes cuivre-64/cuivre-67 associés à un anticorps anti-A33 dans un modèle de cancer colorectal (Keinänen et al. 2020). Ils ont démontré dans cette étude une corrélation entre les réponses thérapeutiques des souris traitées au $[^{67}\text{Cu}]\text{Cu-MeCOSar-Tz}$ et la captation du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-MeCOSar-Tz}$ dans la tumeur déterminée à partir des images TEP. Chez les souris ayant parfaitement répondu au traitement une quantification du signal TEP au centre de la tumeur avait mis en évidence une captation supérieure à 9kBq, un échappement tumoral a été observé chez toutes les souris dont la captation tumorale du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-MeCOSar-Tz}$ était inférieure à cette valeur. Cette étude a aussi mis en avant l'intérêt de la technique de préciblage, l'anticorps anti-A33 a été injecté 72 heures avant que l'un des deux radionucléides ne soit injecté pour réaliser une image TEP ou la radiothérapie. Ce principe pourrait aussi être intéressant dans notre modèle, puisqu'il permet de s'affranchir du long temps de circulation des radioimmunoconjugués à base d'anticorps à l'origine de débit de dose de rayonnement important aux tissus non spécifiques.

La première utilisation clinique de la paire théranostique cuivre-64/cuivre-67 a été effectuée récemment (Bailey et al. 2022). Dans cette étude réalisée sur des patients atteints d'un méningiome multifocal non opérable, l'expression des récepteurs de la somatostatine par les cellules tumorales a permis de réaliser l'imagerie TEP diagnostiques au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$ pour sélectionner les patients susceptibles de répondre à la thérapie au $[^{67}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$. Cette sélection s'appuie sur les images comparatives en TEP avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$ et en TEMP avec le $[^{67}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$ qui confirment un ciblage tumoral et une biodistribution dans les autres organes quasiment identiques entre les deux radioligands, ce qui rend l'utilisation de cette paire théranostique très intéressante.

V. Conclusion

Dans cette première partie de mon travail de thèse, nous avons d'abord pu démontrer la spécificité et la sensibilité de l'anticorps monoclonal 9E7.4 radiomarqué au cuivre-64 à l'aide du chélate TE1PA pour détecter les cellules tumorales qui expriment le CD138 dans notre modèle murin syngénique de MM. Cette performance de détection associée au cuivre-64 pour l'imagerie TEP a permis au $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ de réaliser des images TEP diagnostiques avec un excellent contraste. L'estimation dosimétrique réalisée à partir des données de biodistribution ex vivo, a révélé des valeurs de dose délivrées acceptables au niveau des organes sains, et une dose

délivrée au niveau de la tumeur très encourageante pour une utilisation en RIV. Avec des activités élevées, le traitement a montré une efficacité thérapeutique entraînant un retard de la croissance tumorale et une augmentation de la survie sans induire de toxicité majeure ou irréversible. Ces résultats prometteurs ont aussi démontré que les injections répétées de [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 sont sûres et efficaces dans ce modèle préclinique syngénique de MM, et ouvrent la voie à une évaluation théranostique plus poussée des thérapies à base de cuivre-64 évaluant différents schémas curatifs incluant des intervalles de traitement plus courts ou des cycles d'administration plus importante. Dans le modèle préclinique de CSTN, la différence d'expression de la cible CD138 a diminué l'efficacité du traitement sans pour autant le rendre inefficace. Ainsi, la mise en place d'une combinaison thérapeutique avec une immunothérapie ou une chimiothérapie pour potentialiser l'effet thérapeutique du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 est à envisager dans ce modèle.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de recherche ont confirmé le potentiel théranostique du cuivre-64 vectorisé par l'anticorps 9E7.4 dans nos deux modèles animaux de myélome multiple et offrent des perspectives intéressantes dans des modèles tumoraux plus complexes.

Partie III :
Évaluation diagnostique d'un
anticorps anti-CXCR4
radiomarqué au cuivre-64

I. Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

Pour cette étude diagnostique du MM par ciblage du récepteur CXCR4, nous avons utilisé trois lignées humaines de MM : la lignée MM.1S, la lignée OPM-2 et la lignée U266.B1 disponibles au laboratoire. Les trois lignées ont été cultivées dans un milieu de culture RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) complémenté de 2 mM de L-Glutamine, de 100 U/mL de pénicilline, de 100 µg/mL de streptomycine et 10 % de SVF décomplémenté (CVFSVF00-01, Eurobio Scientific). Les lignées OPM-2 et U266.B1 sont des lignées de cellules en suspension. La lignée MM.1S présente une population de cellules adhérentes et des cellules en suspension. Les temps de doublement sont relativement longs avec un Td d'environ 40 heures pour les lignées MM.1S et U266.B1 et d'environ 55 heures pour la lignée OPM-2.

2. Modèles précliniques

L'autorisation du projet d'expérimentation animale (APAFIS #6145 pour les études de ciblage) a été délivrée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, après avis favorable du comité d'éthique pour l'expérimentation animale (CEEA) local de Pays de Loire (CEEA-06). Les études précliniques ont été réalisées sur des souris femelles immunodéprimées issues de deux souches différentes. Des souris C.B-17/IcrHan@Hsd-Prkdcscid achetées auprès du fournisseur Envigo (Sain-Bel, France), et des souris NSG issues de l'élevage de l'animalerie UTE (SFR Bonamy, IRS-UN, Université de Nantes, numéro d'agrément C44278).

Pour l'ensemble des lignées cellulaires utilisées, 5×10^6 de cellules, diluées au demi avec du Matrigel™ (Corning, Fischer Scientific) afin d'améliorer la prise de greffe, ont été injectées par voie s.c au niveau de l'épaule des souris dans un volume total de 100 µL. Le temps de pousse tumorale étant assez long, les expérimentations in vivo ont été initiées au minimum 3 semaines après la greffe des cellules tumorales.

3. Production de l'anticorps 12G5

L'anticorps 12G5, une IgG2a,κ, a été produit à partir de l'hybridome 12G5 (fournie par le Professeur Emmanuel Garcion, Inserm U1307, CRCI²NA). Après décongélation de l'hybridome, les cellules ont été cultivées et amplifiées en milieu RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies), complémenté de 2 mM de L-Glutamine (Gibco, Life Technologies), de 100 U/mL de pénicilline, de 100 µg/mL de streptomycine (Gibco, Life Technologies) et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (CVFSVF00-01, Eurobio Scientific). Les cellules ont été repiquées 3 fois par semaine, jusqu'à l'obtention d'une quantité nécessaire de 230 millions de cellules pour la production de l'anticorps. Une fois l'amplification terminée, les cellules ont été placées dans un erlenmeyer de 1 L stérile et ventilé (SPL life Sciences) à raison de 2×10^5 cellules/mL dans un

volume maximum de 200 mL de milieu de production composé de RPMI 1640 additionné de 2 mM de L-Glutamine, de 100 U/mL de pénicilline, de 100 µg/mL de streptomycine et de 10 % de SVF décomplémenté Ultra-Low IgG (Gibco, Life Technologies). Les cellules ont ensuite été incubées dans un système bioréacteur à 37°C sous agitation à 90 rpm, avec 5% de CO₂ et 95% d'humidité. Pendant 1 semaine, un suivi de l'avancée de la production a été effectué en réalisant tous les deux jours, des comptages cellulaires sur cellules de Malassez avec de l'éosine (0,15%) afin de calculer le taux de mortalité. A 80% de mortalité, l'incubation a été stoppée et les surnageants de culture ont été récupérés après une centrifugation à 4000 rpm pendant 20 minutes. Les surnageants ont par la suite été filtrés sous vide à deux reprises. La première filtration a été effectuée sur des filtres à membrane en acétate de cellulose de 1,2 µm (Whatman™, Dutscher) puis la deuxième filtration sur des cocottes de 250 mL filtrant à 0.22 µm (Corning, Fischer Scientific). La purification de l'anticorps à partir des surnageants, a été réalisée par la plateforme de production de protéines recombinantes (P2R) de la Structure Fédérative de Recherche (SFR) François Bonamy (François Bonamy IRS-UN, Université de Nantes).

La purification de l'anticorps 12G5 a été réalisée à partir du surnageant à 4°C par chromatographie, sur une colonne HiTrap prot G HP 5 ml et a ensuite été contrôlé par chromatographie d'exclusion (gel filtration) (Cytiva, Dutscher).

4. Cytométrie en flux

L'évaluation de l'expression de la cible CXCR4 avec l'anticorps 12G5 par cytométrie en flux a été réalisée sur nos trois lignées cellulaires à partir de cellules cultivées in vitro, mais aussi à partir des tumeurs primitives prélevées sur des souris. Le protocole de cytométrie en flux pour évaluer l'expression de la cible CXCR4 par les lignées cellulaires humaines de MM avec l'anticorps 12G5 est similaire à celui décrit dans la Partie II. Ce protocole a été soumis à plusieurs changements pendant cette thèse, ces mises au point ont été nécessaires dans le cadre spécifique de l'étude du récepteur CXCR4. En effet notre premier protocole ne permettait pas de mettre en évidence des expressions du récepteur dans les lignées cellulaires qui concordait avec les données de la littérature. Les informations nécessaires à l'optimisation du protocole de cytométrie en flux nous ont été fournies par le Professeur Margret Schottelius (CHUV Lausanne, Suisse).

Après prélèvement, les tumeurs ont été dissociées de façon mécanique sur un filtre 70 µm (ClearLine) afin de récupérer les cellules. Après centrifugation de la suspension cellulaire à 1500 rpm pendant 5 minutes, les globules rouges du culot cellulaire ont été lysés en présence d'un tampon à base de chlorure d'ammonium (Bd Biosciences) pendant 3 minutes à 37°C. Puis, un

excès de milieu de culture complet a été ajouté sur le culot cellulaire afin de stopper la réaction de lyse cellulaire.

Pour chaque type de cellule (in vitro ou ex vivo), et après numération sur cellule de Malassez, 500 000 cellules en tampon PBS/SVF 10% ont été incubées avec l'anticorps 12G5 pendant 45 minutes sur glace. Une gamme de concentration de l'AcM 12G5 de 4 à 0,25 µg/mL (dilution au ½) a été déposée sur les cellules afin d'évaluer son affinité. Après deux lavages en tampon PBS/SVF 10% à 4°C, la fixation de l'anticorps 12G5 a été révélée à l'aide d'un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris et couplé à la phycoérythrine (PE) (Jacksonimmunosearch 115-116-068). La spécificité de la fixation de l'AcM 12G5 a été contrôlée avec un isotype de souris IgG2a, k-PE (Invitrogen). Après une deuxième incubation de 45 minutes sur glace et deux lavages cellulaires, les cellules ont été reprises avec un marqueur de viabilité cellulaire fixable, le Zombie NIR™ (Biolegend) selon le protocole du fournisseur. Les cellules ont ensuite été analysées au FACS Canto II™ avec le logiciel Diva (BD Biosciences) et le logiciel FlowJo™ (version 10.6.1, BD Sciences).

5. Microscopie confocale

L'expression de la cible CXCR4 par nos lignées d'intérêts a aussi été évaluée par microscopie confocale. Cette étude a été réalisée sur les cellules récupérées à partir de tumeurs primitives prélevées sur nos souris. Les expérimentations ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus pour la cytométrie en flux. Le marquage au 12G5 a été effectué sur 5×10^5 cellules avec 4 µg/ml d'anticorps pendant une incubation sur glace à 4°C de 45 minutes. Après deux lavages en tampon PBS/SVF 10%, la fixation de l'anticorps 12G5 a été révélée avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris (Jacksonimmunosearch), couplé à la FITC (laser 488 nm) sur une deuxième incubation de 45 minutes à 4°C. Un marquage cellulaire a aussi été effectué avec un isotype contrôle de souris anti-IgG2a,κ couplé à la FITC (BD Biosciences). Les cellules ont ensuite été fixées et les noyaux cellulaires colorés avec du Hoescht (laser 405 nm) dilué à 12,5 µg/mL dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 10 minutes à 4°C. Après fixation, les cellules ont été reprises en milieu de montage Prolong-Gold (ThermoFischer) puis montées entre lame et lamelle.

La lecture des lames au microscope confocale a été réalisée par la plateforme MicroPicell (SFR François Bonamy, IRS-UN, Université de Nantes) sur un microscope confocal (Nikon A1 RSi, Nikon).

6. Fonctionnalisation avec le chélate TE1PA et radiomarquage de l'anticorps 12G5 au cuivre-64

La fonctionnalisation et le radiomarquage de l'anticorps 12G5 ont été réalisés dans les mêmes conditions que pour l'anticorps 9E7.4 décrites dans la section « Matériel et Méthodes » de la Partie II.

7. Imagerie TEP-TDM

Pour évaluer le potentiel diagnostique du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-12G5}$, nous avons réalisé des images TEP/TDM sur nos souris greffées en s.c avec les lignées cellulaires MM.1S, OPM-2 et U266.B1. Les souris ont reçu une injection de 10 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-12G5}$ (25 μg d'anticorps) par voie i.v dans la veine caudale latérale, puis ont été imagées à 24h et 48 h p.i. Les conditions d'acquisition des images réalisées avec l'imageur IRIS PET/CT (Iris, Inviscan) sont les mêmes que celles décrites dans la section « Matériel et méthodes : Imagerie par tomographie par émission de positons » de la Partie II.

II. Résultats

1. Contrôle analytique de l'anticorps 12G5 anti-CXCR4 humain produit

Après avoir produit l'anticorps monoclonal 12G5 qui sera utilisé pour l'ensemble des études de ciblage du CXCR4, nous avons fait purifier et contrôler l'anticorps par la plateforme P2R (SFR François Bonamy IRS-UN, Université de Nantes). La solution d'AcM 12G5 a été analysée à l'aide d'un système HPLC (**Figure 43**). Le chromatographe obtenu présente un pic unique à un volume de rétention dans la colonne de 13,16 mL correspondant au volume attendu pour un anticorps. Le pic unique et l'absence d'agrégats attestent de la pureté et de l'intégrité de l'anticorps 12G5.

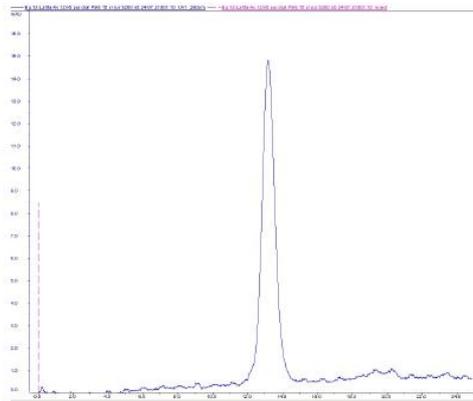


Figure 43. Chromatogramme HPLC de l'AcM 12G5 après purification et dialyse

Après purification de l'AcM 12G5 produit à l'aide d'une Colonne HiTrap protein G HP 5 ml, le contrôle qualitatif de l'anticorps a été réalisé en HPLC avec l'injection de 15 μ L d'anticorps (qsp 200 μ L de PBS) à un débit de 0,5 mL/min (Akta Purifier GE Healthcare, colonne S200 n°5 10/300 GE).

2. Caractérisation de l'expression membranaire du récepteur CXCR4 par des lignées cellulaires humaines du MM cultivées in vitro

Dans un premier temps, nous avons caractérisé in vitro par cytométrie en flux, l'expression membranaire du récepteur CXCR4 par nos trois lignées cellulaires d'intérêt, les cellules OPM-2, les MM.1S et les U266.B1 (**Figure 44**). Pour cela, des concentrations croissantes de l'anticorps 12G5 anti-CXCR4 humain ont été déposées sur les cellules avant que celui-ci ne soit révélé par un anticorps secondaire couplé à la PE. La stratégie d'analyse des cellules est détaillée dans la **Figure 44.A**.

Dans chacune des trois lignées cellulaires, les résultats démontrent une expression de la cible CXCR4 qui se traduit par la fixation spécifique de l'anticorps 12G5. Cette expression est hétérogène pour les trois lignées comme le démontre la largeur des histogrammes représentant l'intensité de fluorescence de la PE qui traduit l'expression du CXCR4.

En effet, on observe pour les cellules OPM-2 et MM.1S, une expression membranaire de CXCR4 hétérogène et relativement faible. Les cellules U266.B1 expriment aussi le CXCR4 de façon hétérogène, mais de façon beaucoup plus importante (**Figure 44.B**).

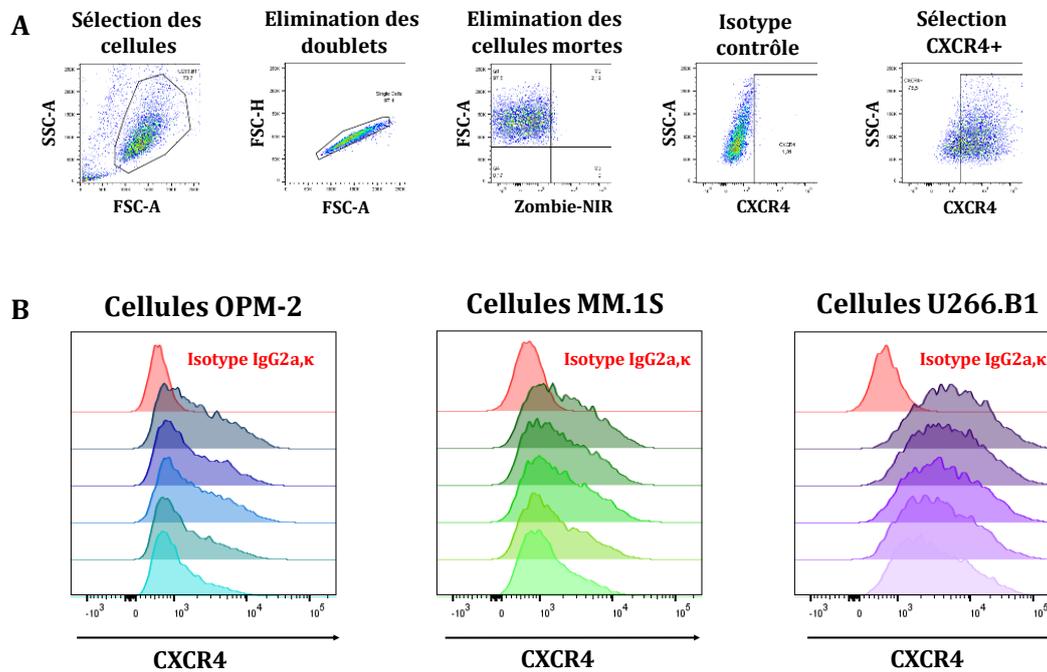


Figure 44. Caractérisation par cytométrie en flux de l'expression membranaire du CXCR4 par les différentes lignées cellulaires humaines de MM

(A) Méthode de tri et d'analyse des cellules par cytométrie en flux. (B) Histogrammes de l'expression du CXCR4 par les cellules OPM-2 (bleu), MM.1S (vert) et U266.B1 (violet), le marquage des cellules a été réalisé avec une gamme de concentration de l'anticorps 12G5 de 4 µg/mL à 0,25 µg/mL dont la fixation membranaire a été révélée avec un anticorps secondaire couplé à la PE. La spécificité de ciblage a été contrôlée avec un isotype de souris IgG2aκ conjugué au PE (rouge).

Cette étude de cytométrie nous a aussi permis de caractériser l'affinité de l'anticorps 12G5, que nous avons produit, pour le récepteur CXCR4. À partir des médianes de fluorescences du fluorochrome PE en fonction de la concentration de l'anticorps (en M), les courbes de saturation des récepteurs CXCR4 ont pu être représentées (**Figure 45**). Comme avec l'anticorps 9E7.4, les données ont été ajustées, selon une équation de liaison spécifique à l'aide d'une régression non linéaire sur GraphPad Prism (version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA). Cette analyse a évalué une affinité nanomolaire de l'anticorps pour sa cible CXCR4, avec une valeur de K_d de 3,157 ± 0,51 nM. La représentation de ces courbes de saturation nous a également permis de calculer les valeurs B_{max} pour chacune des lignées cellulaires, qui représentent le nombre de sites de fixation pour l'anticorps présent à leur surface et donc la capacité de fixation

de l'anticorps. La lignée cellulaire U266.B1 montre une capacité de fixation de l'anticorps 12G5 presque 4 fois supérieure aux lignées OPM-2 et MM.1S.

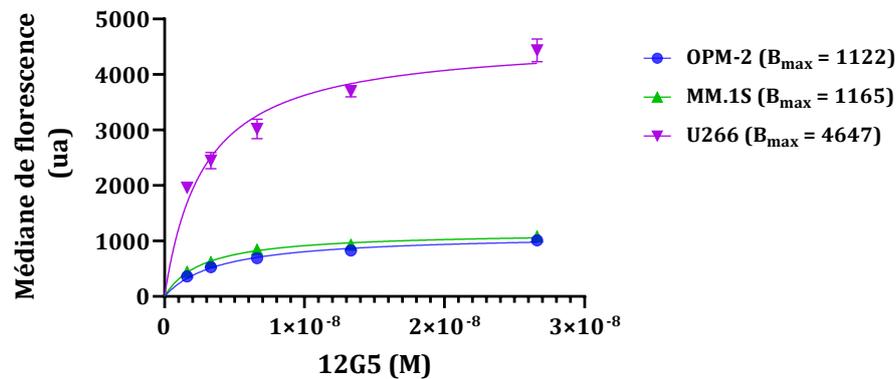


Figure 45. Caractérisation par cytométrie en flux de l'affinité de l'anticorps 12G5 pour la cible CXCR4 par nos différentes lignées cellulaires humaines de MM

Courbes des médianes de fluorescence issues des résultats de cytométrie en flux (Figure 40.B) exprimant la saturation des récepteurs CXCR4 dans chaque lignée cellulaire par des concentrations croissantes d'anticorps 12G5. L'analyse de l'affinité de l'anticorps a été effectuée sur le logiciel GraphPad Prism (version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA) avec une courbe de régression non linéaire (« One site - Specific binding »). Les barres d'erreurs représentent l'écart type des médianes de fluorescence.

En parallèle des études par cytométrie en flux, nous avons aussi analysé l'expression membranaire du CXCR4 par les lignées cellulaires en microscopie confocale (Figure 46). Cette technique, bien que moins sensible que la cytométrie en flux, nous a permis de visualiser l'expression membranaire du CXCR4 sous forme de cluster par la lignée cellulaire U266.B1. En revanche, l'expression du CXCR4 par les lignées MM.1S et OPM-2 n'a pas pu être démontrée avec cette technique d'analyse dans nos conditions.

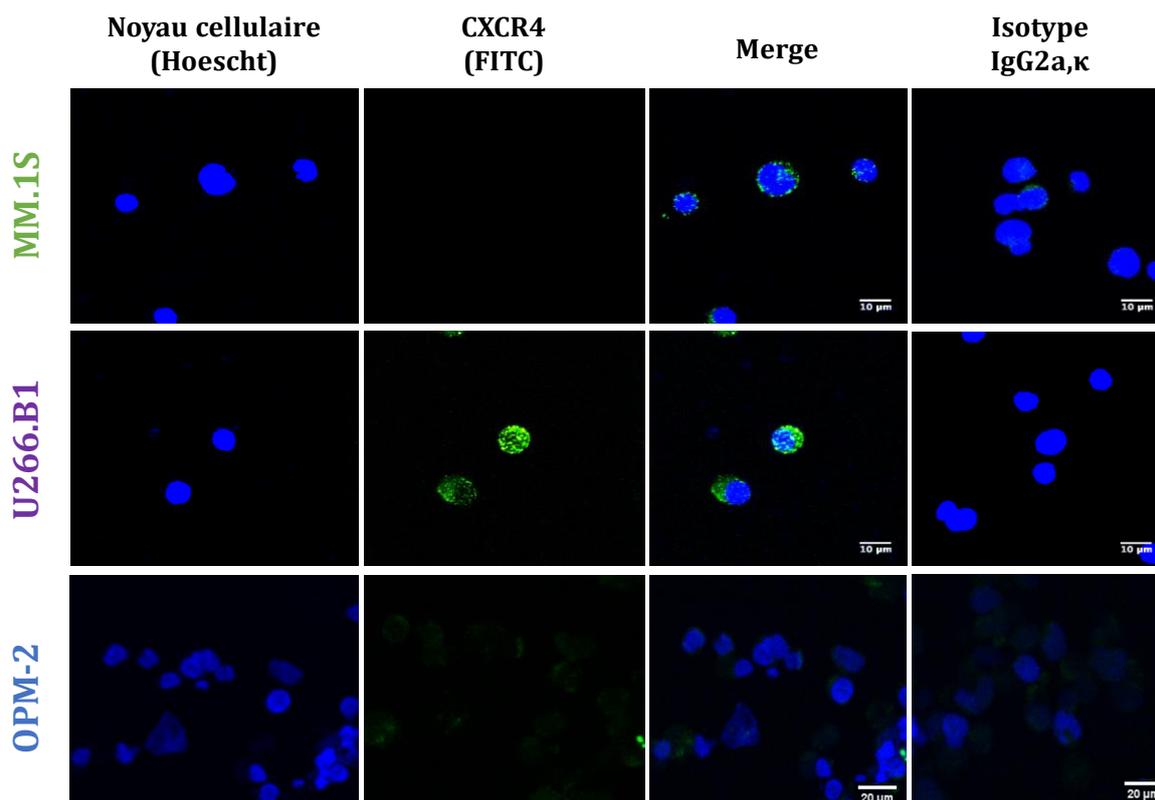


Figure 46. Étude de l'expression membranaire du CXCR4 par nos lignées cellulaires humaines de MM par microscopie confocale

Images de microscopie confocale (Nikon A1 RSi) des différentes lignées cellulaires MM, les noyaux cellulaires ont été marqués au colorant Hoescht (en bleu) et le récepteur CXCR4 avec l'anticorps 12G5 révélé avec un anticorps secondaire couplé au FITC (en vert). Un marquage avec l'isotype contrôle de souris anti-IgG2a, κ couplé à la FITC a également été réalisé (images de droite).

3. Caractérisation de l'expression membranaire du récepteur CXCR4 par les lignées cellulaires humaines de MM à partir des tumeurs greffées aux souris NSG

Nous avons également évalué le profil d'expression de la cible CXCR4 dans les trois lignées cellulaires après que celles-ci aient été greffées sur des souris immunodéprimées NSG. 3 à 4 semaines après la greffe tumorale, les cellules ont été isolées à partir des tumeurs et analysées par cytométrie en flux de la même façon que les cellules cultivées in vitro. Les résultats présentés dans la **Figure 47** démontrent des profils d'expression très différents de ceux observés avec les cellules cultivées in vitro. On retrouve une expression du récepteur CXCR4 à la surface des cellules de chaque lignée, cette expression est beaucoup plus hétérogène que pour les cellules cultivées in vitro, notamment pour la lignée OPM-2 (**Figure 47.A**). Dans ces conditions de prolifération cellulaire, on retrouve une expression plus importante du récepteur CXCR4 par la lignée cellulaire OPM-2. Pour les cellules MM.1S récupérées à partir de tumeurs, l'expression du CXCR4 révélée avec l'anticorps 12G5 est plus importante que dans les cellules cultivées in vitro (**Figure 44.B**).

Alors que pour les cellules U266.B1, l'expression du récepteur est moins importante, que ce soit en comparaison des lignées OPM-2 et MM.1S comme nous l'indiquent les courbes de saturation (Figure 47.B), mais aussi en comparaison des cellules U266.B1 cultivées in vitro (Figure 44.B et 45).

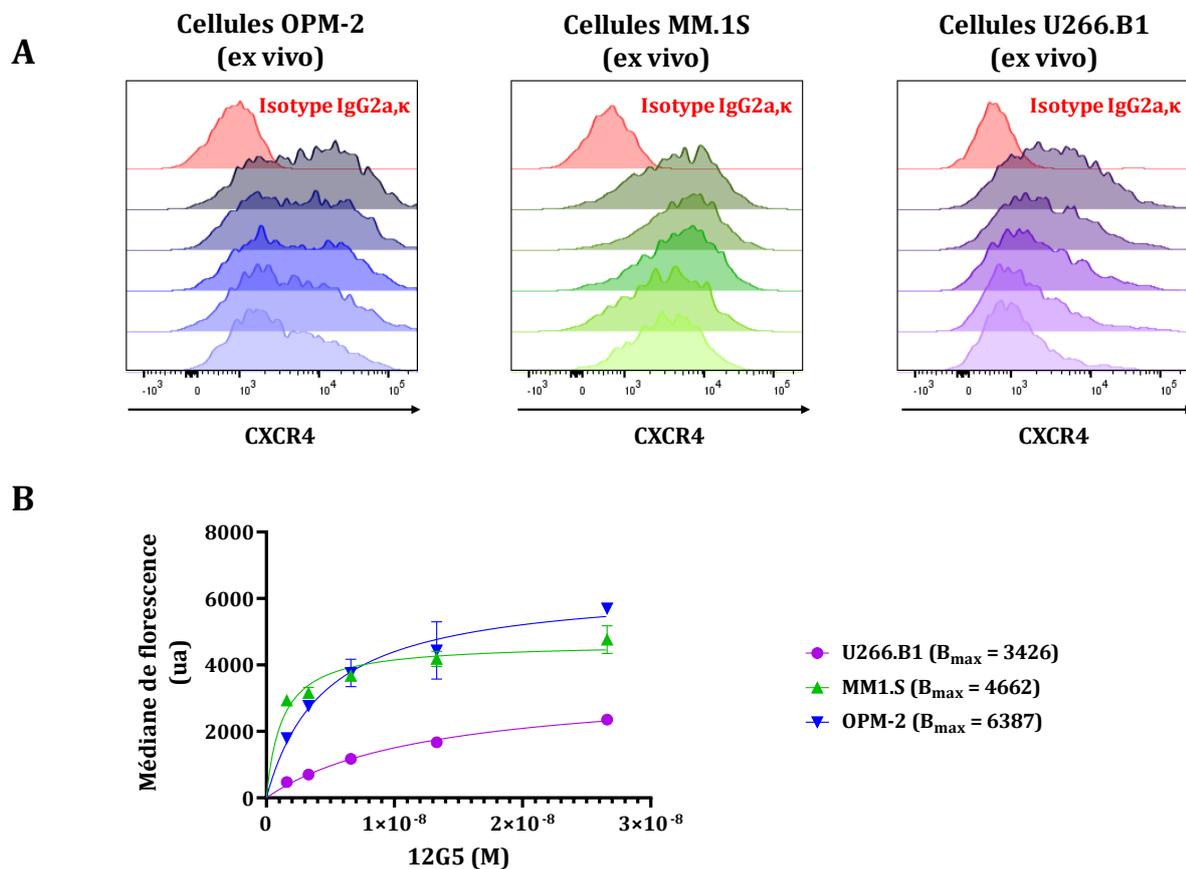


Figure 47. Caractérisation par cytométrie en flux de l'expression membranaire du CXCR4 par les différentes lignées cellulaires humaines de MM à partir des tumeurs ex vivo

(A) Histogrammes de l'expression du CXCR4 par la lignée OPM-2 (bleu), MM.1S (vert) et U266.B1 (violet), réalisés par cytométrie en flux à partir des cellules récupérées de tumeurs sous-cutanées greffées sur des souris NSG. Le marquage des cellules a été réalisé avec une gamme de concentration de l'anticorps 12G5 de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dont la fixation membranaire a été révélée avec un anticorps secondaire couplé à la PE. La spécificité de ciblage a été contrôlée avec un isotype de souris IgG2a κ conjugué au PE (rouge). (B) Courbes des médianes de fluorescence issues des résultats de cytométrie en flux. L'analyse de l'affinité de l'anticorps a été effectuée sur le logiciel GraphPad Prism (version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA) avec une courbe de régression non linéaire (« One site - Specific binding »). Les barres d'erreurs représentent l'écart type des médianes de fluorescence.

4. Imagerie TEP-TDM du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-12G5

La biodistribution du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-12G5 chez des souris NSG portant des tumeurs sous-cutanées OPM-2, U266.B1 ou MM.1S a été évaluée par imagerie TEP-TDM 3 à 5 semaines après la greffe des cellules tumorales. 24 heures après l'injection par voie i.v du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-12G5, toutes les souris imagées présentaient un signal radioactif important au niveau du foie, de la rate et des épiphyses gléno-humérales et fémorales (**Figure 48**). On observe aussi une fixation plus modérée dans le tractus digestif chez toutes les souris. L'ensemble des souris porteuses d'une tumeur s.c OPM-2 présentaient une hyperfixation supérieure au bruit de fond, mais aussi supérieure au signal observé dans le foie et la rate (**Figure 48.A**). La visualisation des tumeurs OPM-2 en coupe axiale démontre l'hétérogénéité de cette fixation, il n'y a pas de captation du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-12G5 au centre de la tumeur. Les souris porteuses de tumeurs U266.B1 présentent une fixation tumorale très hétérogène, avec des points d'hyperfixation très localisés et un signal périphérique plus faible (**Figure 48.B**). Comme pour les tumeurs OPM-2, il n'y a pas de captation du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-12G5 au centre des tumeurs U266.B1. Pour les tumeurs MM.1S, on observe un signal plus faible que pour les deux autres lignées tumorales, mais toujours supérieur au bruit de fond. La fixation de l'anticorps a été retrouvée en périphérie tumorale comme nous le montrent les coupes axiales et frontales au niveau de la tumeur (**Figure 48.C**).

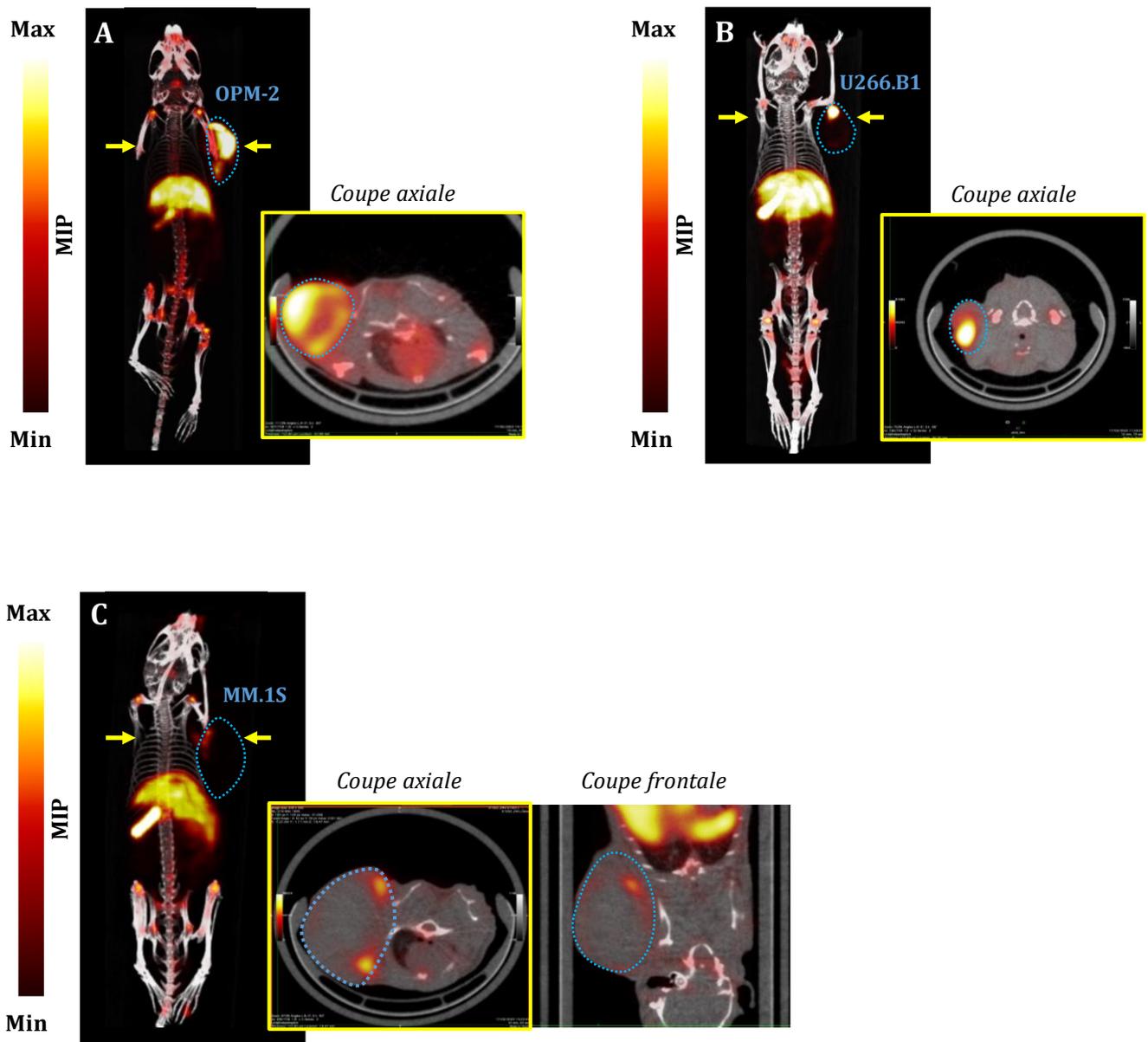


Figure 48. Caractérisation par imagerie TEP-TDM de la fixation du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-12G5}$ chez des souris portant une tumeur s.c OPM-2, U266.B1 ou MM.1S

Les images TEP-TDM ont été réalisées 24 h après l'injection dans la veine caudale latérale du $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-12G5}$ ($10,17 \pm 0,24$ MBq ; $25 \mu\text{g}$ d'anticorps 12G5) chez des souris greffées avec 5 millions de cellules à un ratio 1:1 avec du Matrigel™ 3 semaines auparavant pour les lignées OPM-2 (A) et MM.1S (C) et 5 semaines auparavant pour la lignée U266.B1 (B). Les images TEP-TDM sont présentées en MIP, en coupe axiale et/ou frontale. Les tumeurs sont contourées en pointillés bleus. La localisation des plans de coupes axiales présentés est indiquée par les flèches jaunes sur les plans frontaux en 3D.

III. Discussion

Dans la seconde partie de ces travaux, avec toujours l'objectif de développer des agents théranostiques utilisables chez les sujets atteints de myélome, nous nous sommes intéressés au ciblage d'un autre antigène d'intérêt, le récepteur de chimiokines CXCR4, que l'on retrouve exprimé au niveau de la membrane des cellules de MM.

C'est un axe de recherche dans ma thèse qui a demandé beaucoup de mise au point, notamment sur les études *in vitro*. Pour obtenir les résultats de cytométrie en flux présentés dans ce document, plusieurs études de mises au point, non présentées ici, ont été réalisées. Une recherche plus approfondie des mécanismes et des conditions d'expression du récepteur CXCR4 s'est révélée nécessaire. Ce travail a été entrepris dans le cadre d'un autre travail de thèse dans notre équipe de recherche par la doctorante Nour El Ayoubi (Subatech UMR_C 6457, CRCI²NA – Inserm U1307).

La caractérisation des trois lignées cellulaires dans nos conditions de culture a mis en évidence une hétérogénéité de l'expression du récepteur de chimiokines CXCR4, avec une expression plus importante du récepteur par la lignée U266.B1. Des résultats similaires ont été mis en évidence dans les travaux d'une autre équipe sur les mêmes lignées cellulaires et avec un anticorps anti-CXCR4 du même clone 12G5 que celui que nous avons utilisé (Giallongo et al. 2022). Néanmoins, nous avons montré dans nos travaux que le profil d'expression du récepteur CXCR4 était variable selon les conditions de caractérisation. Sur les modèles animaux, le niveau d'expression *in vivo* mis en évidence par l'imagerie TEP est supérieur pour la lignée OPM-2, alors qu'on retrouve une expression très hétérogène pour les tumeurs U266.B1 et les tumeurs MM.1S. La différence d'expression de la cible entre les lignées MM.1S et OPM-2 avait déjà été mise en évidence par imagerie TEP avec un peptide anti-CXCR4 humain radiomarqué au gallium-68, le [⁶⁸Ga]Ga-Pentixafor (Philipp-Abbrederis et al. 2015). Dans notre étude, la caractérisation de l'expression du récepteur par les cellules récupérées des tumeurs greffées chez la souris a montré des résultats encore différents avec une expression, plus forte, bien que très hétérogène, pour la lignée OPM-2 et MM.1S en comparaison à la lignée U266.B1. Dans les travaux de Müller et al. 2001, ces variations d'expression du CXCR4 ont été mise en évidence au niveau des ARN messagers entre les modèles *in vitro* et *in vivo* dans un modèle cancer du sein triple négatif. Dans le modèle *in vivo*, les cellules tumorales exprimant fortement le récepteur CXCR4 à leur surface sont retrouvées de façon concomitante dans des tissus où des taux importants d'ARN messagers murins codant pour la chimiokine CXCL12 sont retrouvés. La présence de la chimiokine CXCL12 spécifique du récepteur CXCR4 dans les modèles *vivo* semble corrélée à la variation de l'expression retrouvée dans les cellules tumorales. Une autre hypothèse pouvant expliquer ces variations est liée au microenvironnement inflammatoire susceptible de se mettre en place chez la souris suite à

l'implantation des cellules tumorales. Il a été démontré par exemple, dans différents modèles de myélome multiple que la mise en place d'un microenvironnement tumoral hypoxique était responsable de l'augmentation de l'expression du CXCR4 (Azab et al. 2012).

Pour pallier ces variations d'expression du récepteur CXCR4, il est possible comme cela est réalisé dans certaines études, d'utiliser des lignées cellulaires transfectées pour exprimer le CXCR4 de manière constante. Pour nos travaux, nous avons fait le choix de ne pas transfecter nos lignées afin de garder cette hétérogénéité qui simule au mieux ce que l'on retrouve chez les patients. En clinique, l'hétérogénéité de l'expression du CXCR4 par les cellules myélomateuses a été démontrée par l'imagerie diagnostique (Shekhawat et al. 2022). L'imagerie TEP diagnostique réalisée au [⁶⁸Ga]Ga-Pentixafor pour évaluer l'expression du récepteur CXCR4 sur les différents sites tumoraux mis en évidence lors d'un diagnostic préalable réalisé avec le 2-[¹⁸F]F-FDG a mis en évidence que le récepteur CXCR4 n'était pas exprimé par l'ensemble des cellules cancéreuses.

Dans nos études, nous avons montré la spécificité de ciblage de l'anticorps que nous avons produit pour le récepteur CXCR4 quelle que soit la lignée cellulaire sur laquelle nous l'avons utilisé. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres équipes qui ont utilisé ce même clone d'anticorps dans le diagnostic par imagerie TEP de lignées tumorales de glioblastome, de cancer du poumon à petites cellules et de cancer du sein triple négatif exprimant le CXCR4 (Nimmagadda, Pullambhatla, et Pomper 2009; Azad et al. 2016). Bien que la spécificité de l'anticorps radiomarqué au cuivre-64 ait été démontrée in vivo par l'imagerie TEP, il est intéressant de noter que le profil de distribution du radioimmunoconjugué dans les organes sains est différent de ceux observés avec l'anticorps murin 9E7.4. Chez toutes les souris immunodéprimées imagées avec le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-12G5, on retrouve une hyperfixation splénique qui n'est pas visible dans les modèles de souris syngénique avec le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4. Cette fixation a aussi été décrite dans les études ayant réalisées un diagnostic par l'imagerie moléculaire avec ce même anticorps, que ce soit par imagerie TEMP avec le [¹²⁵I]I-12G5 utilisé dans un modèle de xéno greffe de cellules de glioblastomes U87 (Nimmagadda, Pullambhatla, et Pomper 2009), ou par imagerie TEP avec le [⁸⁹Zr]Zr-DFO-12G5 dans des modèles de xéno greffes du cancer du poumon à petites cellules ou de cancer du sein triple négatif (Azad et al. 2016).

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette hyperfixation splénique : il pourrait s'agir d'une réactivité croisée de l'anticorps anti-CXR4 humain pour le CXCR4 murin présent à la surface des cellules retrouvées dans la rate et notamment des cellules B normales qui expriment le CXCR4 (Nagasawa et al. 1996). Toutefois, afin d'évaluer la spécificité de l'anticorps 12G5 pour l'antigène CXCR4 humain, nous avons aussi réalisé des tests de cytométrie en flux sur des lignées murines avec cet anticorps. Nos résultats ont démontré que l'anticorps 12G5 n'était pas capable de se fixer

sur des cellules murines qui expriment le CXCR4 (résultats non présentés dans ce manuscrit). De plus, les souris NSG que nous avons utilisées dans ces études ne possèdent pas de cellules B.

Une autre hypothèse pour expliquer cette hyperfixation est liée à l'anatomie spécifique de la rate qui est un organe de petite taille, mais très irrigué par des capillaires perméables aux protéines plasmatiques de grande taille et dans lequel s'exerce un débit sanguin très important (Cataldi et al. 2017). Cette anatomie spécifique pourrait permettre aux anticorps qui sont des macromolécules de haut poids moléculaire (~150 kDa) d'infiltrer la rate et d'y rester bloqué. Dans ce cas, on ne parlera alors plus d'hyperfixation, mais plutôt de séquestration splénique du radioimmunoconjugué.

Enfin, plusieurs études précliniques ont mis en évidence le même profil de séquestration splénique que celui observé dans nos modèles. Ce résultat est retrouvé avec différents anticorps ciblant différents types de cellules cancéreuses et radiomarqués avec différents radionucléides, l'unique point commun est l'utilisation de souris sévèrement immunodéprimées pour la mise en place des modèles (Sharma et al. 2018). Chez les souris NSG, les cellules de l'immunité adaptative sont absentes, mais on retrouve des cellules effectrices de l'immunité immatures comme les macrophages et les cellules dendritiques, notamment dans la rate et la moelle osseuse. Ces lignées cellulaires expriment à leur surface des récepteurs Fc-gamma (FcγR) capables de lier les IgG avec une grande affinité avant de les phagocyter ou de les présenter aux cellules de l'immunité adaptative (Guilliams et al. 2014). Dans le cas précis de nos expérimentations, l'immaturation de ces cellules rend leur rôle immunitaire défectueux, on peut donc supposer que l'anticorps 12G5 resterait fixé à ces cellules sans être dégradé. Cette hypothèse expliquerait l'hypersignal observé dans la rate, mais aussi celui que l'on retrouve au niveau des épiphyses des os longs des souris.

Aux vues des résultats que nous avons obtenus, il semble que l'hyperfixation splénique soit dépendante de la fixation tumorale. En effet, sur les images TEP acquises avec les trois lignées cellulaires, plus la fixation tumorale est importante, comme avec les cellules OPM-2, et plus le signal au niveau splénique est faible.

Bien que dans nos expérimentations l'accumulation du radioimmunoconjugué dans la rate ne semble pas liée au développement de la maladie, une étude clinique récente a mis en évidence des profils de fixation splénique très hétérogène avec le [⁶⁸Ga]Ga-Pentixafor, un peptide anti-CXCR4, chez les patients atteints de myélome multiple (Kraus et al. 2022). L'hétérogénéité du signal observé dans la rate semble corrélée au pronostic des patients. En effet, l'absence ou la perte du signal TEP au niveau de la rate est concomitante à la présence d'une charge tumorale importante associée à un mauvais pronostic. Cette diminution de captation du radioimmunoconjugué au niveau de la rate est aussi observée chez les patients ayant déjà fait l'objet de plusieurs lignées de

traitement et pourrait être liée à une diminution de l'hématopoïèse extramédullaire induite par la progression de la maladie.

Toutefois, dans la perspective de nos travaux, la mise en place d'une radiothérapie interne vectorisée pourrait nécessiter de s'affranchir de ce biais imposé par le modèle murin qui engendrerait une toxicité splénique non caractéristique de la maladie. Pour pallier ce type de biais, des études ont proposé de saturer ces sites de fixation non spécifiques par l'injection préalable d'un excès d'isotype IgG, de Fc block ou de l'anticorps d'intérêt non radiomarqué (Sharma et al. 2018).

Si l'on s'intéresse maintenant au ciblage du récepteur CXCR4 sur les tumeurs implantées en sous cutané, nous avons pu mettre en évidence un ciblage effectif bien que très hétérogène autant dans la répartition de l'anticorps au sein d'une tumeur qu'entre les différentes lignées greffées. Afin de vérifier que cette distribution hétérogène est liée ou non à la variation d'expression du récepteur par la tumeur, il sera proposé, de poursuivre les travaux entrepris avec des vecteurs différents des anticorps, notamment des peptides de référence utilisés en clinique comme le Pentixafor (Buck et al. 2022) ou encore de petites molécules chimiques inhibitrices du récepteur.

IV. Conclusion

La caractérisation in vitro de l'expression du récepteur CXCR4 a permis de démontrer son expression dans nos trois lignées cellulaires de myélome multiple ainsi que la spécificité de l'anticorps anti-CXCR4 utilisé pour le ciblage. Les études d'imagerie diagnostiques TEP-TDM menées avec le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-12G5 ont démontré sa capacité à cibler le récepteur CXCR4 humain exprimé de façon hétérogène par les cellules tumorales. Après des optimisations nécessaires pour s'affranchir de sa fixation non spécifique sur certains organes, cet anticorps radiomarqué au cuivre-64 apparaîtra comme un radioimmunoconjugué prometteur pour le diagnostic par l'imagerie TEP du myélome multiple.

Partie IV : Conclusion générale

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans un projet d'élaboration de nouveaux radiopharmaceutiques pour une approche théranostique en médecine nucléaire. Les travaux se sont articulés autour de deux axes dont l'objectif commun était d'étudier le potentiel du cuivre-64 comme radionucléide théranostique. En effet, en raison des propriétés de désintégration du cuivre-64 (β^+ 17,4%, β^- 39,0%), l'utilisation de ce radionucléide devrait en théorie être aussi intéressante pour des applications diagnostiques par l'imagerie TEP que pour des applications thérapeutiques. Cependant, bien que son intérêt pour l'imagerie TEP soit déjà reconnu dans plusieurs applications cliniques, son intérêt en radiothérapie interne vectorisée reste à démontrer.

Dans le premier axe de travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation du potentiel théranostique d'un anticorps murin anti-CD138 radiomarqué au cuivre-64 ($[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$) dans trois différents modèles précliniques syngéniques : un modèle orthotopique et un modèle hétérotopique de myélome multiple établis à partir de la lignée cellulaire MOPC315.BM et un modèle hétérotopique de cancer du sein triple négatif établi avec la lignée cellulaire 4T1.

Nous avons d'abord pu démontrer la spécificité et la sensibilité du radioimmunoconjugué $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ en imagerie TEP-TDM pour détecter les cellules murines MOPC315.BM exprimant le CD138. Les résultats de l'imagerie TEP ont mis en évidence la capacité du radioimmunoconjugué à détecter avec un excellent contraste, les tumeurs sous-cutanées de moyennes et petites tailles, mais aussi les lésions ostéolytiques qui se développent dans le modèle orthotopique. Dans le modèle de tumeur s.c MOPC315.BM, le suivi longitudinal par l'imagerie TEP-TDM de la distribution du radioimmunoconjugué après son injection dans l'organisme a mis en évidence un long temps de rétention tumoral allant jusqu'à au moins 48 heures p.i. A l'exception du foie, l'ensemble des autres organes montre une clairance tissulaire importante permettant l'obtention d'important ratios tumeur/tissus. Ce résultat représente un avantage pour l'imagerie diagnostique, mais aussi pour la dosimétrie des rayonnements émis pour une application thérapeutique. L'étude dosimétrique réalisée à partir des données de biodistribution ex vivo sur ce modèle a démontré que le $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ pouvait délivrer des doses de rayonnement importantes à la tumeur, très encourageantes pour une utilisation thérapeutique. Cette étude démontre aussi que malgré la captation importante au niveau du foie révélée par l'imagerie TEP-TDM et confirmée par la biodistribution ex vivo, la dose absorbée au niveau de la tumeur est presque 3 fois supérieure à celle absorbée au niveau du foie.

Les études thérapeutiques réalisées dans les deux modèles de myélome multiple ont démontré que l'injection d'activité thérapeutique (> 35 MBq) de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ permettait d'augmenter la survie des animaux de façon significative. Les résultats les plus concluants ont été obtenus avec la répétition de deux injections de 35 MBq de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ administrées à

2 semaines d'intervalles, puisque ce protocole thérapeutique a permis de traiter 2 souris sur 6 dans le modèle orthotopique et une souris sur 9 dans le modèle hétérotopique. En plus d'améliorer la survie des animaux, ce protocole thérapeutique dans le modèle hétérotopique a entraîné un retard de la croissance tumorale et une régression du volume tumoral. Ces résultats prometteurs ont démontré que les injections répétées de [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 sont sûres et efficaces dans ces modèles syngénique de MM et s'accompagnent d'une toxicité modérée et transitoire.

Dans le modèle préclinique de CSTN, les études diagnostiques par l'imagerie TEP-TDM ont mis en évidence une expression de la cible CD138 plus faible que celle observée dans les modèles établis avec la lignée cellulaire MOPC315.BM. Ainsi le temps de rétention du radioimmunoconjugué au niveau de la tumeur s'en retrouve relativement plus court, puisque plus aucun signal TEP n'est observé au niveau de la tumeur 48 heures après son injection. Cette différence d'expression de la cible CD138 et donc de rétention du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 au niveau de la tumeur a diminué l'efficacité du traitement en comparaison à celle observée dans les modèles de MM. Pour autant, la répétition de deux doses de 35 MBq de [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 a permis d'améliorer significativement la survie des souris traitées sans induire de toxicité majeure.

En conclusion, de ce premier axe de recherche, les différents résultats obtenus ont démontré le potentiel théranostique du cuivre-64 vectorisé par l'anticorps 9E7.4 dans nos différents modèles de cancer. D'abord, par son potentiel diagnostique avec l'imagerie TEP qui a su mettre en évidence les différents taux d'expression de la cible dans chacun des modèles utilisés pour les expérimentations. Ensuite par son potentiel thérapeutique, la répétition de deux doses de 35 MBq de [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 a montré une efficacité thérapeutique plus ou moins importante dans chacun des modèles en entraînant un ralentissement de la croissance tumorale et une augmentation de la survie sans induire de toxicité majeure ou irréversible. Pour améliorer encore l'efficacité thérapeutique du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dans les deux modèles de MM, il est possible d'envisager des cycles d'administration de dose de traitement plus importants afin d'augmenter la dose de rayonnement reçue par les cellules tumorales. Il est aussi possible d'envisager de réduire l'intervalle de temps entre deux doses de traitement pour limiter de façon plus drastique la prolifération tumorale entre les deux injections. Enfin, dans le modèle le CSTN, pour contrebalancer la différence d'expression de la cible présente sur les cellules tumorales qui limite l'efficacité du traitement, la mise en place d'une combinaison thérapeutique avec une immunothérapie ou une chimiothérapie par exemple pourrait être envisagée pour améliorer la survie des animaux traités.

Dans la deuxième partie de ces travaux, nous nous sommes consacrés à l'étude de la spécificité de ciblage d'un anticorps humain anti-CXCR4 (AcM 12G5) radiomarqué au cuivre-64 pour le diagnostic par imagerie TEP-TDM sur trois lignées cellulaires humaines de MM, la lignée OPM-2, la lignée U266.B1 et la lignée MM.1S. Dans un premier temps, la caractérisation de la fixation de l'anticorps anti-CXCR4 humain que nous avons produit à partir d'un hybridome cellulaire a été réalisée in vitro sur les différentes lignées cellulaires, et a permis de démontrer sa spécificité pour le récepteur CXCR4. Lors de cette caractérisation, les résultats ont mis en évidence des profils d'expression du récepteur CXCR4 très différents entre les trois lignées cellulaires, mais aussi très hétérogènes au sein d'une même lignée. Dans un deuxième temps, les études d'imagerie diagnostiques TEP-TDM menées avec l'anticorps anti-CXCR4 radiomarqué au cuivre-64, le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-12G5, ont démontré la capacité du radioimmunoconjugué à se fixer aux cellules tumorales in vivo. Cette fixation tumorale est hétérogène dans chacun des modèles et les profils d'expression du récepteur CXCR4, caractérisés par la fixation du [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-12G5, sont aussi très différents de ceux observés in vitro pour chacune des lignées cellulaires. In vivo, la fixation tumorale la plus importante est retrouvée au niveau des tumeurs OPM-2. Les résultats obtenus par l'imagerie TEP-TDM avec notre radioimmunoconjugué ciblant le récepteur CXCR4 humain ont aussi mis en évidence que le modèle murin immunodéprimé utilisé dans cette étude est à l'origine d'une fixation non spécifique au niveau de la rate.

En conclusion de cet axe de recherche, le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-12G5 apparaît comme un radioimmunoconjugué prometteur pour le diagnostic par l'imagerie TEP du myélome multiple capable de mettre en évidence les différences de taux d'expression dans chacune des lignées tumorales. Des expériences complémentaires de diagnostic par l'imagerie TEP avec des molécules de référence ciblant le récepteur CXCR4 seront nécessaires pour attester que la distribution hétérogène retrouvée avec notre radioimmunoconjugué au sein des différentes tumeurs est bien liée à une hétérogénéité de l'expression du CXCR4.

Enfin, les résultats de ces travaux de thèse offrent des perspectives intéressantes et ouvrent la voie à la mise en place d'études théranostiques plus poussées basées sur l'utilisation du cuivre-64. En perspective de ces deux axes de recherche, il est possible d'envisager une combinaison thérapeutique avec deux radioimmunoconjugués à base de cuivre-64 ciblant à la fois le CD138 et le récepteur CXCR4 dans des modèles de myélome multiple. Le ciblage de deux cibles distinctes exprimées par les cellules myélomateuses pourrait avoir comme intérêt d'optimiser l'effet thérapeutique apporté par le cuivre-64. Dans le cas de cellules tumorales exprimant de façon hétérogène ou bien de façon moins importante l'une des deux cibles, l'association des deux traitements pourrait permettre d'augmenter la dose de rayonnement délivrée au niveau du site tumoral.

Partie V : Références bibliographiques

- Ahmedova, Anife, Boyan Todorov, Nikola Burdzhiev, et Christine Goze. 2018. « Copper Radiopharmaceuticals for Theranostic Applications ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 157 (septembre): 1406-25. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.051>.
- Andersson, Martin, Lennart Johansson, Keith Eckerman, et Sören Mattsson. 2017. « IDAC-Dose 2.1, an Internal Dosimetry Program for Diagnostic Nuclear Medicine Based on the ICRP Adult Reference Voxel Phantoms ». *EJNMMI Research* 7 (1): 88. <https://doi.org/10.1186/s13550-017-0339-3>.
- « ANDR'É BOCAGE (1892-1953)--FRENCH TOMOGRAPHER ». 1965. *JAMA* 193 (juillet): 233.
- Anger, H. O. 1952. « Use of a Gamma-Ray Pinhole Camera for in Vivo Studies ». *Nature* 170 (4318): 200-201. <https://doi.org/10.1038/170200b0>.
- Anger, Hal O., et James McRae. 1968. « Transmission Scintiphotography ». *Journal of Nuclear Medicine* 9 (6): 267-69.
- Attal, Michel, Valerie Lauwers-Cances, Cyrille Hulin, Xavier Leleu, Denis Caillot, Martine Escoffre, Bertrand Arnulf, et al. 2017. « Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma ». *New England Journal of Medicine* 376 (14): 1311-20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611750>.
- Azab, Abdel Kareem, Jinsong Hu, Phong Quang, Feda Azab, Costas Pitsillides, Rana Awwad, Brian Thompson, et al. 2012. « Hypoxia promotes dissemination of multiple myeloma through acquisition of epithelial to mesenchymal transition-like features ». *Blood* 119 (24): 5782-94. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-380410>.
- Azad, Babak Behnam, Samit Chatterjee, Wojciech G. Lesniak, Ala Lisok, Mrudula Pullambhatla, Zaver M. Bhujwalla, Martin G. Pomper, et Sridhar Nimmagadda. 2016. « A fully human CXCR4 antibody demonstrates diagnostic utility and therapeutic efficacy in solid tumor xenografts ». *Oncotarget* 7 (11): 12344-58. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7111>.
- Bailey, Dale L., Kathy P. Willowson, Matt Harris, Colin Biggin, Alireza Aslani, Nigel A. Lengkeek, Jon Stoner, et al. 2022. « ⁶⁴Cu Treatment Planning and ⁶⁷Cu Therapy with Radiolabelled SARTATE ([⁶⁴Cu/⁶⁷Cu]MeCOSAR-Octreotate) in Subjects with Unresectable Multifocal Meningioma – Initial Results for Human Imaging, Safety, Biodistribution and Radiation Dosimetry ». *Journal of Nuclear Medicine*, décembre. <https://doi.org/10.2967/jnumed.122.264586>.
- Bailly, Clément, Caroline Bodet-Milin, Mickaël Bourgeois, Sébastien Gouard, Catherine Ansquer, Matthieu Barbaud, Jean-Charles Sébille, Michel Chérel, Françoise Kraeber-Bodéré, et Thomas Carlier. 2019. « Exploring Tumor Heterogeneity Using PET Imaging: The Big Picture ». *Cancers* 11 (9): 1282. <https://doi.org/10.3390/cancers11091282>.
- Bailly, Clément, Sébastien Gouard, Marie Lacombe, Patricia Remaud-Le Saëc, Benjamin Chalopin, Mickaël Bourgeois, Nicolas Chouin, et al. 2018. « Comparison of Immuno-PET of CD138 and PET imaging with ⁶⁴CuCl₂ and ¹⁸F-FDG in a preclinical syngeneic model of multiple myeloma ». *Oncotarget* 9 (10): 9061-72. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23886>.
- Bander, Neil H., Matthew I. Milowsky, David M. Nanus, Lale Kostakoglu, Shankar Vallabhajosula, et Stanley J. Goldsmith. 2005. « Phase I Trial of ¹⁷⁷Lutetium-Labeled J591, a Monoclonal Antibody to Prostate-Specific Membrane Antigen, in Patients With Androgen-Independent Prostate Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 23 (21): 4591-4601. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.160>.
- Bauer, Wilfried, Ulrich Briner, Wolfgang Doepfner, Roland Haller, René Huguenin, Peter Marbach, Trevor J. Petcher, et Janos Pless. 1982. « SMS 201-995: A Very Potent and Selective Octapeptide Analogue of Somatostatin with Prolonged Action ». *Life Sciences* 31 (11): 1133-40. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(82\)90087-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(82)90087-X).
- Baum, Richard P., Harshad R. Kulkarni, Christiane Schuchardt, Aviral Singh, Martina Wirtz, Stefan Wiessalla, Margret Schottelius, Dirk Mueller, Ingo Klette, et Hans-Jürgen Wester. 2016. « ¹⁷⁷Lu-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy ». *Journal of Nuclear Medicine* 57 (7): 1006-13. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.168443>.
- Beauvais, DeannaLee M., Oisun Jung, Yang Yang, Ralph D. Sanderson, et Alan C. Rapraeger. 2016. « Syndecan-1 (CD138) suppresses apoptosis in multiple myeloma by activating IGF1

- receptor: prevention by synstatin IGF1R inhibits tumor growth ». *Cancer research* 76 (17): 4981-93. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0232>.
- Behzadi, Ashkan Heshmatzadeh, Syed Imran Raza, John A. Carrino, Christos Kosmas, Ali Gholamrezanezhad, Kyle Basques, George R. Matcuk, Jay Patel, et Hossein Jadvar. 2018. « Applications of PET/CT and PET/MR Imaging in Primary Bone Malignancies ». *PET clinics* 13 (4): 623-34. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.05.012>.
- Bensch, Frederike, A. H. Brouwers, M. N. Lub-de Hooge, J. R. de Jong, B. van der Vegt, S. Sleijfer, E. G. E. de Vries, et C. P. Schröder. 2018. « 89Zr-Trastuzumab PET Supports Clinical Decision Making in Breast Cancer Patients, When HER2 Status Cannot Be Determined by Standard Work Up ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 45 (13): 2300-2306. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4099-8>.
- Bentzen, Søren M. 2005. « Theragnostic Imaging for Radiation Oncology: Dose-Painting by Numbers ». *The Lancet Oncology* 6 (2): 112-17. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)01737-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)01737-7).
- Beyer, T., D. W. Townsend, T. Brun, P. E. Kinahan, M. Charron, R. Roddy, J. Jerin, J. Young, L. Byars, et R. Nutt. 2000. « A Combined PET/CT Scanner for Clinical Oncology ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 41 (8): 1369-79.
- Blockhuys, S., E. Celauro, C. Hildesjö, A. Feizi, O. Stål, J. C. Fierro-González, et P. Wittung-Stafshede. 2017. « Defining the Human Copper Proteome and Analysis of Its Expression Variation in Cancers ». *Metallomics: Integrated Biometal Science* 9 (2): 112-23. <https://doi.org/10.1039/c6mt00202a>.
- Bodei, Lisa, Marta Cremonesi, Mahila Ferrari, Monica Pacifici, Chiara M. Grana, Mirco Bartolomei, Silvia M. Baio, Maddalena Sansovini, et Giovanni Paganelli. 2008. « Long-Term Evaluation of Renal Toxicity after Peptide Receptor Radionuclide Therapy with 90Y-DOTATOC and 177Lu-DOTATATE: The Role of Associated Risk Factors ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 35 (10): 1847-56. <https://doi.org/10.1007/s00259-008-0778-1>.
- Bodei, Lisa, Dik J. Kwekkeboom, Mark Kidd, Irvin M. Modlin, et Eric P. Krenning. 2016. « Radiolabeled Somatostatin Analogue Therapy Of Gastroenteropancreatic Cancer ». *Seminars in Nuclear Medicine, Radiolabeled Agents in Cancer Therapy (Part II)*, 46 (3): 225-38. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2015.12.003>.
- Bodet-Milin, Caroline, Alain Faivre-Chauvet, Thomas Carlier, Aurore Rauscher, Mickael Bourgeois, Evelyne Cerato, Vincent Rohmer, et al. 2016. « Immuno-PET Using Anticarcinoembryonic Antigen Bispecific Antibody and 68Ga-Labeled Peptide in Metastatic Medullary Thyroid Carcinoma: Clinical Optimization of the Pretargeting Parameters in a First-in-Human Trial ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 57 (10): 1505-11. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.172221>.
- Boswell, C. Andrew, et Martin W. Brechbiel. 2007. « Development of Radioimmunotherapeutic and Diagnostic Antibodies: An Inside-Out View ». *Nuclear medicine and biology* 34 (7): 757-78. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.04.001>.
- Boudjemeline, Mehdi, Christopher D. McNitt, Vladimir V. Popik, et Alexey P. Kostikov. 2018. « [18F]ODIBO: a universal prosthetic group for highly efficient radiolabelling of macromolecules via strain-promoted alkyne-azide cycloaddition ». *Organic & biomolecular chemistry* 16 (3): 363-66. <https://doi.org/10.1039/c7ob02532g>.
- Bourel, Dominique, et Jean-Luc Teillaud. 2006. « Anticorps monoclonaux : tours et détours technologiques pour de nouveaux espoirs thérapeutiques ». *Comptes Rendus Biologies* 329 (4): 217-27. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2006.02.006>.
- Boyle, Amanda J., Ping-Jiang Cao, Zhongli Cai, Conrad Chan, David W. Hedley, et Raymond M. Reilly. 2020. « Radioimmunotherapy of Human Pancreatic Cancer Xenografts in NOD-Scid Mice with [64Cu]Cu-NOTA-Panitumumab F(Ab')₂ Alone or Combined with Radiosensitizing Gemcitabine and the PARP Inhibitor, Rucaparib ». *Nuclear Medicine and Biology* 84-85 (juin): 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2020.02.001>.

- Brechbiel, Martin W. 2008. « Bifunctional Chelates for Metal Nuclides ». *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society of*. 52 (2): 166-73.
- Brownell, G. L., et W. H. Sweet. 1956. « Scanning of Positron-Emitting Isotopes in Diagnosis of Intracranial and Other Lesions ». *Acta Radiologica* os-46 (1-2): 425-34. <https://doi.org/10.1177/028418515604600154>.
- Buchmann, I., M. Henze, S. Engelbrecht, M. Eisenhut, A. Runz, M. Schäfer, T. Schilling, S. Haufe, T. Herrmann, et U. Haberkorn. 2007. « Comparison of ⁶⁸Ga-DOTATOC PET and ¹¹¹In-DTPAOC (Octreoscan) SPECT in Patients with Neuroendocrine Tumours ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 34 (10): 1617-26. <https://doi.org/10.1007/s00259-007-0450-1>.
- Buck, Andreas K., Alexander Haug, Niklas Dreher, Alessandro Lambertini, Takahiro Higuchi, Constantin Lapa, Alexander Weich, et al. 2022. « Imaging of C-X-C Motif Chemokine Receptor 4 Expression in 690 Patients with Solid or Hematologic Neoplasms Using ⁶⁸Ga-Pentixafor PET ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 63 (11): 1687-92. <https://doi.org/10.2967/jnumed.121.263693>.
- Burrell, Rebecca A., Nicholas McGranahan, Jiri Bartek, et Charles Swanton. 2013. « The Causes and Consequences of Genetic Heterogeneity in Cancer Evolution ». *Nature* 501 (7467): 338-45. <https://doi.org/10.1038/nature12625>.
- Caers, Jo, Laurent Garderet, K. Martin Kortüm, Michael E. O'Dwyer, Niels W.C.J. van de Donk, Mascha Binder, Sandra Maria Dold, et al. 2018. « European Myeloma Network Recommendations on Tools for the Diagnosis and Monitoring of Multiple Myeloma: What to Use and When ». *Haematologica* 103 (11): 1772-84. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.189159>.
- Carey, David J. 1997. « Syndecans: Multifunctional Cell-Surface Co-Receptors ». *Biochemical Journal* 327 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1042/bj3270001>.
- Castaneda, Omar, et Rachid Baz. 2019. « Multiple Myeloma Genomics – A Concise Review ». *Acta Medica Academica* 48 (1): 57-67. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.242>.
- Cataldi, Mauro, Chiara Vigliotti, Teresa Mosca, MariaRosaria Cammarota, et Domenico Capone. 2017. « Emerging Role of the Spleen in the Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies, Nanoparticles and Exosomes ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6): 1249. <https://doi.org/10.3390/ijms18061249>.
- « Chapitre Ier : Dispositions générales. (Articles L5121-1 à L5121-21) - Légifrance ». s. d. Consulté le 9 février 2023. https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006072665/LEGISCTA000006171366?init=true&page=1&query=tout+m%C3%A9dicament+qui%2C+lorsqu%E2%80%99il+est+pr%C3%AAt+%C3%A0+l%E2%80%99emploi%2C+contient+un+ou+p+plusieurs+isotopes+radioactifs%2C+d%C3%A9nomm%C3%A9s+radionucl%C3%A9ides%2C+incorpor%C3%A9s+%C3%A0+des+fin+m%C3%A9dicales&searchField=ALL&tab_selection=all&anchor=LEGIARTI000044628485#LEGIARTI000044628485.
- Chaudhry, Ammar A, Maryam Gul, Elaine Gould, Mathew Teng, Kevin Baker, et Robert Matthews. 2016. « Utility of Positron Emission Tomography-Magnetic Resonance Imaging in Musculoskeletal Imaging ». *World Journal of Radiology* 8 (3): 268. <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i3.268>.
- Cheal, Sarah M., Sebastian K. Chung, Brett A. Vaughn, Nai-Kong V. Cheung, et Steven M. Larson. 2022. « Pretargeting: A Path Forward for Radioimmunotherapy ». *Journal of Nuclear Medicine* 63 (9): 1302-15. <https://doi.org/10.2967/jnumed.121.262186>.
- Chellan, Prinessa, et Peter J Sadler. 2015. « The elements of life and medicines ». *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 373 (2037): 20140182. <https://doi.org/10.1098/rsta.2014.0182>.
- Chérel, Michel, Sébastien Gouard, Joëlle Gaschet, Catherine Sai-Maurel, Frank Bruchertseifer, Alfred Morgenstern, Mickael Bourgeois, et al. 2013. « ²¹³Bi Radioimmunotherapy with

- an Anti-MCD138 Monoclonal Antibody in a Murine Model of Multiple Myeloma ». *Journal of Nuclear Medicine* 54 (9): 1597-1604. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.111997>.
- Cherry, Simon R., Terry Jones, Joel S. Karp, Jinyi Qi, William W. Moses, et Ramsey D. Badawi. 2018. « Total-Body PET: Maximizing Sensitivity to Create New Opportunities for Clinical Research and Patient Care ». *Journal of Nuclear Medicine* 59 (1): 3-12. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.184028>.
- Connett, J M, C J Anderson, L W Guo, S W Schwarz, K R Zinn, B E Rogers, B A Siegel, G W Philpott, et M J Welch. 1996. « Radioimmunotherapy with a ^{64}Cu -labeled monoclonal antibody: a comparison with ^{67}Cu . » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (13): 6814-18.
- Cooper, Maggie S., Michelle T. Ma, Kavitha Sunassee, Karen P. Shaw, Jennifer D. Williams, Rowena L. Paul, Paul S. Donnelly, et Philip J. Blower. 2012. « Comparison of ^{64}Cu -complexing bifunctional chelators for radioimmunoconjugation: labeling efficiency, specific activity and in vitro/in vivo stability ». *Bioconjugate chemistry* 23 (5): 1029-39. <https://doi.org/10.1021/bc300037w>.
- Crișan, George, Nastasia Sanda Moldovean-Cioroianu, Diana-Gabriela Timaru, Gabriel Andrieș, Călin Căinap, et Vasile Chiș. 2022. « Radiopharmaceuticals for PET and SPECT Imaging: A Literature Review over the Last Decade ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (9): 5023. <https://doi.org/10.3390/ijms23095023>.
- Czlonkowska, Anna, Tomasz Litwin, Petr Dusek, Peter Ferenci, Svetlana Lutsenko, Valentina Medici, Janusz K. Rybakowski, Karl Heinz Weiss, et Michael L Schilsky. 2018. « Nature Reviews Disease Primers article: Wilson disease ». *Nature reviews. Disease primers* 4 (1): 21. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0018-3>.
- Das, Sudipta, Maria Czarnek, Monika Bzowska, Renata Mężyk-Kopeć, Krystyna Stalińska, Barbara Wyroba, Jolanta Sroka, et al. 2012. « ADAM17 Silencing in Mouse Colon Carcinoma Cells: The Effect on Tumoricidal Cytokines and Angiogenesis ». *PLoS ONE* 7 (12): e50791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050791>.
- Dearling, Jason L. J., Ellen M. van Dam, Matthew J. Harris, et Alan B. Packard. 2021. « Detection and therapy of neuroblastoma minimal residual disease using $[^{64}/^{67}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$ in a preclinical model of hepatic metastases ». *EJNMMI Research* 11 (février): 20. <https://doi.org/10.1186/s13550-021-00763-0>.
- Decazes, P., S. Hapdey, A. Larnaudie, J. Thariat, et S. Thureau. 2020. « Tomographie par émission de positons (TEP) pour la radiothérapie : technique et innovations ». *Cancer/Radiothérapie*, 31e Congrès national de la Société française de radiothérapie oncologique, 24 (6): 628-34. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2020.07.006>.
- Dehghanifard, Ali, Saeid Kaviani, Saeid Abroun, Mahshad Mehdizadeh, Sajedeh Saiedi, Amirhosein Maali, Sasan Ghaffari, et Mehdi Azad. 2018. « Various Signaling Pathways in Multiple Myeloma Cells and Effects of Treatment on These Pathways ». *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 18 (5): 311-20. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.03.007>.
- DeNardo, G. L., D. L. Kukis, S. Shen, L. F. Mausner, C. F. Meares, S. C. Srivastava, L. A. Miers, et S. J. DeNardo. 1997. « Efficacy and Toxicity of ^{67}Cu -2IT-BAT-Lym-1 Radioimmunoconjugate in Mice Implanted with Human Burkitt's Lymphoma (Raji) ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 3 (1): 71-79.
- DeNardo, Gerald L., Jeffery Schlom, Donald J. Buchsbaum, Ruby F. Meredith, Joseph A. O'Donoghue, George Sgouros, John L. Humm, et Sally J. DeNardo. 2002. « Rationales, Evidence, and Design Considerations for Fractionated Radioimmunotherapy ». *Cancer* 94 (4 Suppl): 1332-48. <https://doi.org/10.1002/cncr.10304>.
- Derksen, Patrick W. B., Robert M. J. Keehnen, Ludo M. Evers, Marinus H. J. van Oers, Marcel Spaargaren, et Steven T. Pals. 2002. « Cell Surface Proteoglycan Syndecan-1 Mediates Hepatocyte Growth Factor Binding and Promotes Met Signaling in Multiple Myeloma ». *Blood* 99 (4): 1405-10. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.4.1405>.
- Ding, Li, Timothy J. Ley, David E. Larson, Christopher A. Miller, Daniel C. Koboldt, John S. Welch, Julie K. Ritchey, et al. 2012. « Clonal Evolution in Relapsed Acute Myeloid Leukaemia

- Revealed by Whole-Genome Sequencing ». *Nature* 481 (7382): 506-10.
<https://doi.org/10.1038/nature10738>.
- Durie, B. G., D. Stock-Novack, S. E. Salmon, P. Finley, J. Beckord, J. Crowley, et C. A. Coltman. 1990. « Prognostic Value of Pretreatment Serum Beta 2 Microglobulin in Myeloma: A Southwest Oncology Group Study ». *Blood* 75 (4): 823-30.
- Eder, Matthias, Martin Schäfer, Ulrike Bauder-Wüst, William-Edmund Hull, Carmen Wängler, Walter Mier, Uwe Haberkorn, et Michael Eisenhut. 2012. « 68Ga-Complex Lipophilicity and the Targeting Property of a Urea-Based PSMA Inhibitor for PET Imaging ». *Bioconjugate Chemistry* 23 (4): 688-97. <https://doi.org/10.1021/bc200279b>.
- Emond, Elise C., Ashley M. Groves, Brian F. Hutton, et Kris Thielemans. 2019. « Effect of Positron Range on PET Quantification in Diseased and Normal Lungs ». *Physics in Medicine & Biology* 64 (20): 205010. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/ab469d>.
- « ENQUÊTE NATIONALE ANNUELLE ». s. d. *CNP MN* (blog). Consulté le 15 janvier 2023.
https://www.cnp-mn.fr/sfmn-accueil/enquete_nationale_annuelle/.
- Eskandari, Sepehr, Donald D. F. Loo, Ge Dai, Orly Levy, Ernest M. Wright, et Nancy Carrasco. 1997. « Thyroid Na⁺/I⁻ Symporter: MECHANISM, STOICHIOMETRY, AND SPECIFICITY* ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (43): 27230-38.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.43.27230>.
- Evans, G. W., R. S. Dubois, et K. M. Hambidge. 1973. « Wilson's Disease: Identification of an Abnormal Copper-Binding Protein ». *Science* 181 (4105): 1175-76.
<https://doi.org/10.1126/science.181.4105.1175>.
- Fichou, Nolwenn, Sébastien Gouard, Catherine Maurel, Jacques Barbet, Ludovic Ferrer, Alfred Morgenstern, Frank Bruchertseifer, et al. 2015. « Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 Is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model ». *Frontiers in Medicine* 2: 76.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00076>.
- Filosofov, Dmitry, Elena Kurakina, et Valery Radchenko. 2021. « Potent Candidates for Targeted Auger Therapy: Production and Radiochemical Considerations ». *Nuclear Medicine and Biology* 94-95 (mars): 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2020.12.001>.
- Frindel, Mathieu, Nathalie Camus, Aurore Rauscher, Mickaël Bourgeois, Cyrille Alliot, Louisa Barré, Jean-François Gestin, Raphaël Tripier, et Alain Faivre-Chauvet. 2014. « Radiolabeling of HTE1PA: A New Monopicolinate Cyclam Derivative for Cu-64 Phenotypic Imaging. In Vitro and in Vivo Stability Studies in Mice ». *Nuclear Medicine and Biology* 41 (mai): e49-57. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2013.12.009>.
- Froidevaux, Sylvie, et Alex N. Eberle. 2002. « Somatostatin Analogs and Radiopeptides in Cancer Therapy ». *Peptide Science* 66 (3): 161-83. <https://doi.org/10.1002/bip.10256>.
- Funkhouser, J. 2002. « Reinventing pharma: The theranostic revolution ». *Current Drug Discovery*, août, 17-19.
- Georgatsou, Elena, Lampros A. Mavrogiannis, George S. Fragiadakis, et Despina Alexandraki. 1997. « The Yeast Fre1p/Fre2p Cupric Reductases Facilitate Copper Uptake and Are Regulated by the Copper-Modulated Mac1p Activator* ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (21): 13786-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13786>.
- Giallongo, Cesarina, Iliaria Dulcamare, Daniele Tibullo, Vittorio Del Fabro, Nunzio Vicario, Nunziatina Parrinello, Alessandra Romano, et al. 2022. « CXCL12/CXCR4 axis supports mitochondrial trafficking in tumor myeloma microenvironment ». *Oncogenesis* 11 (1): 6. <https://doi.org/10.1038/s41389-022-00380-z>.
- Giovanella, Luca, Desiree' Deandreis, Alexis Vrachimis, Alfredo Campenni, et Petra Petranovic Ovcaricek. 2022. « Molecular Imaging and Theragnostics of Thyroid Cancers ». *Cancers* 14 (5): 1272. <https://doi.org/10.3390/cancers14051272>.
- Goldenberg, D. M., F. DeLand, E. Kim, S. Bennett, F. J. Primus, J. R. van Nagell, N. Estes, P. DeSimone, et P. Rayburn. 1978. « Use of Radiolabeled Antibodies to Carcinoembryonic Antigen for the Detection and Localization of Diverse Cancers by External Photoscanning ». *The New England Journal of Medicine* 298 (25): 1384-86.
<https://doi.org/10.1056/NEJM197806222982503>.

- Goldenberg, D. M., E. E. Kim, F. H. DeLand, S. Bennett, et F. J. Primus. 1980. « Radioimmunodetection of Cancer with Radioactive Antibodies to Carcinoembryonic Antigen ». *Cancer Research* 40 (8 Pt 2): 2984-92.
- Gomes-Porras, Mariana, Jersy Cárdenas-Salas, et Cristina Álvarez-Escolá. 2020. « Somatostatin Analogs in Clinical Practice: A Review ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (5): 1682. <https://doi.org/10.3390/ijms21051682>.
- Gouard, S., A. Pallardy, J. Gaschet, A. Faivre-Chauvet, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, C. Maurel, et al. 2014. « Comparative Analysis of Multiple Myeloma Treatment by CD138 Antigen Targeting with Bismuth-213 and Melphalan Chemotherapy ». *Nuclear Medicine and Biology* 41 Suppl (mai): e30-35. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.02.008>.
- Gouard, Sébastien, Catherine Maurel, Séverine Marionneau-Lambot, Delphine Dansette, Clément Bailly, François Guérard, Nicolas Chouin, et al. 2020. « Targeted-Alpha-Therapy Combining Astatine-211 and anti-CD138 Antibody in a Preclinical Syngeneic Mouse Model of Multiple Myeloma Minimal Residual Disease ». *Cancers* 12 (9): 2721. <https://doi.org/10.3390/cancers12092721>.
- Graves, Stephen A., et Robert F. Hobbs. 2021. « Dosimetry for Optimized, Personalized Radiopharmaceutical Therapy ». *Seminars in Radiation Oncology, Rapid Evolution in Theranostics*, 31 (1): 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2020.07.008>.
- Greenough, M., L. Pase, I. Voskoboinik, M. J. Petris, A. Wilson O'Brien, et J. Camakaris. 2004. « Signals regulating trafficking of Menkes (MNK; ATP7A) copper-translocating P-type ATPase in polarized MDCK cells ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 287 (5): C1463-71. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00179.2004>.
- Greipp, Philip R., Jesus San Miguel, Brian G. M. Durie, John J. Crowley, Bart Barlogie, Joan Bladé, Mario Boccadoro, et al. 2005. « International Staging System for Multiple Myeloma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (15): 3412-20. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.242>.
- Gudkov, Sergey V., Natalya Yu. Shilyagina, Vladimir A. Vodeneev, et Andrei V. Zvyagin. 2015. « Targeted Radionuclide Therapy of Human Tumors ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (1): 33. <https://doi.org/10.3390/ijms17010033>.
- Guilliams, Martin, Pierre Bruhns, Yvan Saeys, Hamida Hammad, et Bart N. Lambrecht. 2014. « The Function of Fcγ Receptors in Dendritic Cells and Macrophages ». *Nature Reviews Immunology* 14 (2): 94-108. <https://doi.org/10.1038/nri3582>.
- Guo, F., Y. Wang, J. Liu, S. C. Mok, F. Xue, et W. Zhang. 2016. « CXCL12/CXCR4: A Symbiotic Bridge Linking Cancer Cells and Their Stromal Neighbors in Oncogenic Communication Networks ». *Oncogene* 35 (7): 816-26. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.139>.
- Gutflen, Bianca, Sergio AL Souza, et Gianluca Valentini. 2018. « Copper-64: a real theranostic agent ». *Drug Design, Development and Therapy* 12 (octobre): 3235-45. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S170879>.
- Hammond, P. J., A. F. Wade, M. E. Gwilliam, A. M. Peters, M. J. Myers, S. G. Gilbey, S. R. Bloom, et J. Calam. 1993. « Amino acid infusion blocks renal tubular uptake of an indium-labelled somatostatin analogue. ». *British Journal of Cancer* 67 (6): 1437-39.
- Henrich, Ute, et Martina Benešová. 2020. « [68Ga]Ga-DOTA-TOC: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging ». *Pharmaceuticals* 13 (3): 38. <https://doi.org/10.3390/ph13030038>.
- Henrich, Ute, et Klaus Kopka. 2019. « Lutathera®: The First FDA- and EMA-Approved Radiopharmaceutical for Peptide Receptor Radionuclide Therapy ». *Pharmaceuticals* 12 (3): 114. <https://doi.org/10.3390/ph12030114>.
- Herrmann, Ken, Margret Schottelius, Constantin Lapa, Theresa Osl, Andreas Poschenrieder, Heribert Hänscheid, Katharina Lückerath, et al. 2016. « First-in-Human Experience of CXCR4-Directed Endoradiotherapy with 177Lu- and 90Y-Labeled Pentixather in Advanced-Stage Multiple Myeloma with Extensive Intra- and Extramedullary Disease ». *Journal of Nuclear Medicine* 57 (2): 248-51. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.167361>.

- Heynick, Frank. 2009. « The Original 'Magic Bullet' Is 100 Years Old ». *The British Journal of Psychiatry* 195 (5): 456-456. <https://doi.org/10.1192/bjp.195.5.456>.
- Hoffmann, E. J., M. E. Phelps, N. A. Mullani, C. S. Higgins, et M. M. Ter-Pogossian. 1976. « Design and Performance Characteristics of a Whole-Body Positron Transaxial Tomograph ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 17 (6): 493-502.
- Hofgaard, Peter O., Henriette C. Jodal, Kurt Bommert, Bertrand Huard, Jo Caers, Harald Carlsen, Rolf Schwarzer, et al. 2012. « A Novel Mouse Model for Multiple Myeloma (MOPC315.BM) That Allows Noninvasive Spatiotemporal Detection of Osteolytic Disease ». *PLoS ONE* 7 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051892>.
- Holmberg, Carl G., C.-B Laurell, et Poul Gjertsen. 1948. « Investigations in Serum Copper. II. Isolation of the Copper Containing Protein, and a Description of Some of Its Properties. » *Acta Chemica Scandinavica* 2: 550-56. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.02-0550>.
- Howell, Roger W. 2023. « Advancements in the use of Auger electrons in science and medicine during the period 2015–2019 ». *International Journal of Radiation Biology* 99 (1): 2-27. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1831706>.
- Idée, Jean-Marc, Stéphanie Louguet, Sébastien Ballet, et Claire Corot. 2013. « Theranostics and contrast-agents for medical imaging: a pharmaceutical company viewpoint ». *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* 3 (6): 292-97. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2013.12.06>.
- Ishida, Seiko, Pénélope Andreux, Carole Poitry-Yamate, Johan Auwerx, et Douglas Hanahan. 2013. « Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (48): 19507-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318431110>.
- Itoh, Shinichi, Ha Won Kim, Osamu Nakagawa, Kiyoshi Ozumi, Susan M. Lessner, Hiroki Aoki, Kamran Akram, Ronald D. McKinney, Masuko Ushio-Fukai, et Tohru Fukai. 2008. « Novel Role of Antioxidant-1 (Atox1) as a Copper-Dependent Transcription Factor Involved in Cell Proliferation ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (14): 9157-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709463200>.
- Jagannath, Sundar, Leonard T. Heffner, Sikander Ailawadhi, Nikhil C. Munshi, Todd M. Zimmerman, Jacalyn Rosenblatt, Sagar Lonial, et al. 2019. « Indatuximab Ravtansine (BT062) Monotherapy in Patients With Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma ». *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 19 (6): 372-80. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2019.02.006>.
- Jalilian, Amir Reza, et Joao Osso Jr. 2017. « The current status and future of theranostic Copper-64 radiopharmaceuticals ». *Iranian Journal of Nuclear Medicine* 25 (1): 1-10.
- Jamar, François, Raffaella Barone, Isabelle Mathieu, Stéphan Walrand, Daniel Labar, Pascal Carlier, Joëlle De Camps, et al. 2003. « 86Y-DOTA0-d-Phe1-Tyr3-Octreotide (SMT487)—a Phase 1 Clinical Study: Pharmacokinetics, Biodistribution and Renal Protective Effect of Different Regimens of Amino Acid Co-Infusion ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 30 (4): 510-18. <https://doi.org/10.1007/s00259-003-1117-1>.
- Jamet, Bastien, Elena Zamagni, Cristina Nanni, Clément Bailly, Thomas Carlier, Cyrille Touzeau, Anne-Victoire Michaud, Philippe Moreau, Caroline Bodet-Milin, et Françoise Kraeber-Bodere. 2020. « Functional Imaging for Therapeutic Assessment and Minimal Residual Disease Detection in Multiple Myeloma ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (15): 5406. <https://doi.org/10.3390/ijms21155406>.
- Jan, S., G. Santin, D. Strul, S. Staelens, K. Assié, D. Autret, S. Avner, et al. 2004. « GATE - Geant4 Application for Tomographic Emission: a simulation toolkit for PET and SPECT ». *Physics in Medicine and Biology* 49 (19): 4543-61.
- Jaszczak, Ronald J., Paul H. Murphy, Diane Huard, et John A. Burdine. 1977. « Radionuclide Emission Computed Tomography of the Head with 99mTc and a Scintillation Camera ». *Journal of Nuclear Medicine* 18 (4): 373-80.

- Jiang, Wei, Yamn Chalich, et M. Jamal Deen. 2019. « Sensors for Positron Emission Tomography Applications ». *Sensors (Basel, Switzerland)* 19 (22): 5019. <https://doi.org/10.3390/s19225019>.
- Jin, Zhao-Hui, Takako Furukawa, Tomoyuki Ohya, Mélissa Degardin, Aya Sugyo, Atsushi B. Tsuji, Yasuhisa Fujibayashi, et al. 2017. « ^{67}Cu -Radiolabeling of a multimeric RGD peptide for $\alpha\text{V}\beta 3$ integrin-targeted radionuclide therapy: stability, therapeutic efficacy, and safety studies in mice ». *Nuclear Medicine Communications* 38 (4): 347-55. <https://doi.org/10.1097/MNM.0000000000000646>.
- Jin, Zhao-Hui, Atsushi B. Tsuji, Mélissa Degardin, Aya Sugyo, Yukie Yoshii, Kotaro Nagatsu, Ming-Rong Zhang, et al. 2018. « Uniform Intratumoral Distribution of Radioactivity Produced Using Two Different Radioagents, ^{64}Cu -Cyclam-RAFT-c(-RGDfK-)4 and ^{64}Cu -ATSM, Improves Therapeutic Efficacy in a Small Animal Tumor Model ». *EJNMMI Research* 8 (1): 54. <https://doi.org/10.1186/s13550-018-0407-3>.
- Johnbeck, Camilla B., Ulrich Knigge, Annika Loft, Anne K. Berthelsen, Jann Mortensen, Peter Oturai, Seppo W. Langer, Dennis R. Elema, et Andreas Kjaer. 2017. « Head-to-Head Comparison of ^{64}Cu -DOTATATE and ^{68}Ga -DOTATOC PET/CT: A Prospective Study of 59 Patients with Neuroendocrine Tumors ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 58 (3): 451-57. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.180430>.
- Kaler, Stephen G., et Andrew T. DiStasio. 1993. « ATP7A-Related Copper Transport Disorders ». In *GeneReviews®*, édité par Margaret P. Adam, David B. Everman, Ghayda M. Mirzaa, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora JH Bean, Karen W. Gripp, et Anne Amemiya. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1413/>.
- Kaminski, Mark S., Kenneth R. Zasadny, Isaac R. Francis, Adam W. Milik, Charles W. Ross, Scott D. Moon, Shelley M. Crawford, et al. 1993. « Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with [^{131}I]Anti-B1 (Anti-CD20) Antibody ». *New England Journal of Medicine* 329 (7): 459-65. <https://doi.org/10.1056/NEJM199308123290703>.
- Kanse, Prakash, et Seshikanth Middela. 2009. « Nonsecretory Multiple Myeloma ». *Indian Journal of Orthopaedics* 43 (4): 408. <https://doi.org/10.4103/0019-5413.55979>.
- Kaplon, Hélène, Alicia Chenoweth, Silvia Crescioli, et Janice M. Reichert. 2022. « Antibodies to Watch in 2022 ». *MAbs* 14 (1): 2014296. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.2014296>.
- Kassis, Amin I. 2008. « Therapeutic Radionuclides: Biophysical and Radiobiologic Principles ». *Seminars in nuclear medicine* 38 (5): 358-66. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2008.05.002>.
- Kasztura, Miriam, Aude Richard, Nefti-Eboni Bempong, Dejan Loncar, et Antoine Flahault. 2019. « Cost-Effectiveness of Precision Medicine: A Scoping Review ». *International Journal of Public Health* 64 (9): 1261-71. <https://doi.org/10.1007/s00038-019-01298-x>.
- Kazandjian, Dickran. 2016. « Multiple myeloma epidemiology and survival, a unique malignancy ». *Seminars in oncology* 43 (6): 676-81. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.11.004>.
- Keinänen, Outi, Kimberly Fung, James M. Brennan, Nicholas Zia, Matt Harris, Ellen van Dam, Colin Biggin, et al. 2020. « Harnessing ^{64}Cu / ^{67}Cu for a theranostic approach to pretargeted radioimmunotherapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (45): 28316-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009960117>.
- Kelkar, Sneha S., et Theresa M. Reineke. 2011. « Theranostics: Combining Imaging and Therapy ». *Bioconjugate Chemistry* 22 (10): 1879-1903. <https://doi.org/10.1021/bc200151q>.
- Khosravifarsani, Meysam, Samia Ait-Mohand, Benoit Paquette, Léon Sanche, et Brigitte Guérin. 2022. « In Vivo Behavior of [^{64}Cu]NOTA-Terpyridine Platinum, a Novel Chemo-Radio-Theranostic Agent for Imaging, and Therapy of Colorectal Cancer ». *Frontiers in Medicine* 9: 975213. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.975213>.

- Kiba, Takayoshi, Takuo Ito, Toshihisa Nakashima, Yoshiko Okikawa, Miki Kido, Akiko Kimura, Keita Kameda, et al. 2014. « Bortezomib and dexamethasone for multiple myeloma: higher AST and LDH levels associated with a worse prognosis on overall survival ». *BMC Cancer* 14 (juin): 462. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-462>.
- Kim, Su Jin, et Ho-Young Lee. 2022. « In vivo molecular imaging in preclinical research ». *Laboratory Animal Research* 38 (octobre): 31. <https://doi.org/10.1186/s42826-022-00142-3>.
- Kind, Simon, Christina Merenkow, Franziska Büscheck, Katharina Möller, David Dum, Viktoria Chirico, Andreas M. Luebke, et al. 2019. « Prevalence of Syndecan-1 (CD138) Expression in Different Kinds of Human Tumors and Normal Tissues ». *Disease Markers* 2019: 4928315. <https://doi.org/10.1155/2019/4928315>.
- Knowles, Scott M., et Anna M. Wu. 2012. « Advances in Immuno-Positron Emission Tomography: Antibodies for Molecular Imaging in Oncology ». *Journal of Clinical Oncology* 30 (31): 3884-92. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.4887>.
- Köhler, G., et C. Milstein. 1975. « Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity ». *Nature* 256 (5517): 495-97. <https://doi.org/10.1038/256495a0>.
- Kostelnik, Thomas I., et Chris Orvig. 2019. « Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy ». *Chemical Reviews* 119 (2): 902-56. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00294>.
- Koster, Elizabeth J de, Lioe-Fee de Geus-Oei, Olaf M Dekkers, Ilse van Engen-van Grunsven, Jaap Hamming, Eleonora P M Corssmit, Hans Morreau, et al. 2018. « Diagnostic Utility of Molecular and Imaging Biomarkers in Cytological Indeterminate Thyroid Nodules ». *Endocrine Reviews* 39 (2): 154-91. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00133>.
- Kratochwil, C., F. Bruchertseifer, F. L. Giesel, M. Weis, F. A. Verburg, F. Mottaghy, K. Kopka, C. Apostolidis, U. Haberkorn, et A. Morgenstern. 2016. « 225Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Journal of Nuclear Medicine* 57 (12): 1941-44. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.178673>.
- Kraus, Sabrina, Philipp Klassen, Malte Kircher, Alexander Dierks, Stefan Habringer, Alexander Gäble, Klaus Martin Kortüm, et al. 2022. « Reduced splenic uptake on 68Ga-Pentixafor-PET/CT imaging in multiple myeloma - a potential imaging biomarker for disease prognosis ». *Theranostics* 12 (13): 5986-94. <https://doi.org/10.7150/thno.75847>.
- Kusić, Zvonko, David V. Becker, Eugene L. Saenger, Peter Paras, Peter Gartside, Terry Wessler, et Šime Spaventi. 1990. « Comparison of Technetium-99m and Iodine 123 Imaging of Thyroid Nodules: Correlation with Pathologic Findings ». *Journal of Nuclear Medicine* 31 (4): 393-99.
- Kyle, RA, et SV Rajkumar. 2009. « Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma ». *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 23 (1): 3-9. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.291>.
- Laliberté, Julie, et Simon Labbé. 2008. « Les bases moléculaires de l'approvisionnement en cuivre - Leçons tirées de la levure ». *médecine/sciences* 24 (3): 277-83. <https://doi.org/10.1051/medsci/2008243277>.
- Le Bihan, Thomas, Anne-Sophie Navarro, Nathalie Le Bris, Patricia Le Saëc, Sébastien Gouard, Ferid Haddad, Jean-François Gestin, Michel Chérel, Alain Faivre-Chauvet, et Raphaël Tripier. 2018. « Synthesis of C-Functionalized TE1PA and Comparison with Its Analogues. An Example of Bioconjugation on 9E7.4 MAb for Multiple Myeloma 64Cu-PET Imaging ». *Organic & Biomolecular Chemistry* 16 (23): 4261-71. <https://doi.org/10.1039/c8ob00499d>.
- Lech, Gustaw, Robert Słotwiński, Maciej Słodkowski, et Ireneusz Wojciech Krasnodębski. 2016. « Colorectal Cancer Tumour Markers and Biomarkers: Recent Therapeutic Advances ». *World Journal of Gastroenterology* 22 (5): 1745-55. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i5.1745>.

- Lee, Inki, Ilhan Lim, Byung Hyun Byun, Byung Il Kim, Chang Woon Choi, Sang-Keun Woo, Kwang Il Kim, et al. 2021. « A Preliminary Clinical Trial to Evaluate ^{64}Cu -NOTA-Trastuzumab as a Positron Emission Tomography Imaging Agent in Patients with Breast Cancer ». *EJNMMI Research* 11 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/s13550-021-00746-1>.
- Lee, Jaekwon, Maria Marjorette O. Peña, Yasuhiro Nose, et Dennis J. Thiele. 2002. « Biochemical Characterization of the Human Copper Transporter Ctr1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (6): 4380-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104728200>.
- Lepareur, Nicolas. 2022. « Cold Kit Labeling: The Future of ^{68}Ga Radiopharmaceuticals? ». *Frontiers in Medicine* 9 (février): 812050. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.812050>.
- Lewis, Jason S., Richard Laforest, Thomas L. Buettner, Sheng-Kwei Song, Yasuhisa Fujibayashi, Judith M. Connett, et Michael J. Welch. 2001. « Copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone): An agent for radiotherapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (3): 1206-11.
- Lewis, Jason S., Richard Laforest, Farrokh Dehdashti, Perry W. Grigsby, Michael J. Welch, et Barry A. Siegel. 2008. « An Imaging Comparison of ^{64}Cu -ATSM and ^{60}Cu -ATSM in Cancer of the Uterine Cervix ». *Journal of Nuclear Medicine* 49 (7): 1177-82. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.051326>.
- Lewis, Jason S., Michael R. Lewis, P. Duffy Cutler, Ananth Srinivasan, Michelle A. Schmidt, Sally W. Schwarz, Margaret M. Morris, J. Philip Miller, et Carolyn J. Anderson. 1999. « Radiotherapy and Dosimetry of ^{64}Cu -TETA-Tyr3-Octreotate in a Somatostatin Receptor-Positive, Tumor-Bearing Rat Model ». *Clinical Cancer Research* 5 (11): 3608-16.
- Lin, S J, et V C Culotta. 1995. « The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (9): 3784-88.
- Lutsenko, Svetlana. 2010. « Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways ». *Current opinion in chemical biology* 14 (2): 211-17. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.003>.
- MacDonald, Gwen, Ivan Nalvarte, Tatiana Smirnova, Manuela Vecchi, Nicola Aceto, Arno Dolemeyer, Anna Frei, et al. 2014. « Memo Is a Copper-Dependent Redox Protein with an Essential Role in Migration and Metastasis ». *Science Signaling* 7 (329): ra56. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004870>.
- Machac, Josef, Stephen L. Bacharach, Timothy M. Bateman, Jeroen J. Bax, Robert Beanlands, Frank Bengel, Steven R. Bergmann, et al. 2006. « Positron Emission Tomography Myocardial Perfusion and Glucose Metabolism Imaging ». *Journal of Nuclear Cardiology* 13 (6): e121-51. <https://doi.org/10.1016/j.nuclcard.2006.08.009>.
- Madsen, Erik, et Jonathan D. Gitlin. 2007. « Copper and Iron Disorders of the Brain ». *Annual Review of Neuroscience* 30 (1): 317-37. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094232>.
- Mahtouk, K., F. W. Cremer, T. Rème, M. Jourdan, M. Baudard, J. Moreaux, G. Requirand, et al. 2006. « Heparan Sulphate Proteoglycans Are Essential for the Myeloma Cell Growth Activity of EGF-Family Ligands in Multiple Myeloma ». *Oncogene* 25 (54): 7180-91. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209699>.
- Manning, L. S., J. D. Berger, H. L. O'Donoghue, G. N. Sheridan, P. G. Claringbold, et J. H. Turner. 1992. « A Model of Multiple Myeloma: Culture of 5T33 Murine Myeloma Cells and Evaluation of Tumorigenicity in the C57BL/KaLwRij Mouse ». *British Journal of Cancer* 66 (6): 1088-93. <https://doi.org/10.1038/bjc.1992.415>.
- Martiniova, Lucia, Louis De Palatis, Elba Etchebehere, et Gregory Ravizzini. 2016. « Gallium-68 in Medical Imaging ». *Current Radiopharmaceuticals* 9 (3): 187-207. <https://doi.org/10.2174/1874471009666161028150654>.
- Marusyk, Andriy, et Kornelia Polyak. 2010. « Tumor heterogeneity: causes and consequences ». *Biochimica et biophysica acta* 1805 (1): 105. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.11.002>.
- McArdle, H. J., S. M. Gross, D. M. Danks, et A. G. Wedd. 1990. « Role of albumin's copper binding site in copper uptake by mouse hepatocytes ». *American Journal of Physiology-*

- Gastrointestinal and Liver Physiology* 258 (6): G988-91.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.1990.258.6.G988>.
- Meyerholz, David K., Mariah R. Leidinger, J. Adam Goeken, Thomas R. Businga, Allison Akers, Sebastian Vizuet, Courtney A. Kaemmer, Jordan L. Kohlmeyer, Rebecca D. Dodd, et Dawn E. Quelle. 2022. « Utility of CD138/Syndecan-1 Immunohistochemistry for Localization of Plasmacytes Is Tissue-Dependent in B6 Mice ». *BMC Research Notes* 15 (1): 219.
<https://doi.org/10.1186/s13104-022-06100-5>.
- Mikołajczak, Renata, et Helmut R. Maecke. 2016. « Radiopharmaceuticals for Somatostatin Receptor Imaging ». *Nuclear Medicine Review* 19 (2): 126-32.
<https://doi.org/10.5603/NMR.2016.0024>.
- Milot, Marie-Christine, Ophélie Bélissant-Benesty, Véronique Dumulon-Perreault, Samia Ait-Mohand, Sameh Geha, Patrick O. Richard, Étienne Rousseau, et Brigitte Guérin. 2023. « Theranostic ⁶⁴Cu-DOTHA2-PSMA Allows Low Toxicity Radioligand Therapy in Mice Prostate Cancer Model ». *Frontiers in Oncology* 13: 1073491.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1073491>.
- Milot, Marie-Christine, Ophélie Bélissant Benesty, Véronique Dumulon-Perreault, Samia Ait-Mohand, Patrick O. Richard, Étienne Rousseau, et Brigitte Guérin. 2022. « ⁶⁴Cu-DOTHA2-PSMA, a Novel PSMA PET Radiotracer for Prostate Cancer with a Long Imaging Time Window ». *Pharmaceuticals* 15 (8): 996. <https://doi.org/10.3390/ph15080996>.
- Morais, Mauricio, et Michelle T. Ma. 2018. « Site-specific chelator-antibody conjugation for PET and SPECT imaging with radiometals ». *Drug Discovery Today. Technologies* 30 (octobre): 91-104. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.10.002>.
- Moreau, P., J. San Miguel, P. Sonneveld, M.V. Mateos, E. Zamagni, H. Avet-Loiseau, R. Hajek, et al. 2017. « Multiple Myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up ». *Annals of Oncology* 28 (juillet): iv52-61.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdx096>.
- Moreau, Philippe, Michel Attal, et Thierry Facon. 2015. « Frontline therapy of multiple myeloma ». *Blood* 125 (20): 3076-84. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-568915>.
- Moreau, Philippe, Michel Attal, Cyrille Hulin, Bertrand Arnulf, Karim Belhadj, Lotfi Benboubker, Marie C Béné, et al. 2019. « Bortezomib, Thalidomide, and Dexamethasone with or without Daratumumab before and after Autologous Stem-Cell Transplantation for Newly Diagnosed Multiple Myeloma (CASSIOPEIA): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Study ». *The Lancet* 394 (10192): 29-38. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31240-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31240-1).
- Moreau, Philippe, Alfred L. Garfall, Niels W. C. J. van de Donk, Hareth Nahi, Jesús F. San-Miguel, Albert Oriol, Ajay K. Nooka, et al. 2022. « Teclistamab in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma ». *The New England Journal of Medicine* 387 (6): 495-505.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2203478>.
- Mortimer, Joanne E., James R. Bading, David M. Colcher, Peter S. Conti, Paul H. Frankel, Mary I. Carroll, Shan Tong, et al. 2014. « Functional Imaging of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer Using (⁶⁴Cu-DOTA-Trastuzumab PET ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 55 (1): 23-29. <https://doi.org/10.2967/jnumed.113.122630>.
- Mortimer, Joanne E., James R. Bading, Jinha M. Park, Paul H. Frankel, Mary I. Carroll, Tri T. Tran, Erasmus K. Poku, et al. 2018. « Tumor Uptake of ⁶⁴Cu-DOTA-Trastuzumab in Patients with Metastatic Breast Cancer ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 59 (1): 38-43. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.193888>.
- Müller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, et al. 2001. « Involvement of Chemokine Receptors in Breast Cancer Metastasis ». *Nature* 410 (6824): 50-56. <https://doi.org/10.1038/35065016>.
- Murphy, Philip M., et Lauren Heusinkveld. 2018. « Multisystem Multitasking by CXCL12 and Its Receptors CXCR4 and ACKR3 ». *Cytokine, Special issue: Chemokines - beyond chemotaxis*, 109 (septembre): 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.12.022>.

- Nagarsheth, Nisha, Max S. Wicha, et Weiping Zou. 2017. « Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy ». *Nature reviews. Immunology* 17 (9): 559-72. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.49>.
- Nagasawa, T., S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani, et T. Kishimoto. 1996. « Defects of B-Cell Lymphopoiesis and Bone-Marrow Myelopoiesis in Mice Lacking the CXC Chemokine PBSF/SDF-1 ». *Nature* 382 (6592): 635-38. <https://doi.org/10.1038/382635a0>.
- Navarro, Anne-Sophie, Thomas Le Bihan, Patricia Le Saëc, Nathalie Le Bris, Clément Bailly, Catherine Sai-Maurel, Mickaël Bourgeois, Michel Chérel, Raphaël Tripier, et Alain Faivre-Chauvet. 2019. « TE1PA as Innovating Chelator for 64Cu Immuno-TEP Imaging: A Comparative in Vivo Study with DOTA/NOTA by Conjugation on 9E7.4 mAb in a Syngeneic Multiple Myeloma Model ». *Bioconjugate Chemistry* 30 (9): 2393-2403. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00510>.
- Neumann, Peter Z., et Andrew Sass-Kortsak. 1967. « The State of Copper in Human Serum: Evidence for an Amino Acid-Bound Fraction ». *The Journal of Clinical Investigation* 46 (4): 646-58. <https://doi.org/10.1172/JCI105566>.
- Ng, Quinn Kwan-Tai, Elizabeth Katherine Anna Triumbari, Negar Omidvari, Simon R. Cherry, Ramsey D. Badawi, et Lorenzo Nardo. 2022. « Total-Body PET/CT – First Clinical Experiences and Future Perspectives ». *Seminars in Nuclear Medicine* 52 (3): 330-39. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2022.01.002>.
- Nimmagadda, Sridhar, Mrudula Pullambhatla, et Martin G. Pomper. 2009. « Immunoimaging of CXCR4 Expression in Brain Tumor Xenografts Using SPECT/CT ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 50 (7): 1124-30. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.061325>.
- Ouellette, Michel M., Sumin Zhou, et Ying Yan. 2022. « Cell Signaling Pathways That Promote Radioresistance of Cancer Cells ». *Diagnostics* 12 (3): 656. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12030656>.
- Palumbo, Antonio, Asher Chanan-Khan, Katja Weisel, Ajay K. Nooka, Tamas Masszi, Meral Beksac, Ivan Spicka, et al. 2016. « Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma ». *New England Journal of Medicine* 375 (8): 754-66. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606038>.
- Paton-Hough, J., A. D. Chantry, et M. A. Lawson. 2015. « A Review of Current Murine Models of Multiple Myeloma Used to Assess the Efficacy of Therapeutic Agents on Tumour Growth and Bone Disease ». *Bone* 77 (août): 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.004>.
- Peled, Amnon, Shiri Klein, Katia Beider, Jan A. Burger, et Michal Abraham. 2018. « Role of CXCL12 and CXCR4 in the Pathogenesis of Hematological Malignancies ». *Cytokine, Special issue: Chemokines - beyond chemotaxis*, 109 (septembre): 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.02.020>.
- Petris, M J, J F Mercer, J G Culvenor, P Lockhart, P A Gleeson, et J Camakaris. 1996. « Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. » *The EMBO Journal* 15 (22): 6084-95.
- Pfeifer, Andreas, Ulrich Knigge, Jann Mortensen, Peter Oturai, Anne Kiil Berthelsen, Annika Loft, Tina Binderup, et al. 2012. « Clinical PET of Neuroendocrine Tumors Using 64Cu-DOTATATE: First-in-Humans Study ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 53 (8): 1207-15. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.101469>.
- Phelps, Michael E., Edward J. Hoffman, Nizar A. Mullani, et Michel M. Ter-Pogossian. 1975. « Application of Annihilation Coincidence Detection to Transaxial Reconstruction Tomography ». *Journal of Nuclear Medicine* 16 (3): 210-24.
- Philipp-Abbrederis, Kathrin, Ken Herrmann, Stefan Knop, Margret Schottelius, Matthias Eiber, Katharina Lücknerath, Elke Pietschmann, et al. 2015. « In Vivo Molecular Imaging of Chemokine Receptor CXCR 4 Expression in Patients with Advanced Multiple Myeloma ». *EMBO Molecular Medicine* 7 (4): 477-87. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404698>.

- Plantin-Carrenard, E., M.-J. Foglietti, et J.-L. Beaudoux. 2005. « [Sodium/iodide symporter: physiopathological aspects and therapeutic perspectives] ». *Pathologie-Biologie* 53 (3): 174-82. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.06.003>.
- Poty, Sophie, Lynn C. Francesconi, Michael R. McDevitt, Michael J. Morris, et Jason S. Lewis. 2018a. « α -Emitters for Radiotherapy: From Basic Radiochemistry to Clinical Studies—Part 1 ». *Journal of Nuclear Medicine* 59 (6): 878-84. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.186338>.
- . 2018b. « α -Emitters for Radiotherapy: From Basic Radiochemistry to Clinical Studies—Part 2 ». *Journal of Nuclear Medicine* 59 (7): 1020-27. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.204651>.
- Poudel, Bibek, Ankush Mittal, Rojeet Shrestha, Mohammad Shamim Farooqui, Naval Kishor Yadav, et Pramod Shanker Shukla. 2012. « Liver Involvement in Multiple Myeloma: A Hospital Based Retrospective Study ». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13 (5): 2153-55. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.5.2153>.
- Pouget, Jean-Pierre, Catherine Lozza, Emmanuel Deshayes, Vincent Boudousq, et Isabelle Navarro-Teulon. 2015. « Introduction to Radiobiology of Targeted Radionuclide Therapy ». *Frontiers in Medicine* 2: 12. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00012>.
- Pouget, Jean-Pierre, Isabelle Navarro-Teulon, Manuel Bardiès, Nicolas Chouin, Guillaume Cartron, André Pèlegriin, et David Azria. 2011. « Clinical Radioimmunotherapy—the Role of Radiobiology ». *Nature Reviews Clinical Oncology* 8 (12): 720-34. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.160>.
- Pozzobon, Tommaso, Giacomo Goldoni, Antonella Viola, et Barbara Molon. 2016. « CXCR4 Signaling in Health and Disease ». *Immunology Letters* 177 (septembre): 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.06.006>.
- Press, O. W., J. F. Eary, F. R. Appelbaum, P. J. Martin, C. C. Badger, W. B. Nelp, S. Glenn, G. Butchko, D. Fisher, et B. Porter. 1993. « Radiolabeled-Antibody Therapy of B-Cell Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support ». *The New England Journal of Medicine* 329 (17): 1219-24. <https://doi.org/10.1056/NEJM199310213291702>.
- Puig, Sergi, Jaekwon Lee, Miranda Lau, et Dennis J. Thiele. 2002. « Biochemical and Genetic Analyses of Yeast and Human High Affinity Copper Transporters Suggest a Conserved Mechanism for Copper Uptake ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (29): 26021-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202547200>.
- Qin, Chunxia, Hongguang Liu, Kai Chen, Xiang Hu, Xiaowei Ma, Xiaoli Lan, Yongxue Zhang, et Zhen Cheng. 2014. « Theranostics of Malignant Melanoma with $^{64}\text{CuCl}_2$ ». *Journal of Nuclear Medicine* 55 (5): 812-17. <https://doi.org/10.2967/jnumed.113.133850>.
- Raaphorst, Renske M., Heli Savolainen, Mariangela Cantore, Evita Van de Steeg, Aren Van Waarde, Nicola A. Colabufo, Philip H. Elsinga, Adriaan A. Lammertsma, Albert D. Windhorst, et Gert Luurtsema. 2017. « Comparison of In Vitro Assays in Selecting Radiotracers for In Vivo P-Glycoprotein PET Imaging ». *Pharmaceuticals* 10 (3): 76. <https://doi.org/10.3390/ph10030076>.
- Rahmim, Arman, et Habib Zaidi. 2008. « PET versus SPECT: Strengths, Limitations and Challenges ». *Nuclear Medicine Communications* 29 (3): 193-207. <https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e3282f3a515>.
- Rajkumar, S. Vincent, Meletios A. Dimopoulos, Antonio Palumbo, Joan Blade, Giampaolo Merlini, María-Victoria Mateos, Shaji Kumar, et al. 2014. « International Myeloma Working Group Updated Criteria for the Diagnosis of Multiple Myeloma ». *The Lancet. Oncology* 15 (12): e538-548. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5).
- Rankowitz, S., J. S. Robertson, W. A. Higinbotham, et M. J. Rosenblum. 1961. « POSITRON SCANNER FOR LOCATING BRAIN TUMORS ». BNL-6041. Brookhaven National Lab., (BNL) Upton, N.Y. <https://doi.org/10.2172/4736421>.
- Rbah-Vidal, Latifa, Aurélien Vidal, Emilie M.F. Billaud, Sophie Besse, Isabelle Ranchon-Cole, Florence Mishellany, Yann Perrot, et al. 2017. « Theranostic Approach for Metastatic Pigmented Melanoma Using ICF15002, a Multimodal Radiotracer for Both PET Imaging

- and Targeted Radionuclide Therapy ». *Neoplasia* 19 (1): 17-27.
<https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.11.001>.
- Rees, Erin M., et Dennis J. Thiele. 2007. « Identification of a Vacuole-Associated Metalloreductase and Its Role in Ctr2-Mediated Intracellular Copper Mobilization* ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (30): 21629-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703397200>.
- Regős, Eszter, Katalin Karászi, Andrea Reszegi, András Kiss, Zsuzsa Schaff, Kornélia Baghy, et Ilona Kovalszky. 2020. « Syndecan-1 in Liver Diseases ». *Pathology & Oncology Research* 26 (2): 813-19. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00617-0>.
- Reissig, Falco, Gerd Wunderlich, Roswitha Runge, Robert Freudenberg, Armin Lühr, et Jörg Kotzerke. 2020. « The Effect of Hypoxia on the Induction of Strand Breaks in Plasmid DNA by Alpha-, Beta- and Auger Electron-Emitters 223Ra, 188Re, 99mTc and DNA-Binding 99mTc-Labeled Pyrene ». *Nuclear Medicine and Biology* 80-81 (janvier): 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2020.01.003>.
- Ren, Yuan, Xian Feng Li, et Xiu Juan Wang. 2016. « Radionuclide imaging and treatment of thyroid cancer ». *Frontiers in Bioscience-Landmark* 21 (6): 1187-93. <https://doi.org/10.2741/4449>.
- Reubi, Jean Claude. 2003. « Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy ». *Endocrine Reviews* 24 (4): 389-427. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0007>.
- Reubi, Jean Claude, et Helmut R. Maecke. 2008. « Peptide-Based Probes for Cancer Imaging ». *Journal of Nuclear Medicine* 49 (11): 1735-38. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.053041>.
- Ritt, Philipp, Hans Vija, Joachim Hornegger, et Torsten Kuwert. 2011. « Absolute Quantification in SPECT ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 38 (1): 69-77. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-1770-8>.
- Rondon, Aurélie, Jacques Rouanet, et Françoise Degoul. 2021. « Radioimmunotherapy in Oncology: Overview of the Last Decade Clinical Trials ». *Cancers* 13 (21): 5570. <https://doi.org/10.3390/cancers13215570>.
- Rosenblat, Todd L., Michael R. McDevitt, Deborah A. Mulford, Neeta Pandit-Taskar, Chaitanya R. Divgi, Katherine S. Panageas, Mark L. Heaney, et al. 2010. « Sequential Cytarabine and Alpha-Particle Immunotherapy with Bismuth-213-Lintuzumab (HuM195) for Acute Myeloid Leukemia ». *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16 (21): 5303-11. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0382>.
- Rousseau, Caroline, Ludovic Ferrer, Stéphane Supiot, Manuel Bardiès, François Davodeau, Alain Faivre-Chauvet, Pierre Baumgartner, et al. 2012. « Dosimetry Results Suggest Feasibility of Radioimmunotherapy Using Anti-CD138 (B-B4) Antibody in Multiple Myeloma Patients ». *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 33 (3): 679-88. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0362-y>.
- Rousseau, Caroline, Anne Lise Ruellan, Karine Bernardeau, Françoise Kraeber-Bodéré, Sebastien Gouard, Delphine Loussouarn, Catherine Saï-Maurel, et al. 2011. « Syndecan-1 Antigen, a Promising New Target for Triple-Negative Breast Cancer Immuno-PET and Radioimmunotherapy. A Preclinical Study on MDA-MB-468 Xenograft Tumors ». *EJNMMI Research* 1: 20. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-1-20>.
- Sadeghi, Mahdi, Milad Enferadi, et Alireza Shirazi. 2010. « External and Internal Radiation Therapy: Past and Future Directions ». *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 6 (3): 239-48. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.73324>.
- Sambade, Maria J., Randall J. Kimple, J. Terese Camp, Eldon Peters, Chad A. Livasy, Carolyn I. Sartor, et Janiel M. Shields. 2010. « Lapatinib in Combination with Radiation Diminishes Tumor Regrowth in HER2+ and Basal-like/EGFR+ Breast Tumor Xenografts ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 77 (2): 575-81. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.12.063>.

- Sanderson, R D, P Lalor, et M Bernfield. 1989. « B Lymphocytes Express and Lose Syndecan at Specific Stages of Differentiation. » *Cell Regulation* 1 (1): 27-35.
<https://doi.org/10.1091/mbc.1.1.27>.
- Sanderson, Ralph D., et Yang Yang. 2008. « Syndecan-1: A Dynamic Regulator of the Myeloma Microenvironment ». *Clinical & Experimental Metastasis* 25 (2): 149-59.
<https://doi.org/10.1007/s10585-007-9125-3>.
- Sartor, Oliver, Johann de Bono, Kim N. Chi, Karim Fizazi, Ken Herrmann, Kambiz Rahbar, Scott T. Tagawa, et al. 2021. « Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ». *New England Journal of Medicine* 385 (12): 1091-1103.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107322>.
- Schlienger, J. L., B. Goichot, et F. Grunenberger. 1997. « [Iodine and thyroid function] ». *La Revue De Medecine Interne* 18 (9): 709-16. [https://doi.org/10.1016/S0248-8663\(97\)83750-2](https://doi.org/10.1016/S0248-8663(97)83750-2).
- Segars, William P., Benjamin M. W. Tsui, Eric C. Frey, G. Allan Johnson, et Stuart S. Berr. 2004. « Development of a 4-D Digital Mouse Phantom for Molecular Imaging Research ». *Molecular Imaging and Biology* 6 (3): 149-59.
<https://doi.org/10.1016/j.mibio.2004.03.002>.
- Seidlin, S. M., L. D. Marinelli, et E. Oshry. 1990. « Radioactive Iodine Therapy: Effect on Functioning Metastases Ofadenocarcinoma of the Thyroid ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 40 (5): 299-317. <https://doi.org/10.3322/canjclin.40.5.299>.
- Shanbhag, Vinit, Kimberly Jasmer-McDonald, Sha Zhu, Adam L. Martin, Nikita Gudekar, Aslam Khan, Erik Ladomersky, Kamendra Singh, Gary A. Weisman, et Michael J. Petris. 2019. « ATP7A delivers copper to the lysyl oxidase family of enzymes and promotes tumorigenesis and metastasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (14): 6836-41. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817473116>.
- Sharma, Sai Kiran, Andrew Chow, Sebastien Monette, Delphine Vivier, Jacob Pourat, Kimberly J. Edwards, Thomas R. Dilling, et al. 2018. « Fc-Mediated Anomalous Biodistribution of Therapeutic Antibodies in Immunodeficient Mouse Models ». *Cancer Research* 78 (7): 1820-32. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1958>.
- Shekhawat, Amit Singh, Baljinder Singh, Pankaj Malhotra, Ankit Watts, Rajender Basher, Harneet Kaur, Monika Hooda, et Bishan D. Radotra. 2022. « Imaging CXCR4 Receptors Expression for Staging Multiple Myeloma by Using 68Ga-Pentixafor PET/CT: Comparison with 18F-FDG PET/CT ». *The British Journal of Radiology* 95 (1136): 20211272.
<https://doi.org/10.1259/bjr.20211272>.
- Silva, Daniela Almeida da, Anastasia De Luca, Rosanna Squitti, Mauro Rongioletti, Luisa Rossi, Camila M. L. Machado, et Giselle Cerchiaro. 2022. « Copper in Tumors and the Use of Copper-Based Compounds in Cancer Treatment ». *Journal of Inorganic Biochemistry* 226 (janvier): 111634. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111634>.
- Steinmeyer, David E., et Ellen L. McCormick. 2008. « The Art of Antibody Process Development ». *Drug Discovery Today* 13 (13): 613-18. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.04.005>.
- Strosberg, J., G. El-Haddad, E. Wolin, A. Hendifar, J. Yao, B. Chasen, E. Mittra, et al. 2017. « Phase 3 Trial of 177Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors ». *The New England journal of medicine* 376 (2): 125-35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607427>.
- Tagawa, S. T., S. Vallabhajosula, J. Osborne, S. J. Goldsmith, K. Petrillo, L. Tyrell, G. S. Dhillon, H. Beltran, N. H. Bander, et D. M. Nanus. 2010. « Phase I trial of fractionated-dose 177lutetium radiolabeled anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) monoclonal antibody J591 (177Lu-J591) in patients (pts) with metastatic castration-resistant prostate cancer (metCRPC). » *Journal of Clinical Oncology* 28 (15_suppl): 4667-4667.
https://doi.org/10.1200/jco.2010.28.15_suppl.4667.
- Tao, Kai, Min Fang, Joseph Alroy, et G. Gary Sahagian. 2008. « Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer ». *BMC Cancer* 8 (1): 228. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-228>.
- Task Group on Radiation Quality Effects in Radiological Protection, Committee 1 on Radiation Effects, International Commission on Radiological Protection. 2003. « Relative Biological Effectiveness (RBE), Quality Factor (Q), and Radiation Weighting Factor (w(R)). A Report

- of the International Commission on Radiological Protection ». *Annals of the ICRP* 33 (4): 1-117. [https://doi.org/10.1016/s0146-6453\(03\)00024-1](https://doi.org/10.1016/s0146-6453(03)00024-1).
- Ter-Pogossian, Michel M., Michael E. Phelps, Edward J. Hoffman, et Nizar A. Mullani. 1975. « A Positron-Emission Transaxial Tomograph for Nuclear Imaging (PETT) ». *Radiology* 114 (1): 89-98. <https://doi.org/10.1148/114.1.89>.
- Tomayko, M. M., et C. P. Reynolds. 1989. « Determination of Subcutaneous Tumor Size in Athymic (Nude) Mice ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 24 (3): 148-54. <https://doi.org/10.1007/BF00300234>.
- Tornesello, Anna Lucia, Luigi Buonaguro, Maria Lina Tornesello, et Franco Maria Buonaguro. 2017. « New Insights in the Design of Bioactive Peptides and Chelating Agents for Imaging and Therapy in Oncology ». *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 22 (8): 1282. <https://doi.org/10.3390/molecules22081282>.
- Townsend, DW. 2004. « Physical Principles and Technology of Clinical PET Imaging » 33 (2).
- Turesson, Ingemar, Stephanie A. Kovalchik, Ruth M. Pfeiffer, Sigurdur Y. Kristinsson, Lynn R. Goldin, Mark T. Drayson, et Ola Landgren. 2014. « Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Risk of Lymphoid and Myeloid Malignancies: 728 Cases Followed up to 30 Years in Sweden ». *Blood* 123 (3): 338-45. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-505487>.
- Turski, Michelle L., Donita C. Brady, Hyung J. Kim, Byung-Eun Kim, Yasuhiro Nose, Christopher M. Counter, Dennis R. Winge, et Dennis J. Thiele. 2012. « A Novel Role for Copper in Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling ». *Molecular and Cellular Biology* 32 (7): 1284-95. <https://doi.org/10.1128/MCB.05722-11>.
- Ullah, Tomalika Rahmat. 2019. « The Role of CXCR4 in Multiple Myeloma: Cells' Journey from Bone Marrow to beyond ». *Journal of Bone Oncology* 17 (août): 100253. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2019.100253>.
- Urso, Emanuela, et Michele Maffia. 2015. « Behind the Link between Copper and Angiogenesis: Established Mechanisms and an Overview on the Role of Vascular Copper Transport Systems ». *Journal of Vascular Research* 52 (3): 172-96. <https://doi.org/10.1159/000438485>.
- Van Wauwe, J P, J R De Mey, et J G Goossens. 1980. « OKT3: A Monoclonal Anti-Human T Lymphocyte Antibody with Potent Mitogenic Properties. » *The Journal of Immunology* 124 (6): 2708-13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.124.6.2708>.
- Vaz, Sofia C., Francisco Oliveira, Ken Herrmann, et Patrick Veit-Haibach. 2020. « Nuclear Medicine and Molecular Imaging Advances in the 21st Century ». *The British Journal of Radiology* 93 (1110): 20200095. <https://doi.org/10.1259/bjr.20200095>.
- Vegt, Erik, Marion de Jong, Jack F. M. Wetzels, Rosalinde Masereeuw, Marleen Melis, Wim J. G. Oyen, Martin Gotthardt, et Otto C. Boerman. 2010. « Renal Toxicity of Radiolabeled Peptides and Antibody Fragments: Mechanisms, Impact on Radionuclide Therapy, and Strategies for Prevention ». *Journal of Nuclear Medicine* 51 (7): 1049-58. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.075101>.
- Vermeulen, Koen, Mathilde Vandamme, Guy Bormans, et Frederik Cleeren. 2019. « Design and Challenges of Radiopharmaceuticals ». *Seminars in Nuclear Medicine, From Basic Science to Clinical Imaging*, 49 (5): 339-56. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2019.07.001>.
- Virgolini, Irene, Valentina Ambrosini, Jamshed B. Bomanji, Richard P. Baum, Stefano Fanti, Michael Gabriel, Nikolaos D. Papathanasiou, et al. 2010. « Procedure Guidelines for PET/CT Tumour Imaging with ⁶⁸Ga-DOTA-Conjugated Peptides: ⁶⁸Ga-DOTA-TOC, ⁶⁸Ga-DOTA-NOC, ⁶⁸Ga-DOTA-TATE ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 37 (10): 2004-10. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1512-3>.
- Waldschmidt, Johannes M., Anna Simon, Dagmar Wider, Stefan J. Müller, Marie Follo, Gabriele Ihorst, Sarah Decker, et al. 2017. « CXCL12 and CXCR7 Are Relevant Targets to Reverse Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance in Multiple Myeloma ». *British Journal of Haematology* 179 (1): 36-49. <https://doi.org/10.1111/bjh.14807>.

- Wängler, B., R. Schirmacher, P. Bartenstein, et C. Wängler. 2011. « Chelating Agents and Their Use in Radiopharmaceutical Sciences ». *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 11 (11): 968-83. <https://doi.org/10.2174/138955711797068445>.
- Wculek, Stefanie K., et Ilaria Malanchi. 2015. « Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells ». *Nature* 528 (7582): 413-17. <https://doi.org/10.1038/nature16140>.
- Weeks, Amanda J., Rowena L. Paul, Paul K. Marsden, Philip J. Blower, et Daniel R. Lloyd. 2010. « Radiobiological Effects of Hypoxia-Dependent Uptake of ^{64}Cu -ATSM: Enhanced DNA Damage and Cytotoxicity in Hypoxic Cells ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 37 (2): 330-38. <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1305-8>.
- Wei, Weijun, Zachary T. Rosenkrans, Jianjun Liu, Gang Huang, Quan-Yong Luo, et Weibo Cai. 2020. « ImmunoPET: Concept, Design, and Applications ». *Chemical reviews* 120 (8): 3787-3851. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00738>.
- Wei, Weijun, Muhsin H. Younis, Xiaoli Lan, Jianjun Liu, et Weibo Cai. 2022. « Single-Domain Antibody Theranostics on the Horizon ». *Journal of Nuclear Medicine* 63 (10): 1475-79. <https://doi.org/10.2967/jnumed.122.263907>.
- White, Jordan M., Freddy E. Escorcia, et Nerissa T. Viola. 2021. « Perspectives on metals-based radioimmunotherapy (RIT): moving forward ». *Theranostics* 11 (13): 6293-6314. <https://doi.org/10.7150/thno.57177>.
- Wittrup, K. Dane, Greg M. Thurber, Michael M. Schmidt, et John J. Rhoden. 2012. « PRACTICAL THEORETIC GUIDANCE FOR THE DESIGN OF TUMOR-TARGETING AGENTS ». *Methods in enzymology* 503: 255-68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396962-0.00010-0>.
- Witzig, Thomas E., Christine A. White, Leo I. Gordon, Gregory A. Wiseman, Christos Emmanouilides, James L. Murray, John Lister, et Pratik S. Multani. 2003. « Safety of Yttrium-90 Ibritumomab Tiuxetan Radioimmunotherapy for Relapsed Low-Grade, Follicular, or Transformed Non-Hodgkin's Lymphoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (7): 1263-70. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.08.043>.
- Yadav, Madhav Prasad, Sanjana Ballal, Ranjit Kumar Sahoo, Madhavi Tripathi, Amlash Seth, et Chandrasekhar Bal. 2020. « Efficacy and Safety of ^{225}Ac -PSMA-617 Targeted Alpha Therapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Patients ». *Theranostics* 10 (20): 9364-77. <https://doi.org/10.7150/thno.48107>.
- Yoshii, Yukie, Hiroki Matsumoto, Mitsuyoshi Yoshimoto, Yoko Oe, Ming-Rong Zhang, Kotaro Nagatsu, Aya Sugyo, Atsushi B. Tsuji, et Tatsuya Higashi. 2019. « ^{64}Cu -Intraperitoneal Radioimmunotherapy: A Novel Approach for Adjuvant Treatment in a Clinically Relevant Preclinical Model of Pancreatic Cancer ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 60 (10): 1437-43. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.225045>.
- Yoshii, Yukie, Mitsuyoshi Yoshimoto, Hiroki Matsumoto, Hideaki Tashima, Yuma Iwao, Hiroyuki Takuwa, Eiji Yoshida, et al. 2018. « Integrated treatment using intraperitoneal radioimmunotherapy and positron emission tomography-guided surgery with ^{64}Cu -labeled cetuximab to treat early- and late-phase peritoneal dissemination in human gastrointestinal cancer xenografts ». *Oncotarget* 9 (48): 28935-50. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25649>.
- Zhang, Ke, Jun Zhou, Xiao-Ming Li, et Chun-Lan Huang. 2020. « [Correlation between Expression of CXCL12, CXCR4, VEGF, MVD and Prognosis in Patients with Multiple Myeloma] ». *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 28 (6): 1962-71. <https://doi.org/10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2020.06.028>.
- Zhao, Wan-Hong, Bai-Yan Wang, Li-Juan Chen, Wei-Jun Fu, Jie Xu, Jie Liu, Shi-Wei Jin, et al. 2022. « Four-Year Follow-up of LCAR-B38M in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: A Phase 1, Single-Arm, Open-Label, Multicenter Study in China (LEGEND-2) ». *Journal of Hematology & Oncology* 15 (1): 86. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01301-8>.
- Zhou, Dong, Sung Hoon Kim, Wenhua Chu, Thomas Voller, et John A Katzenellenbogen. 2017. « Evaluation of Aromatic Radiobromination by Nucleophilic Substitution using

- Diaryliodonium Salt Precursors ». *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* 60 (9): 450-56. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3519>.
- Zhou, Dong, Haibing Zhou, Carl C. Jenks, Jason S. Lewis, John A. Katzenellenbogen, et Michael J. Welch. 2009. « Bromination from the Macroscopic Level to the Tracer Radiochemical Level: ^{76}Br Radiolabeling of Aromatic Compounds via Electrophilic Substitution ». *Bioconjugate chemistry* 20 (4): 808-16. <https://doi.org/10.1021/bc800313c>.
- Zhou, Yeye, Jihui Li, Xin Xu, Man Zhao, Bin Zhang, Shengming Deng, et Yiwei Wu. 2019. « ^{64}Cu -Based Radiopharmaceuticals in Molecular Imaging ». *Technology in Cancer Research & Treatment* 18 (janvier): 153303381983075. <https://doi.org/10.1177/1533033819830758>.

Communications

Communications internationales :

- **Workshop du Bono 22_25 Septembre 2021 (communication orale)**

“In vitro and in vivo evaluation of a ⁶⁴Cu-radiolabelled anti-CD 138 antibody for Multiple Myeloma imaging and dosimetry“

- **Workshop du Bono 22_25 Septembre 2021 (poster)**

“Theranostic evaluation of a copper-64 radiolabeled antibody in a mouse model of multiple myeloma”

- **Congrès annuel de l’association européenne de médecine nucléaire, EANM’21 20 – 23 Octobre 2021 (communication orale)**

OP1133 : “In vivo theranostic evaluation of a ⁶⁴Cu-radiolabelled antibody in a murine model of multiple myeloma”

- **ISRS 2022 du 29 mai au 2 juin 2022 (poster)**

« Development and in vitro evaluation of a copper-64 radiolabeled antibody for targeting the CXCR4 receptor in human multiple myeloma »

- **Workshop Erquy “New modalities in cancer imaging and therapy” du 5 au 8 octobre 2022 (poster)**

« Development and PET/CT preclinical evaluation of anti-CXCR4 antibody in triple-negative breast cancer (TNBC) murine model » (Poster en premier auteur, présenté au Workshop par la doctorante Nour El Ayoubi)

Communications régionales :

- **Les journées du canceropôle grand-ouest, juillet 2021 (poster)**

« Évaluation théranostique d’an anticorps radiomarqué au cuivre-64 dans un modèle murin de myélome multiple »

- **Journées scientifiques de l’École doctorale Biologie-Santé Bretagne Loire, décembre 2021 (poster)**

« In vivo theranostic evaluation of a ⁶⁴Cu-radiolabelled antibody in a murine model of multiple myeloma »

Communications internes :

- **La journée des doctorants CRCINA 2021 – 25 février 2021**

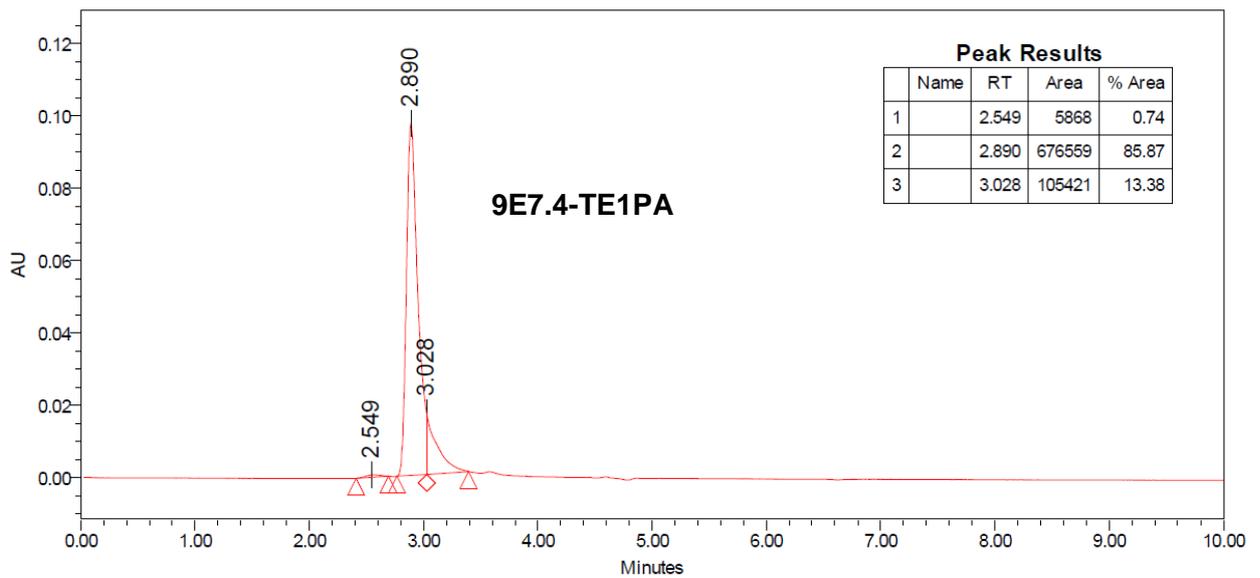
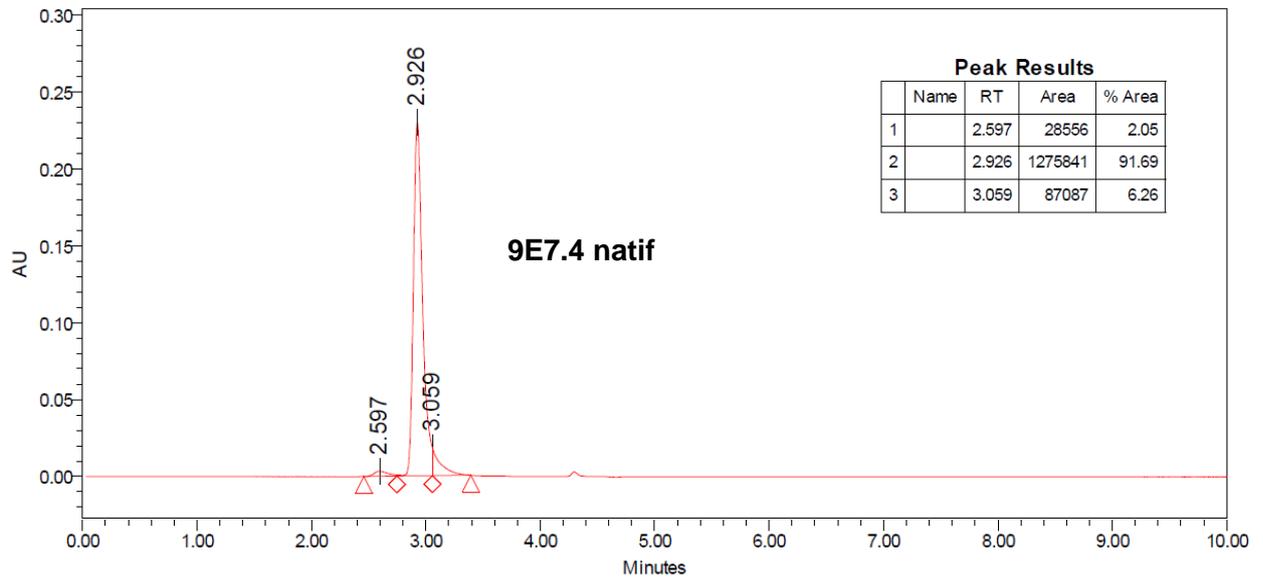
« Application théranostique du cuivre-64 dans un modèle murin de myélome multiple »

- **Séminaire du CRCINA – 17 décembre 2020 & 4 mai 2022**

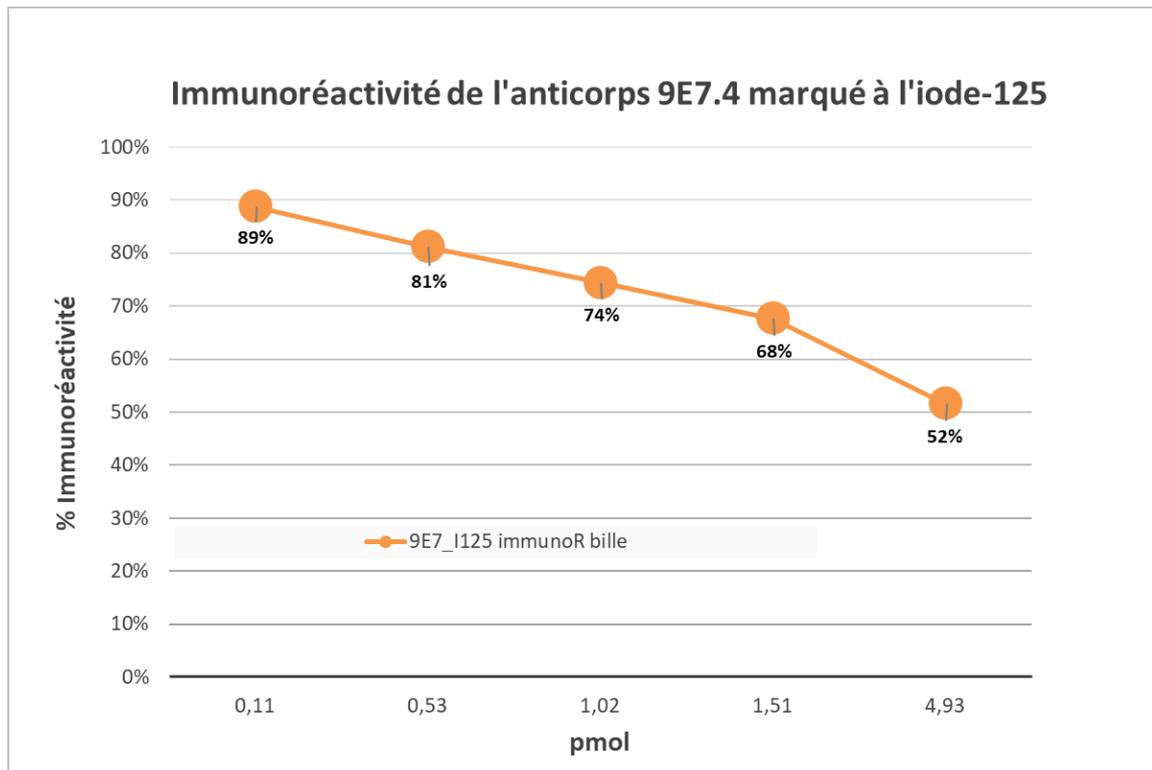
« Theranostic application of copper-64 in a murine model of multiple myeloma”

Annexes

Annexe 1 : Profil UPLC de l'anticorps 9E7.4 et de l'anticorps 9E7.4-TE1PA couplé avec 20 équivalents



Annexe 2 : Qualification des billes magnétiques couvertes du peptide 2 utilisées pour les contrôles d'immunoréactivité du [64Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, avec l'anticorps 9E7.4 natif radiomarqué à l'iode-125



Annexe 3 : Tableau de valeurs des %AD/millions de cellules lors du contrôle de captation cellulaire

		1 h p.i	24 h p.i	48 h p.i
[⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4	0,5 pmol	2,76 ± 0,09	7,45 ± 0,5	5,08 ± 0,29
	1 pmol	2,22 ± 0,43	7,87 ± 1,5	3,91 ± 0,23
	1,8 pmol	1,47 ± 0,19	5,2 ± 0,84	4,06 ± 0,18
	5,5 pmol	0,89 ± 0,14	4,05 ± 1,04	2,31 ± 0,13
[⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 + excès 9E7.4	0,5 pmol	0,49 ± 0,06	1,71 ± 0,14	1,01 ± 0,06
	1 pmol	0,47 ± 0,09	1,61 ± 0,27	0,96 ± 0,04
	1,8 pmol	0,28 ± 0,06	0,98 ± 0,18	0,95 ± 0,01
	5,5 pmol	0,29 ± 0,06	1,27 ± 0,23	0,86 ± 0,17
[⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-BSA	0,5 pmol	0,3 ± 0,08	0,64 ± 0,09	0,14 ± 0,03
	1 pmol	0,26 ± 0,05	0,36 ± 0,03	0,14 ± 0,03
	1,8 pmol	0,21 ± 0,09	0,25 ± 0,03	0,07 ± 0,003
	5,5 pmol	0,09 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,08 ± 0,02

Annexe 4 : Tableau de valeurs des %/DI/g à 5 min, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h du [64Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 chez des souris saines

[64Cu]Cu-TE1PA-9E7.4

	<i>5 min p.i</i>	<i>2 h p.i</i>	<i>24 h p.i</i>	<i>48 h p.i</i>	<i>72 h p.i</i>
Foie	35,79 ± 8,44	27,79 ± 12,32	21,82 ± 5,81*	15,0 ± 3,81*†	15,68 ± 1,39*
Sang	26,64 ± 7,84	14,62 ± 8,20†	6,96 ± 1,23*	5,34 ± 0,60*	2,75 ± 0,07*
Muscle	1,06 ± 0,21	0,92 ± 0,17	0,98 ± 0,27	0,84 ± 0,09	0,91 ± 0,16
Glandes salivaires	3,31 ± 1,10		3,79 ± 0,93	3,41 ± 0,35	3,07 ± 0,31*
Cerveau	1,21 ± 0,38	0,77 ± 0,36	0,40 ± 0,01	0,34 ± 0,05	0,39 ± 0,08
Ganglions	0,9 ± 0,22	0,81 ± 0,23	1,72 ± 0,38	1,46 ± 0,32	1,54 ± 0,21
Os (fémur)	2,06 ± 0,43	2,01 ± 0,96	1,92 ± 0,44	1,75 ± 0,39	1,52 ± 0,18
Poumons	11,01 ± 3,78	6,11 ± 3,15	6,48 ± 1,49	5,76 ± 1,20	5,80 ± 0,90*
Coeur	9,25 ± 3,07	5,13 ± 2,48	3,61 ± 0,79	2,98 ± 0,37	2,46 ± 0,20
Rate	6,91 ± 1,72	10,92 ± 4,73	13,67 ± 2,77*	12,52 ± 2,51*	11,79 ± 1,39*
Reins	9,77 ± 2,96	10,49 ± 4,67	8,76 ± 1,53	7,08 ± 0,77	5,21 ± 0,40*
Intestin vide	2,98 ± 0,83	3,78 ± 1,11	7,51 ± 1,48*	8,50 ± 1,34*	6,86 ± 0,69*
Estomac vide	1,67 ± 0,77	2,32 ± 0,39	3,47 ± 0,86	3,23 ± 0,77	3,24 ± 0,14*

* valeurs statistiquement différentes des valeurs obtenues dans la biodistribution des souris portant une tumeur s.c MOPC315.BM ; † valeurs statistiquement différentes de celle obtenue au temps p.i précédant (multiples t tests avec la méthode Holm-Sidak, p<0.05)

Annexe 5 : Tableau de valeurs des %/DI/g à 5 min, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h du [64Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 chez des souris porteuses d'une tumeur s.c MOPC315.BM

[64Cu]Cu-TE1PA-9E7.4					
	5 min p.i	2 h p.i	24 h p.i	48 h p.i	72 h p.i
Tumeur	9,20 ± 0,66	45,64 ± 5,14†	32,27 ± 5,75†	62,49 ± 17,15†	33,17 ± 12,53†
Foie	29,76 ± 0,43	23,47 ± 1,58†	10,39 ± 2,09*†	9,12 ± 1,53*†	7,25 ± 1,00*
Sang	27,75 ± 2,91	10,93 ± 0,43†	2,82 ± 0,28*†	2,52 ± 0,29*	1,40 ± 0,21*
Muscle	0,78 ± 0,15	0,71 ± 0,33	0,52 ± 0,09	0,43 ± 0,07	0,40 ± 0,04*
Glandes salivaires	2,51 ± 0,42	1,89 ± 0,33	1,52 ± 0,15	1,56 ± 0,14	1,07 ± 0,12
Cerveau	1,55 ± 0,15	0,35 ± 0,09	0,24 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,02
Ganglions	0,82 ± 0,17	1,35 ± 1,27	1,70 ± 0,64	0,98 ± 0,22	1,05 ± 0,44
Os (fémur)	1,96 ± 0,33	1,61 ± 0,33	0,87 ± 0,11	0,98 ± 0,07	0,74 ± 0,14
Poumons	12,62 ± 2,42	5,48 ± 0,26†	2,98 ± 0,26	3,12 ± 0,37	2,04 ± 0,26*
Coeur	8,94 ± 0,58	4,26 ± 0,28†	1,60 ± 0,09	1,56 ± 0,15	1,26 ± 0,15
Rate	5,32 ± 0,53	7,33 ± 1,17	4,92 ± 0,85*	6,15 ± 0,76*	4,27 ± 0,78*
Reins	8,58 ± 0,67	11,99 ± 1,04	6,84 ± 0,16†	6,10 ± 0,51	3,55 ± 0,14*
Intestin vide	2,33 ± 0,37	4,89 ± 0,74	2,99 ± 0,46*	3,98 ± 0,84*	2,02 ± 0,31*
Estomac vide	1,55 ± 0,18	2,20 ± 0,10	1,45 ± 0,15	1,78 ± 0,19	1,14 ± 0,14*

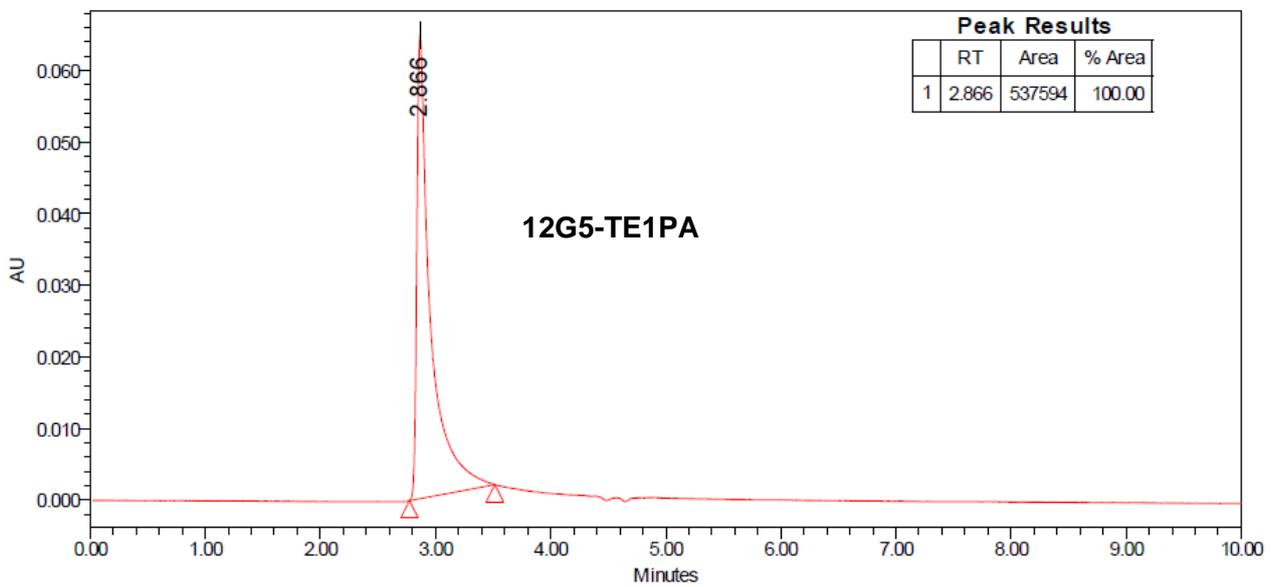
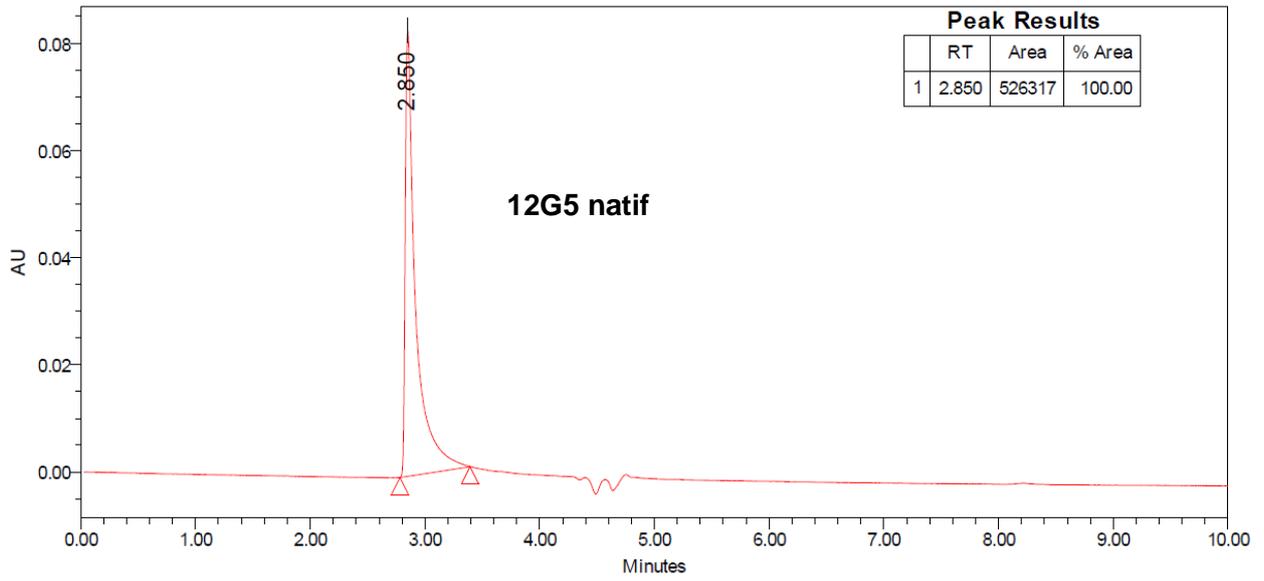
* valeurs statistiquement différentes des valeurs obtenues dans la biodistribution des souris saines ; † valeurs statistiquement différentes de celle obtenue au temps p.i précédant (multiples t tests avec la méthode Holm-Sidak, p<0.05)

Annexe 6 : Marqueurs biologiques relevés pour l'étude de la toxicité hépatique et rénale lors des expérimentations de RIV

	Marqueur biochimique	Description	Rôle comme marqueur si taux sanguin > valeurs physiologiques	Valeurs* physiologiques
Toxicité hépatique	Aspartate aminotransférase (AST)	Enzyme transaminase impliquée dans le métabolisme des acides aminés, présente dans les cellules musculaires et les cellules hépatiques	Reflète la destruction des cellules musculaires et hépatiques	233 ± 124 UI/l
	Alanine transaminase (ALT)	Enzyme transaminase impliquée dans le métabolisme des acides aminés, présente dans les cellules hépatiques	Reflète la destruction des cellules hépatiques	74 ± 52 UI/l
Toxicité rénale	Azote uréique du sang (BUN)	Produit final du métabolisme azoté des protéines	Reflète une atteinte rénale empêchant l'élimination des déchets de l'organisme	0,8 ± 0,1 g/l
	Créatinine	Déchet organique produit par les muscles et éliminé par les reins	Reflète une atteinte rénale empêchant l'élimination des déchets de l'organisme	5,2 ± 0,6 mg/l

**paramètres fournis par les laboratoires Janvier en 2011 pour des souris femelles BALB/cJrj âgées de 10 semaines*

Annexe 7 : Profil UPLC de l'anticorps 12G5 et de l'anticorps 12G5-TE1PA couplé avec 20 équivalents



Annexe 8 : Article publié

Article

Preclinical Evaluation of a ^{64}Cu -Based Theranostic Approach in a Murine Model of Multiple Myeloma

Cassandra Métivier ¹, Patricia Le Saëc ¹, Joëlle Gaschet ¹, Catherine Chauvet ¹, Séverine Marionneau-Lambot ², Peter O. Hofgaard ³ , Bjarne Bogen ³, Julie Pineau ⁴, Nathalie Le Bris ⁴ , Raphaël Tripier ⁴ , Cyrille Alliot ^{1,5}, Férid Haddad ^{6,5} , Michel Chérel ^{1,7} , Nicolas Chouin ⁸ , Alain Faivre-Chauvet ² and Latifa Rbah-Vidal ^{1,*} 

¹ Nantes Université, Inserm, CNRS, Université d'Angers, CRCI²NA, 44007 Nantes, France; cassandra.metivier@etu.univ-nantes.fr (C.M.); patricia.lesaec@univ-nantes.fr (P.L.S.); joelle.gaschet@univ-nantes.fr (J.G.); catherine.chauvet@univ-nantes.fr (C.C.); cyrille.alliot@univ-nantes.fr (C.A.); michel.cherel@univ-nantes.fr (M.C.)

² Nantes Université, Inserm, CNRS, Université d'Angers, CRCI²NA, CHU Nantes, 44007 Nantes, France; severine.marionneau-lambot@univ-nantes.fr (S.M.-L.); alain.faire-chauvet@univ-nantes.fr (A.F.-C.)

³ Department of Immunology, Oslo University Hospital, 04024 Oslo, Norway; p.o.hofgaard@medisin.uio.no (P.O.H.); bjarne.bogen@medisin.uio.no (B.B.)

⁴ Univ. Brest, UMR CNRS 6521 CEMCA, 6 Avenue Victor le Gorgeu, 29200 Brest, France; julie.pineau@univ-brest.fr (J.P.); nathalie.lebris@univ-brest.fr (N.L.B.); raphael.tripier@univ-brest.fr (R.T.)

⁵ GIP ARRONAX, 44800 Saint-Herblain, France

⁶ IMT Atlantique, Nantes Université, Subatech, 44307 Nantes, France; haddad@arronax-nantes.fr

⁷ Nuclear Medicine Department, ICO-René Gauducheau Cancer Center, 44800 Saint-Herblain, France

⁸ Nantes Université, Inserm, CNRS, Université d'Angers, Oniris, CRCI²NA, 44007 Nantes, France; nicolas.chouin@oniris-nantes.fr

* Correspondence: latifa.rbah-vidal@univ-nantes.fr



Citation: Métivier, C.; Le Saëc, P.; Gaschet, J.; Chauvet, C.; Marionneau-Lambot, S.; Hofgaard, P.O.; Bogen, B.; Pineau, J.; Le Bris, N.; Tripier, R.; et al. Preclinical Evaluation of a ^{64}Cu -Based Theranostic Approach in a Murine Model of Multiple Myeloma. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1817. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071817>

Academic Editor: Frank Wuest

Received: 5 May 2023

Revised: 16 June 2023

Accepted: 16 June 2023

Published: 25 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Although the concept of theranostics is neither new nor exclusive to nuclear medicine, it is a particularly promising approach for the future of nuclear oncology. This approach is based on the use of molecules targeting specific biomarkers in the tumour or its microenvironment, associated with optimal radionuclides which, depending on their emission properties, allow the combination of diagnosis by molecular imaging and targeted radionuclide therapy (TRT). Copper-64 has suitable decay properties (both β^+ and β^- decays) for PET imaging and potentially for TRT, making it both an imaging and therapy agent. We developed and evaluated a theranostic approach using a copper-64 radiolabelled anti-CD138 antibody, [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 in a MOPC315.BM mouse model of multiple myeloma. PET imaging using [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 allows for high-resolution PET images. Dosimetric estimation from ex vivo biodistribution data revealed acceptable delivered doses to healthy organs and tissues, and a very encouraging tumour absorbed dose for TRT applications. Therapeutic efficacy resulting in delayed tumour growth and increased survival without inducing major or irreversible toxicity has been observed with 2 doses of 35 MBq administered at a 2-week interval. Repeated injections of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 are safe and can be effective for TRT application in this syngeneic preclinical model of MM.

Keywords: theranostics; copper-64; PET imaging; targeted radionuclide therapy; dosimetry; CD138; multiple myeloma

1. Introduction

Precision medicine is fundamentally based on the accurate and specific targeting of cancer cells. This involves, where possible, patient selection based on biological or molecular imaging tests that subsequently allow eligible patients to be offered targeted therapy. This selection is necessary in order to secure patients that are more likely to respond and therefore avoid the use of expensive treatments on patients who are unlikely to respond. The impressive evolution of diagnostic technologies, combined with the

advent of targeted therapies, has largely contributed to the development of the concept of theranostics, which integrates diagnostic tools with therapeutic strategies and has become mainstream in personalized medicine.

In nuclear medicine, the concept of theranostics is based on the use of a single or two very similar radiopharmaceuticals named a “theranostic pair” for diagnosis and therapy. Ideally, this consists of a chemically and structurally identical (or nearly identical) vector labelled with a diagnostic or therapeutic radionuclide [1]. In some cases, the radionuclide may itself be both a diagnostic and a therapeutic agent. Indeed, some radionuclides have this particularity, including lutetium-177 (^{177}Lu ; β^- emitter) and copper-67 (^{67}Cu ; β^- decay and γ rays), or copper-64 (^{64}Cu ; both β^+ and β^- decays) and ^{149}Tb (both β^+ and α decays).

In recent years, several studies have shown an interest in evaluating the theranostic potential of copper-64 in cancer therapy. This interest is motivated by the particular decay properties of ^{64}Cu , which make it an almost perfect example of a theranostic radionuclide [2–4]. Indeed, ^{64}Cu emits both low-energy positrons, allowing one to obtain high resolution PET images when using low activity, and β^- particles and Auger electrons that allow, via adaptation of the administered activity, for the obtaining of a therapeutic effect.

In 2001 [5], [^{64}Cu]Cu-ATSM was evaluated as a treatment in a human colorectal tumour model transplanted in hamsters. Escalation of activity involving i.p. administration of increasing activities of [^{64}Cu]Cu-ATSM allowed identification of the effective activity margin (222 MBq < effective activity < 370 MBq) that induced a significant improvement in survival. The interest of dose fractionation was also evaluated (3×148 MBq at 3 days interval). In parallel, a 24-h PET imaging follow-up of [^{64}Cu]Cu-ATSM allowed for the monitoring of the evolution of the volume and the morphology of the tumours and the estimation of the dosimetry at the tumour.

More recently, Yoshii et al. [6] showed that intraperitoneal administration of 22.2 MBq of [^{64}Cu]Cu-PCTA-cetuximab during the early phase of administration disease development prolonged the survival of mice without inducing acute toxicity, while treatment during the late phase of disease development allowed PET imaging-guided microsurgery of disseminated tumours. These results show that the same radiopharmaceutical was firstly used to localize the tumour lesions and to guide ablative surgery, and secondly to confirm the absence of tumour residues after surgery. Some other preclinical studies have demonstrated the therapeutic properties of copper-64. In one of the first studies, published over 20 years ago [7], a copper-64-labelled somatostatin analogue, [^{64}Cu]Cu TETA-Tyr3-Octreotate was evaluated in a rat model of pancreatic cancer. The results show a significant slowing of tumour growth following a single dose injection (573.5 MBq) and a complete arrest of tumour growth for 10 days, before tumour regrowth with repeated doses (3×740 MBq at 2-day intervals). This treatment efficacy was accompanied by transient haematological and hepatic toxicity.

Beyond these promising results, other, more recent studies, have shown that copper-64 based therapy was only effective in combination with other anti-cancer treatments [8] or as adjuvant therapy [9]. In another study, two therapy experiments were performed simultaneously in a mouse model of glioblastoma s.c, with [^{64}Cu]Cu-RaftRGD, a peptide targeting integrins found in tumour neovessels, and [^{64}Cu]Cu-ATSM, which accumulates specifically in hypoxic areas [10]. Intravenous administration of [^{64}Cu]Cu-RaftRGD with [^{64}Cu]Cu-ATSM (18.5 MBq each) significantly increased the median survival of mice compared with the untreated group, whereas injection of 37 MBq of either treatment alone had no effect on improving median survival. In this study, it is the improved distribution of copper-64 within the tumour, via the targeting of two different aspects of its phenotype, that increases therapeutic efficacy.

Very recently, a vector targeting PSMA, [^{64}Cu]Cu-DOTA H_2 -PSMA, was evaluated for theranostic applications in mice bearing LNCaP prostate tumours, with very promising results for both imaging [11] and therapy [12]. PET imaging showed optimal tumour uptake at 4 h p.i. and evaluation of therapeutic potential showed that a single dose of 150 MBq

[⁶⁴Cu]Cu-DOTA-H2-PSMA or 120 MBq [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 significantly increased the median survival of mice compared with control mice in a similar manner and without inducing significant toxicity.

Herein we aimed to evaluate a theranostic approach combining the advantageous properties of copper-64 and the high specificity of antibodies (radioimmunotheranostics) using the anti-CD138 monoclonal antibody 9E7.4 in an aggressive mouse model of multiple myeloma.

The first characterisation and validation of this monoclonal antibody (mAb) was published by our research team in 2015 [13]. 9E7.4 is a rat IgG2a, κ type immunoglobulin that reacts specifically with the extra-membrane part of mouse syndecan-1 (CD138) and with a very good affinity of the order of 10^{-10} M. 9E7.4 was evaluated in a targeted radionuclide therapy in immunocompetent mice bearing 5T33-multiple myeloma tumours. Labelled with astatine-211 [14] and bismuth-213 [13], two alpha-emitters, it showed a very good efficacy with, respectively, 65% and 45% of mice surviving on a long-term basis. Results observed with lutetium-177 [13] were less spectacular: a single dose of β -RIT was not sufficient to cure mice developing MM. 9E7.4 has also been tested as an imaging agent after radiolabelling with copper-64 [15], and radiolabelling with zirconium-89 [16]. The results of these two studies demonstrate the ability of ⁶⁴Cu-radiolabelled anti-CD138 (9E7.4) to detect subcutaneous MM tumours and bone marrow lesions with high sensitivity, outperforming [¹⁸F]-2-FDG. Additionally, imaging with 9E7.4, radiolabelled with copper-64, seems to be a better choice than imaging with 9E7.4 radiolabelled with zirconium-89, probably due to the new copper chelating agents that provide better protection against the transchelation phenomenon. Similar results are described in literature with other antibodies and/or radionuclides. A recent review, published in 2021 [17], also describes the interest of radiolabelled antibodies to increase the tumour dose link with its long biologic half-life. This property is particularly interesting in regard to haematologic tumours that are easily accessible via the bloodstream.

Therefore, considering this property and assuming that the biodistribution of the mAbs-based radiotracers is representative of the biodistribution of therapeutic mAbs, in the present work we investigate the ability of 9E7.4 radiolabelled with copper-64 to specifically visualize and treat CD138-expressing myeloma tumours.

2. Materials and Methods

2.1. Cells and Reagents

The MOPC315.BM murine MM cell line was provided by Pr Bjarne Bogen (Department of Immunology, Centre for Immune Regulation, Institute of Clinical Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway) [18]. The cells were cultured in RPMI medium (Gibco/Invitrogen, Saint Aubin, France) containing 2 mM l-glutamine, 100 U/mL penicillin/100 μ g/mL streptomycin, 1% MEM NEAA 100 \times (Gibco), 1% sodium pyruvate (Gibco), and 10% heat-inactivated fetal calf serum (Corning, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). The 5T33 murine MM cell line was provided by Dr Harvey Turner (Department of Nuclear Medicine, Fremantle Hospital, Fremantle, Western Australia, Australia) with permission from Dr J. Radl (TNO Institute, Leiden, The Netherlands). 5T33 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies) containing 2 mM l-glutamine, 100 U/mL penicillin/100 μ g/mL streptomycin and 10% heat-inactivated fetal calf serum (Corning). The cells were passed 3 times per week and maintained at 37 °C under 5% CO₂ and 95% humidity. Cells were used for experiments at low confluence in the exponential phase and a passage lower than P12. The 9E7.4 mAb was produced by immunization of a rat with a 40-amino-acid peptide (GeneCust) derived from the murine CD138 protein (aa 90-130) (GenBank: CAA80254.1). The specificity and affinity of 9E7.4 mAb for CD138 and the expression of the target by MOPC315.BM cells were determined by flow cytometry. Staining was acquired on FACS Calibur™ using Diva software (Version 6.0, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and then analysed on FlowJo™ software (version 10.6, BD Biosciences).

2.2. Animal Model

All animal experiments were carried out in accordance with the European directive 2010/63/EU on the protection of laboratory animals and its transposition into French law (decree n°2013-118). The preclinical studies were conducted on the UTE platform (SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes) (authorisation D44-278). The authorisation for the animal experimentation project (APAFIS #22766 for targeting radiotherapy experiments, APAFIS #6145 for targeting experiments) was delivered by the Ministry of Higher Education and Research, after a favourable review from the local animal experimentation ethics committee “Pays de Loire (CEEA-06)”. For all our *in vivo* experiments, we used BALB/cJrj immunocompetent female mice purchased from Janvier laboratories. These were housed in the UTE animal house, in ventilated cages (5 mice per cage) under sterile and pathogen-free conditions and with free access to food and water. Mice were 8–11 weeks old at the time of experiments and had an average weight of 19–20 g. After reception, mice were acclimated for 7 days before any experimental manipulations. Experiments were carried out on an orthotopic model established by an *i.v* injection of 2×10^5 cells in 100 μ L of 0.9% NaCl into the tail vein and a subcutaneous allograft model established by subcutaneous injection of 2×10^5 cells in 100 μ L of 0.9% NaCl on the right shoulder of mice under anaesthesia with a mixture of 3% isoflurane and oxygen. Before each engraftment of the tumour cells, the absence of mycoplasma contamination of the cells was checked using a HEK-blue detection kit (Invivogen, Toulouse, France). The orthotopic model grew for 9 days and the subcutaneous tumours grew for 6 days before subsequent studies.

2.3. Anti-CD138 mAb Conjugation and Radiolabelling

9E7.4-p-SCN-Bn-TE1PA was obtained with a standard conjugation method [19,20]. The batch of conjugated antibody used for radioimmunotherapy experiments was coupled with 4 chelates per mAb. Copper-64 dichloride in 0.1 M hydrochloric acid solution ($[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$) was provided by ARRONAX cyclotron (Saint-Herblain, France). Radionuclide purity was determined by gamma spectrometry using a DSPEC-JR-2.0 type 98–24B HPGE detector (AMETEK). Chemical purity was evaluated by ICP-OES using an iCAP 6500 DUO (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) (Table S1). Ten percent of sodium acetate (2.5 M) was added to $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ volume to maintain a pH of 6. According to the quantities of metals present per source received, a calculated quantity of 9E7.4-TE1PA was added to copper acetate solution in order to obtain an antibody-to-total metals ratio of close to 1 to avoid purification after radiolabelling. The reaction mixture volumes were adjusted with 0.1 M sodium acetate and then incubated at 42 °C for 30 min. Ten antibody equivalents of EDTA 1 mM were added to stop the reaction and complex-free $^{64}\text{Cu(II)}$. Volume adjustment for animal injections was undertaken with 0.9% NaCl. One μ L of the radiolabelling solution was deposited on an instant thin layer chromatography plate (Agilent Technologies, Lake Forest, CA USA) to evaluate the radiochemical purity. The ITLC was performed using citrate buffer (0.1 M; pH 4.5). After migration, the plate was exposed on a storage phosphor plate read by a radiometric phosphor imager Cyclone Plus (PerkinElmer, Shelton, CT, USA) and analysed by OptiQuant software (Version 5).

An immunoreactivity test was performed after each radiolabelling. NHS-activated magnetic beads (ThermoFischer Scientific) were previously conjugated with a CD138-like peptide provided by Genecust using the protocol of the producer. Conjugated beads were placed in PBS at a final concentration of 10 mg/mL. Ten μ L of the beads suspension was added to 1/0.5/0.2 pmol of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$. A PBS/BSA 0.1% solution was added to samples to a 100 μ L final volume. Samples were incubated at room temperature during 30 min on a rotator. Using a magnetic rack (MagRack 6, GE Healthcare, Uppsala, Sweden), supernatants and beads were collected separately and counted with a gamma counter (Wallac 1480 Wizard γ -counter, PerkinElmer). The immunoreactivity was calculated as the percentage of the number of counts per minute (CPM) of the reactive radiolabelled antibodies on beads compared with the total activity including supernatant and beads.

2.4. Cellular Uptake

Two days prior to the experiments, cells were plated on 6-well culture plates at a concentration of 1×10^5 MOPC315.BM cells/mL per well. Then, 334 pmol of 9E7.4-TE1PA and BSA-TE1PA were radiolabelled with $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$. Cells were incubated with increasing concentrations of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ (4 datapoints: 0.5, 1, 1.8 and 5.5 pmol/well) alone, with an excess of at least 100 equivalent of 9E7.4 mAb, or with similarly increasing concentrations of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-BSA}$ as a negative control. After 1, 24 and 48 h of incubation at 37 °C cells were counted under Malassey using eosin, washed twice and isolated from the supernatant by centrifugation at 1500 rpm for 5 min. Cells and supernatants radioactivities were counted using an automatic gamma counter, Hidex AMG (HIDEX, Finland). The cellular uptake was expressed as the percentage of deposited activity per millions of cells. Statistical analysis was undertaken using an unpaired *t* test at 5% significance level.

2.5. Ex Vivo Biodistribution

Two ex vivo biodistribution experiments (21 mice/experiment) were performed in the same conditions on normal (tumour-free) mice and on mice bearing s.c tumours ($306 \pm 95.8 \text{ mm}^3$). Mice had received $8.5 \pm 0.6 \text{ MBq}$ of 25 μg of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ via the tail vein. Mice were sacrificed at 5 min, 30 min, 3 h, 24 h, 48 h (4 mice/group) and 72 h post-injection (5 mice). Tumours, blood and organs were harvested, weighed on a precision balance (Adventurer™ Precision, OHAUS) and radioactivity was counted using an automatic gamma counter, Hidex AMG (HIDEX, Finland). Counter efficacy was evaluated using standard references ($n = 10$). To refine the analysis, the injected activity per mouse was corrected by removing the activity remaining at the injection site in the tail. Results were decay corrected at injection time and expressed as a percentage of injected dose per gram of tissue. Statistical analysis was undertaken using an unpaired *t* test at 5% significance level.

2.6. Positron Emission Tomography (PET) Imaging

Mice were imaged at 5 min, 24 h, 48 h and 72 h p.i. A group of mice imaged at 72 h p.i. was used for the 72 h p.i. time of biodistributions. Mice were maintained under general anaesthesia with a mixture of 2% isoflurane and 5% air for the duration of the acquisition. Image acquisition was performed with the IRIS PET-CT imager (Iris, Inviscan, Strasbourg France) using a 10-min static whole-body acquisition mode combined with a 20-s CT acquisition (energy window of 250-750 keV and FOV size of 90 mm). The CT acquisition parameters were 80 kV, 0.9 mA, 576 projections and 160 μm voxel size. Filtered back-projection algorithm with beam hardening and ring artefact correction was used. PET images were reconstructed with the 3D Ordered Subsets Expectation Maximization (3D-OSEM-MC,) algorithm, 8 subsets, 8 iterations with correction of decay, random and dead-time. PET and CT were converted into DICOM format and processed with OsiriX Medical Imaging software (version 11.0.1, Pixmeo, Bernex, Switzerland).

2.7. Dosimetry

Dosimetry was performed based on ex vivo biodistribution study results. Mean absorbed doses to the main tissues/organs and tumour were calculated following the MIRD scheme [21]. Time–activity curves for each organ/tissue were derived from the ex vivo biodistributions and fitted with a single exponential function or a sum of two exponentials using GraphPad PRISM 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The cumulated activities in each organ/tissue were calculated by integrating these single or dual exponential functions between 0 and infinity. For most tissues, self-dose and cross-dose *S*-values were calculated with the GATE (v 9.0) Monte Carlo code [22] using a realistic mouse phantom Moby of 20 g [23]. For tumours, salivary glands and ganglia, self-dose *S*-values were calculated with the IDAC-Dose 2.1 software [24] assuming these tissues have

a spherical shape. Mean absorbed dose to blood was estimated assuming that all emitted energy in the blood was absorbed locally.

2.8. Therapeutic Studies

In the orthotopic model, a dose-escalation study was performed with a [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 single injection of 22 (*n* = 10), 35 (*n* = 10), 55 (*n* = 5) or 65 MBq (*n* = 7). Then, a [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 dose repetition of 35 (*n* = 6) and 55 MBq (*n* = 6) was undertaken at a 2-week interval. Control groups have received i.v injection of saline solution (*n* = 22), 9E7.4 mAb (*n* = 10), or 35 MBq of [⁶⁴Cu]CuCl₂ (*n* = 5). In the subcutaneous model, a dose repetition of saline solution (*n* = 15), 35 MBq of [⁶⁴Cu]CuCl₂ (*n* = 3) or 35 MBq of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 (*n* = 9) was undertaken with a 2-week dose interval. After treatment, survival was monitored over time. Mice were sacrificed when paralysis or extramedullary tumours were detected, when 20% of their body weight was lost or if there were other signs of significant toxicity. In the s.c model, tumour growth was measured by the same operator using a digital calliper, the volume was calculated using the formula: volume = (L × W × h) × 3.14/6, where L was length, W was width and h was height [25]. Mice were sacrificed when tumour volume reached 2000 mm³ or at the apparition of necrosis in tumours or at any sign of pain and/or toxicity. Statistical analysis of tumour volumes was performed using a two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test.

2.9. Toxicity Monitoring

Haematological toxicity was monitored weekly after tumour transplantation, with white blood cell, platelet, and erythrocyte counts using an automated quantitative haematological analyser with 25 µL of blood per test (Celltac-α mek-6500k, Nikon Kohden, Rosbech, Germany). Blood samples were collected from the mouse retroorbital sinus under general gas anaesthesia with 2.5% isoflurane and 5% air and collected in tubes containing EDTA (Laboratoires Melet Schloosing, Osny, France). Blood samples were centrifuged at 2500 rpm for 10 min in order to recover the plasma, which was stored at −20 °C until it was analysed for liver and kidney toxicity. Plasma was used to assess liver and kidney toxicity by measuring the following biochemical parameters: aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) to monitor liver status, and blood urea nitrogen (BUN) and creatinine to measure renal toxicity. First, plasma samples were thawed on ice and then diluted or undiluted according to their initial volume with 0.9% NaCl to obtain a final volume of 100 µL required for analysis. Dilutions up to a maximum of 1/4 were made in order not to reach the detection limit of the device. Plasma from each of the mice was then placed in a rotor (General Health Rotor, Scil) containing the reagents required for the various tests and processed using a fully automated biochemistry analyser (Element RC, Scil animal care company, Altorf, France) allowing the measurement of parameters using photometric tests. A cohort of healthy BALB/cJrj mice was used to calculate the reference values of the studied parameters. Statistical analysis was performed using a two-factor ANOVA followed by a Sidak's multiple comparison test.

2.10. Histology

Tissues were removed, fixed in formalin and transferred to 70% ethanol before being embedded in paraffin. Paraffin sections of 2 µm were cut and the tissue sections were mounted on Trajan frosted™ slides. Slices were stained with Hematoxylin Phoxine-Safran by Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell, Nantes, France). A Nanozoomer Hamamatsu™ slide scanner was used to scan the slides.

3. Results

3.1. Comparison of CD138 Expression on MOPC315.BM and 5T33 Cells

The specificity of mAb 9E7.4 for murine CD138 has been confirmed previously in the 5T33 cell line [13]. Here, we evaluated, by flow cytometry, the expression of CD138 in

MOPC315.BM compared with the 5T33 cell line (Figure 1). The results show strong CD138 expression in both MM cell lines, with good specificity confirmed by the absence of non-specific binding of the control isotype (Figure 1A). However, CD138 expression appears slightly higher and more homogeneous (Figure 1B) in MOPC315.BM cells (95.9% versus 86.3% in 5T33 cells). Based on these results, MOPC315.BM cells were selected for the next steps of this work. Furthermore, the MOPC315.BM line is implantable in immunocompetent mice with the occurrence of paraplegia (sign of spinal cord compression) in all mice within 3–4 weeks [18] and has tropism for the bone marrow, inducing osteolytic lesions that mimic human disease. Thereafter, the affinity of the 9E7.4 antibody for the CD138 target on the MOPC315.BM cell line was determined by flow cytometry with increasing concentrations of the antibody (Figure 1C). Results demonstrate a dissociation constant (Kd) value of 0.626 nM.

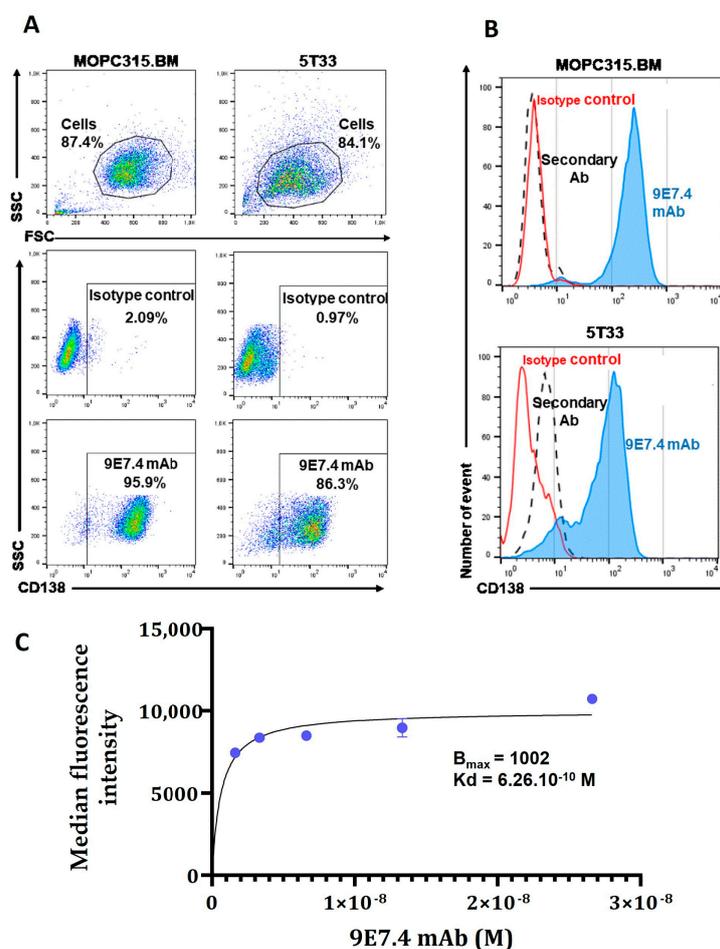


Figure 1. Characterization of in vitro CD138 membrane expression in 5T33 and MOPC315.BM murine cell lines by flow cytometry. (A) Cell analysis strategy: cells were selected based on their size (FSC parameter) and granulation (SSC parameter) to exclude debris and dead cells. Cell labelling was performed with 9E7.4 anti-CD138 antibody and IgG2a isotype at a saturating concentration of 25 µg/mL. (B) Representative histograms of phycoerythrin (PE) fluorescence intensity of control isotype (red curve) or 9E7.4 antibody (blue curve) and secondary antibody (black dashed curve). Acquisition was performed on a BD FACS Calibur™ flow cytometry system and analysed using FlowJo™ software -V10.6™ (BD Biosciences). (C) Binding saturation curve for 9E7.4 as determined using flow cytometry after incubation of MOPC315.BM cells with increasing antibody concentrations (from 4 µg/mL to 0.25 µg/mL). Antibody affinity analysis was performed on GraphPad Prism software (version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) using a nonlinear regression curve (‘‘One site-Specific binding’’). Error bars represent the standard deviation of the fluorescence medians.

3.2. Radiolabelling and Immunoreactivity

The chemical purities of the copper-64 sources used in this study are between 21 and 63 MBq/nmole, considering all metallic contaminants research by ICP-OES (Copper, Zinc, Cobalt, Iron, and Nickel) has a specific activity above 100 MBq/nmole. Synthesis and radiolabelling were performed using previously published procedures [26]. Note that in this article, the radioimmunoconjugate [^{64}Cu][Cu-9E7.4-(p-SCN-Bn-TE1PA)] has been named [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 for simplification. For all radiolabelling experiments, the radiochemical purity of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 was greater than 98% and radiolabelling yield was from 90 to 100%. Specific activity of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 was different for each cohort of mice because we chose to inject a fixed amount of antibody per mouse (25 μg for the PET images and 100 μg for the therapies). Thus, specific activity of each cohort, ranging a minimum of 236 MBq/mg to a maximum of 651 MBq/mg, is reported in Table S1. After radiolabelling, integrity of the 9E7.4 antibody was verified by estimating its immunoreactive fraction using magnetic beads coated with CD138 antigen. This control was performed after each radiolabelling and confirmed an immunoreactivity of $79.4\% \pm 0.8\%$.

3.3. In Vitro Cellular Binding

In vitro MOPC315.BM cellular uptake of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 was assessed at 37 °C for 1, 24, and 48 h of incubation of cells with increasing concentrations of the radiotracer (Figure 2). After 1 h incubation at 37 °C, [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 binding was significant for all concentration conditions, with a maximum uptake of 2.8 ± 0.1 %ID/millions of cells for 0.5 pmol/well concentration and a minimum of 0.887 ± 0.14 %ID/millions of cells for 5.5 pmol/well concentration. After 24 h, maximum uptake of the compound on cells was reached independently of concentration used. Uptake was significantly higher than at 1 h of incubation, with a maximum of 7.9 ± 1.5 %ID/million cells for 1 pmol/well ($p = 0.01$). At 48 h, we observed a considerable decrease in tracer binding compared with 24 h. However, it remained significantly higher than the uptake at 1 h of incubation. For example, with 1.8 pmol/well, a significant increase in uptake is observed (from 1.47 ± 0.19 %ID/million cells at 1 h to 4.1 ± 0.2 %ID/million cells after 48h of incubation, $p = 0.0017$).

Binding of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 was significantly blocked (>75% at 24 h) by coincubation with an excess of non-radiolabelled 9E7.4 antibody (Figure 2B) demonstrating the CD138 specificity of the radioimmunoconjugate. An additional control experiment was performed using [^{64}Cu]Cu-TE1PA-BSA (Figure 2C). For the negative control with [^{64}Cu]Cu-TE1PA-BSA, no condition exceeded the $0.6 \pm 0.1\%$ ID/million cell uptake obtained with the 0.5 pmol/well concentration at 24 h incubation.

3.4. Ex Vivo Biodistribution and PET-CT Imaging

Comparative ex vivo biodistribution experiments were conducted in healthy mice (Figure 3A, Table S2) and subcutaneous (s.c) MOPC315.BM tumour-bearing mice (Figure 3B, Table S3). Relatively similar distribution kinetic profiles of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 were found for several organs in both models. [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 exhibited rapid blood clearance with a maximum %ID/g in blood at 5 min post-injection (p.i) which then decreased rapidly at 2 h p.i (from 26.6 ± 7.8 %ID/g to 14.6 ± 8.2 %ID/g for healthy mice and from 27.7 ± 2.9 %ID/g to 10.9 ± 0.4 %ID/g for tumour-bearing mice). Same blood kinetics profiles were found in highly vascularised organs such as the heart, lungs and liver. In healthy mice, the higher uptake was found in the liver from 5 min p.i (35.8 ± 8.4 %ID/g) to 72 h p.i (15.7 ± 1.4 %ID/g). This uptake can be explained by the strong cell surface expression of syndecan-1 in normal hepatocytes [27,28]. A relatively high uptake was also detected in normal tissues such as the spleen (13.7 ± 2.8 %ID/g at 24 h p.i) and kidneys (8.8 ± 1.5 %ID/g at 24 h p.i) whereas a very low signal was observed in muscle at 24 h p.i (1.0 ± 0.3 %ID/g).

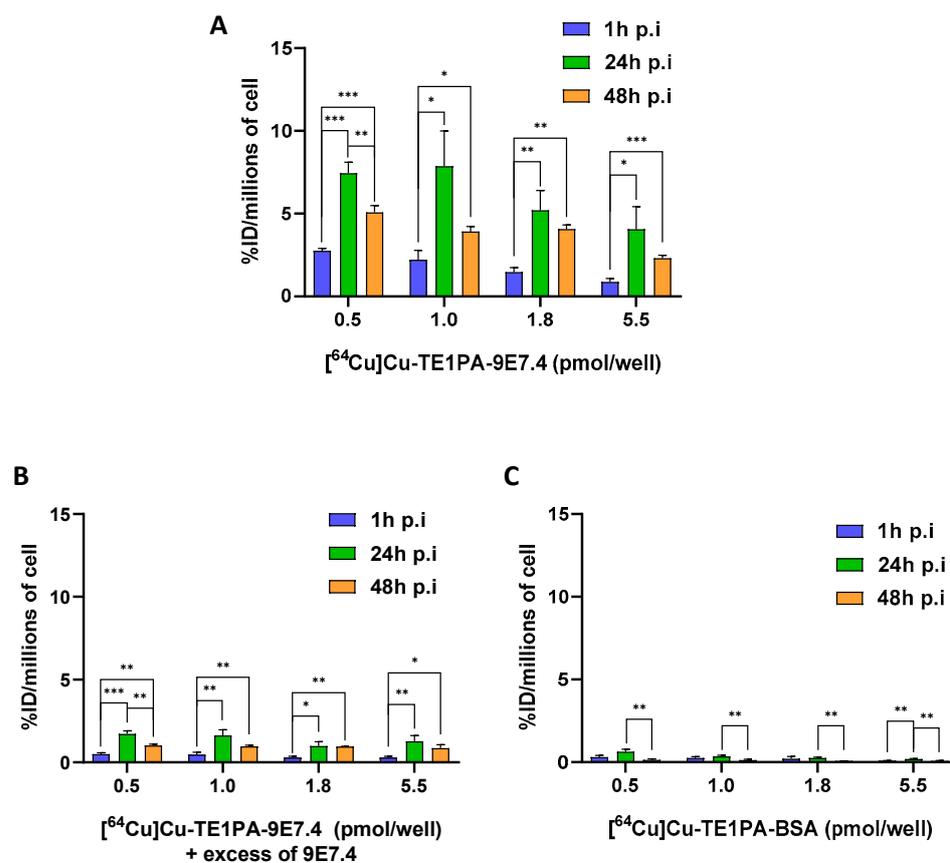


Figure 2. In vitro cellular binding assays. Cellular binding of (A) [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, (B) [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 with an excess of 9E7.4, (C) [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-BSA, to MOPC315.BM cells using 4 concentrations of radiotracers at 3 different time post-incubation. Results are expressed as % activity injected per million cells ($n = 3$; multiple t -test, (*) $p < 0.02$, (**) $p < 0.009$, (***) $p < 0.0007$).

In MOPC315.BM s.c tumour-bearing mice (Figure 3B), the distribution profile of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 was similar in each organ with lower %ID/g, such as the liver at 24 h p.i., with 21.8 ± 5.3 %ID/g in tumour-free mice versus 10.4 ± 2.1 %ID/g in tumour-bearing mice. Tumour uptake was about 9.2 ± 0.7 %ID/g at 5 min p.i, then increased rapidly to 45.6 ± 5.1 %ID/g at 2 h p.i ($p < 0.000001$) and remained stable over time up to 72 h p.i. Remarkably, at 48 h p.i, a tumour uptake of 62.5 ± 17.1 %ID/g was observed indicating a favourable tumour-to-liver ratio of 6.8.

Additionally, longitudinal small-animal PET-CT imaging was performed in female MOPC315.BM s.c tumour-bearing mice (Figure 3C) eleven days after cell injection. At the earliest time-point (5 min p.i), the localisation of the radiotracer was mainly vascular, with an important signal found in the highly vascularised organs, such as the heart, liver, spleen and kidneys up to 2 h p.i. At 24 h p.i. a high radioactive signal persisted in the tumour as well as in the liver while no signal was observed in the non-specific organs. Signal in the tumour and in the liver was considerably reduced but still visible until 72 h p.i. PET-CT images performed at 24 h post injection of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-IgG2a, κ (Figure S1) in tumour-bearing mice did not show any specific tumour uptake, confirming the specificity of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4. At 24 h post-injection, hepatic uptake was intense and equivalent for both radioimmunoconjugates.

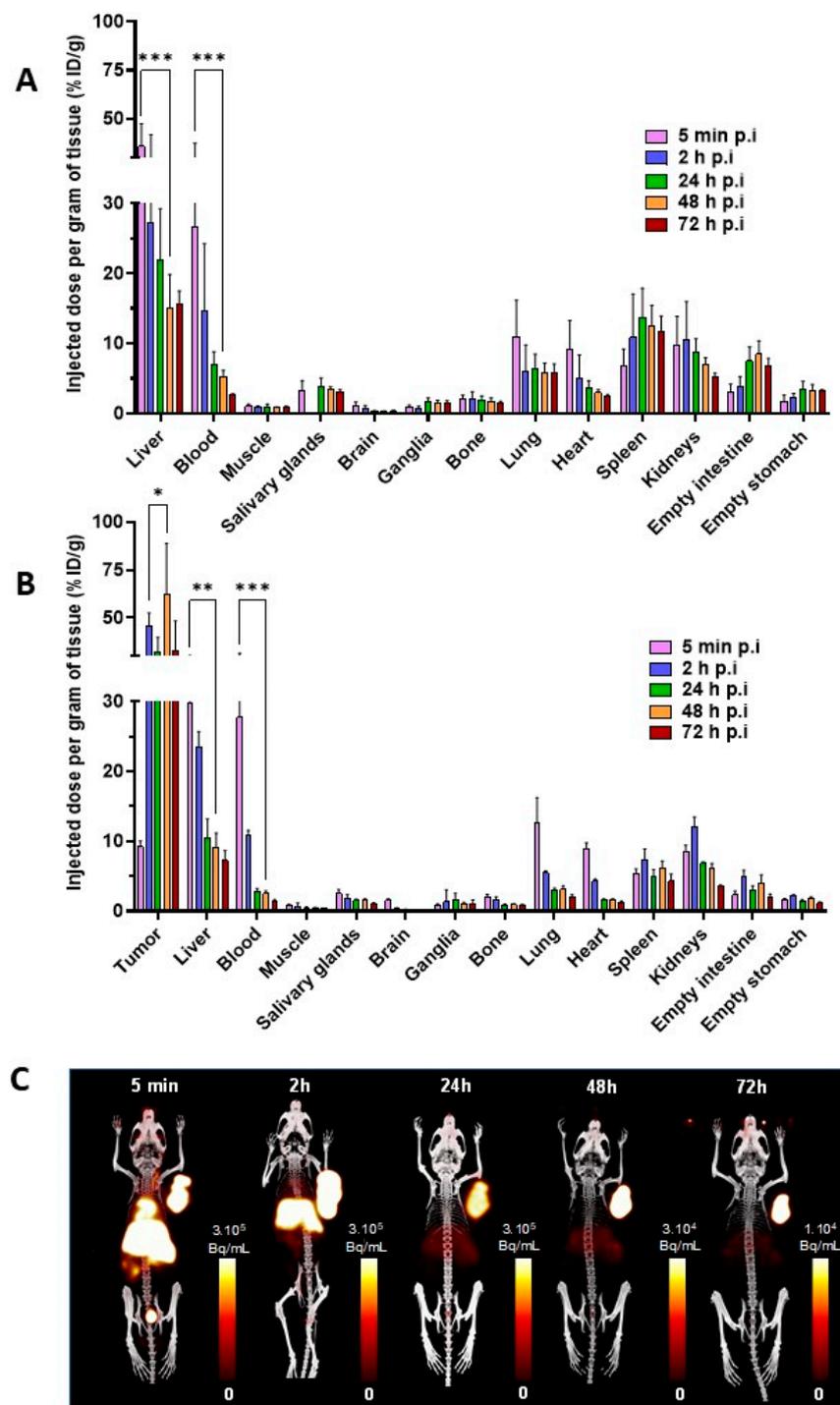


Figure 3. Ex vivo biodistribution and PET-CT imaging of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ in normal (healthy) and tumour-bearing mice. (A) ex vivo biodistribution of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ in normal mice and (B) MOPC315.BM tumour-bearing mice at 5 min, and 2, 24, 48 and 72 h after intravenous injection of 8.5 ± 0.6 MBq of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$. Values are expressed in %ID/g \pm SD, ($n = 4$ /group; $n = 5$ for 72 h p.i groups) (multiple t test, (*) $p = 0.00001$, (**) $p = 0.000007$, (***) $p < 0.000001$). (C). For illustration proposes, PET-CT images of a MOPC315.BM-tumour-bearing mouse at 5 min and 2, 24, 48 and 72 h after intravenous injection of 10,01 MBq of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$. Images are presented as maximum intensity projection (MIP) and values are expressed in Bq/mL) and no smoothing was applied to PET and CT.

3.5. Dosimetry

Dosimetric calculations for a single injection of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ were performed based on ex vivo biodistribution data for $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ (Figure 4). The average absorbed doses per MBq injected or for a single injection of 37 MBq are summarised in Table 1. Results show that the organs or tissues that received the highest absorbed doses were, in descending order, the tumour with 0.6 ± 0.1 Gy/MBq, the liver with 0.2 ± 0.0 Gy/MBq, the spleen with 0.1 ± 0.0 Gy/MBq and the kidneys with 0.1 ± 0.0 Gy/MBq. In all other healthy organs, the average absorbed dose was equal to or less than 0.05 Gy/MBq. Although the average absorbed dose to the liver appears to be significant, the tumour-to-liver absorbed dose ratio was 2.9, which appears to be favourable for the use of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$ as a therapeutic agent.

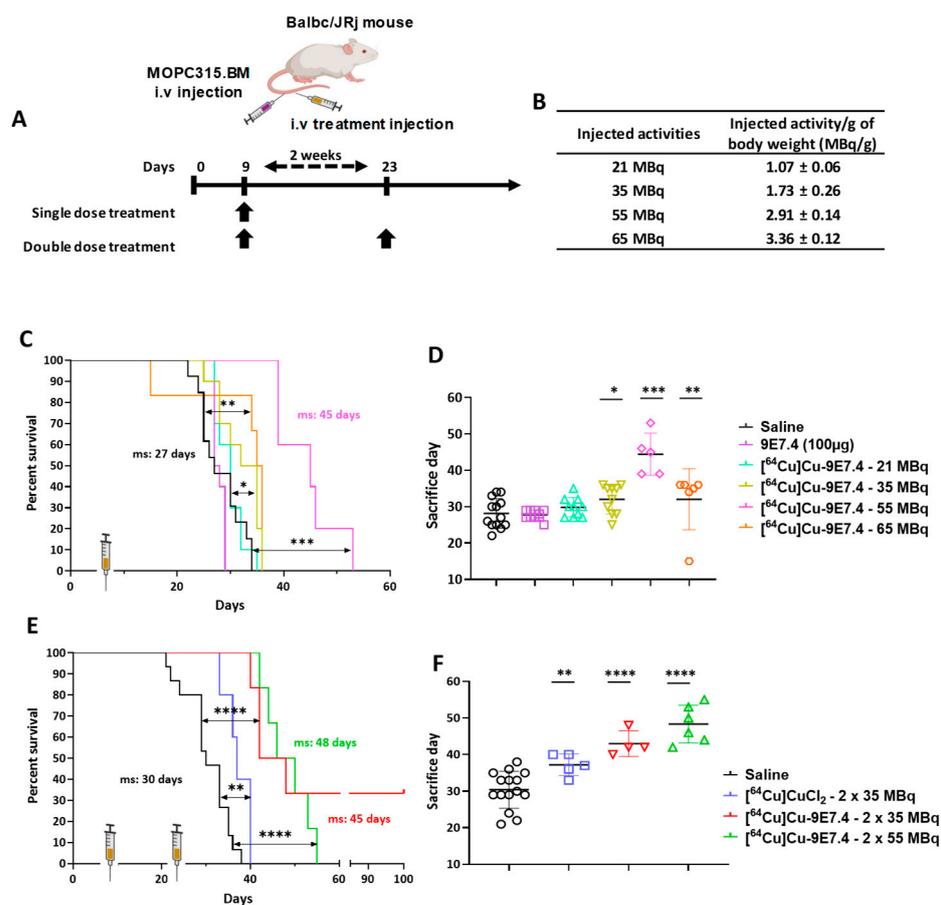


Figure 4. Activity-escalation study and repeated dose regimen. (A) Treatment schedule for single or repeated dose treatment after intravenous tumour cells injection (2×10^5 cells). (B) Total activity injected per group expressed in MBq and MBq per gram of body weight (MBq/g). Kaplan–Meier survival curves of mice following single dose of treatment (C), and repeated doses of treatment (E) ($n = 5\text{--}15$; (*) $p < 0.01$, (**) $p < 0.03$, (***) $p < 0.0002$, (****) $p < 0.0001$; Log-rank (Mantel–Cox) test). Total duration of the study was 100 days. (D,F) Day of sacrifice of each mouse, bar represents the median survival, ⁽¹⁾ surviving mice were excluded. ms: median survival. Created with Biorender.com.

Table 1. Estimated absorbed doses to tissues/organs per MBq or for a single injection of 37 MBq from intravenous injection of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 in BALB/cJrJ female mice bearing subcutaneous MOPC315.BM tumours.

Organ/Tissues	Mean Absorbed Dose (Gy/MBq) ± SD	Mean Absorbed Dose (Gy) ± SD for 37 MBq
Tumour	0.6 ± 0.1	21.3 ± 5.0
Liver	0.2 ± 0.0	7.4 ± 0.9
Spleen	0.1 ± 0.0	5.2 ± 0.5
Intestine wall	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.3
Kidneys	0.1 ± 0.0	4.5 ± 0.4
Ganglia	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1
Lungs	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.4
Heart	0.0 ± 0.0	1.9 ± 0.2
Stomach wall	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.1
Salivary glands	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.1
Bone	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.2
Pancreas	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Brain	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0

3.6. Therapy Experiments on Orthotopic Model

The targeted radionuclide experiment started with a dose-escalation using a single injection of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 into the orthotopic model (cells injected intravenously) (Figure 4A). Treatments using non-radiolabelled 9E7.4 mAb alone or 21 MBq of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 did not improve median survival (27.5 days and 30 days respectively) compared with the saline control (27 days, $p = 0.3251$ and $p = 0.4375$ respectively) and all animals in these groups developed paraplegia (signs of disease) and extramedullary tumour masses revealed at autopsy.

A relative but significant increase in survival compared with the control groups was achieved with a single injection of 35 MBq (ms = 33.5 days, $p = 0.011$) and treatment with a single administration of 55 MBq extended the median survival at 45 days ($p < 0.0001$). However, despite improved survival, animals in this group also developed hind leg paralysis. On the other hand, mice treated with the highest activity (65 MBq) showed a lower median survival (35.5 days) than those treated with 55 MBq ($p = 0.0024$). All animals of the 65 MBq group were sacrificed due to paralysis, excepted one mouse that was sacrificed prematurely after losing 20% of its initial body mass. This mouse received 3.6 MBq/g, which is higher than the average activity (3.4 ± 0.1 MBq/g of body weight) received by the other mice in this group (Figure 4B). Thus, the improvement in mouse survival appears to be activity dependent up to 55 MBq, after which it decreased (Figure 4D).

Based on the results obtained with activity-escalation, a repeated dose regimen was implemented using the two doses that showed better median toxicity-free survival. Effective activities of 35 and 55 MBq were selected for a repeat dose trial with a 2-week inter-dose interval (Figure 4C). While a single injection of 35 MBq increased the survival of mice by only 5.5 days compared with the saline group, the repeated injection of 35 MBq of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 significantly increased the median survival ($p < 0.0001$) of mice by 15 days (ms = 45 days) compared with the saline group (ms = 30 days). Moreover, two mice of this group ($n = 6$) were still alive at the end of the study (100 days). Although repeated dosing was beneficial with 35 MBq, repeated dosing of 55 MBq of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 did not significantly increase survival ($p = 0.3217$) compared with a single 55 MBq injection. It was, however, not less effective on survival than a single dose, and it increased median survival by 18 days compared with the saline group.

Effectiveness of copper-64 vectorisation was also evaluated by comparing the effect of the [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4-based therapy with two injections of 35 MBq of [^{64}Cu]CuCl₂. [^{64}Cu]CuCl₂, which was able to significantly increase median survival ($p = 0.0096$) by 7 days compared with the saline group.

General and haematological toxicities were investigated during the therapy follow-up. No significant loss in body weight was observed in any of the groups of mice (Figure 5A). Haematological toxicity evaluation was achieved by counting red blood cells, white blood cells and platelets once a week after tumour cells inoculation in different animal groups. No significant difference was observed in all groups for RBC count (Figure 5B). A significant but transient decrease in the number of white blood cells was observed the week following injection in all groups that received radioactive products (Figure 5C), followed by an increase 2 weeks after injection. For platelets, there was a significant and transient decrease of their number, but only in mice that received activities greater than 35 MBq (Figure 5D).

We also investigated liver and kidney toxicity by measuring aspartate aminotransferase (AST) and alanine transaminase (ALT) rates for liver toxicity and blood urea nitrogen (BUN) and creatinine for kidney toxicity before tumour cells inoculation (T0) and at sacrifice (Figure 5). No significant increase was observed for BUN or creatinine ($p < 0.9999$) after each treatment condition (Figure 5F–H). Regarding liver toxicity, AST levels at sacrifice were significantly increased compared with baseline levels except for groups injected with non-radiolabelled 9E7.4 or 35 MBq of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 (Figure 5E). It should be noted that, for the mouse sacrificed prematurely for excessive weight loss (treated with 65 MBq), AST level was relatively low while the surviving mice, treated with 2×35 MBq of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, had similar AST levels as mice at T0 (values (s) on the graph). Only the 65 MBq and 2×55 MBq [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 groups of mice had significantly higher ALT levels ($p = 0.0295$ and $p = 0.0310$, respectively) (Figure 5G) than at T0, indicating liver damage.

3.7. Therapy Experiments in Subcutaneous Model

Six days after MOPC315.BM s.c inoculation (tumours were palpable), mice received the first intravenous injection of treatment (35 MBq of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, [^{64}Cu]CuCl₂ or 0.9% NaCl) followed by a second injection two weeks later (Figure 6A).

Survival (Figure 6B) and tumour growth (Figure 6B) were monitored to evaluate treatment efficacy. Unlike in the orthotopic model, [^{64}Cu]CuCl₂ did not increase survival (ms = 21 days) compared with the saline group (ms = 19 days) ($p = 0.5448$) whereas survival was significantly increased, doubling the median survival (ms = 40 days) ($p < 0.0001$) for mice that had received 2 doses of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4. Two mice receiving this treatment survived up to 80 days post cell inoculation before disease recurrence in one case, while the other survived until the end of the study.

Body weight follow-up during the experiment (Figure 6C) did not reveal any significant weight loss in either the radioactive or saline treated groups. Concerning tumour growth, the anti-tumour effect of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 has been demonstrated (Figure 6F). In the first stage, injection of the radiolabelled antibody retarded tumour growth compared with the [^{64}Cu]CuCl₂ and saline injections (Figure 6D–F). After the first injection, tumours from the [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4-treated cohort had a significantly slower mean doubling time (dT) of 4.51 ± 2.17 days than the saline cohort (dT = 1.9 ± 0 . (days, $p = 0.012$). At 18 days post cell inoculation, the average tumour volume was only about 195.1 mm³ for the mice treated with [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 versus 925.7 mm³ for the saline group and 678.6 mm³ for the mice treated with [^{64}Cu]CuCl₂. This antitumour effect was significantly enhanced following the second injection of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 in all animals, and resulted in a maximum average reduction of $70.7 \pm 21.3\%$ in tumour volumes. This treatment resulted in tumour disappearance in one mouse, a tumour recurrence observed at day 70 post cell inoculation for another and at least 20 days of survival for other mice of the group where a small tumour volume was maintained (~ 15 mm³). Tumour recurrence

induced hindlimb paralysis reflecting migration of MOPC315.BM tumour cells to the bone marrow and disease occurrence.

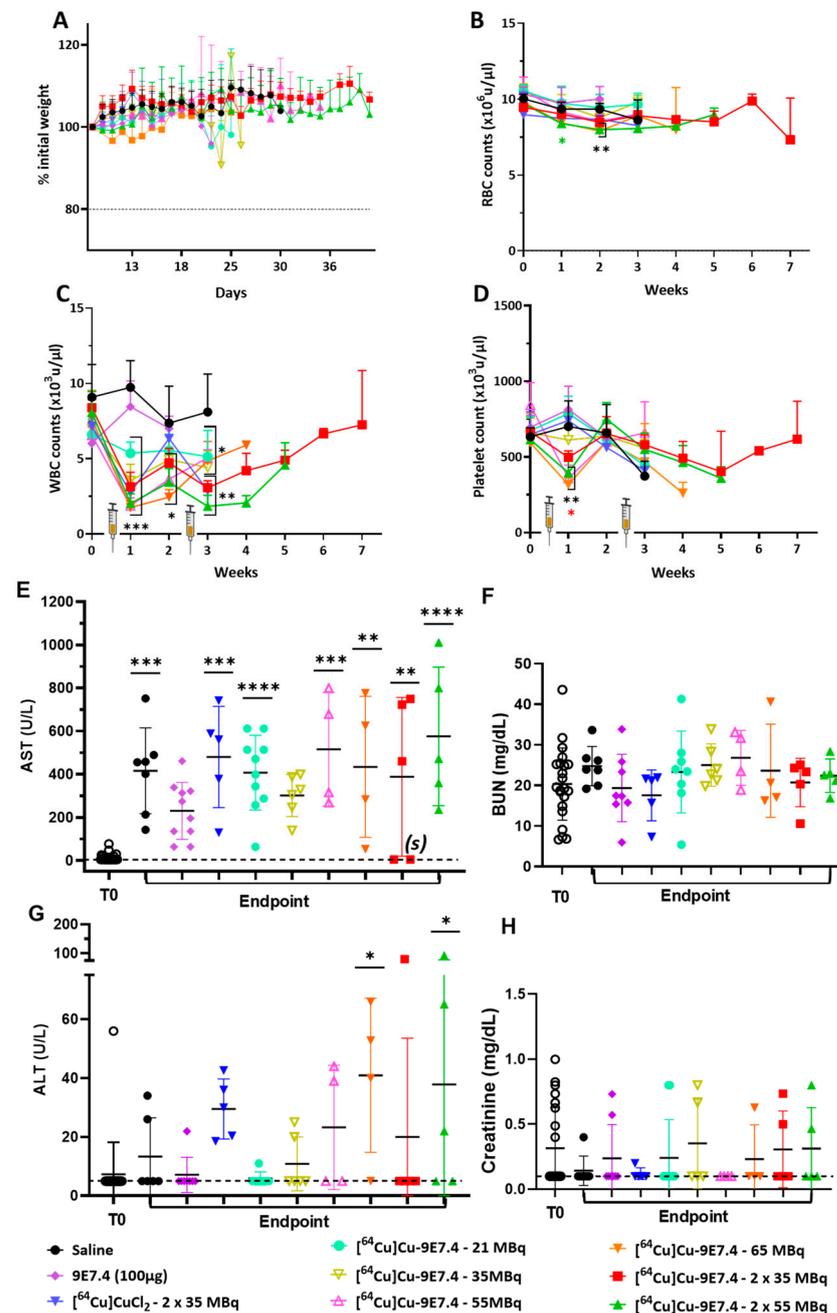


Figure 5. General and haematotoxicity ($n = 5-26$; BALB/cJRj mice) and biochemical toxicity ($n = 4-22$ BALB/cJRj mice) before and during therapy follow-up. (A) Mean body weight variation expressed as a % of initial weight in each group. Haematotoxicity was assessed by counting (B) red blood cells, (C) white blood cells and (D) platelets once a week after MOPC315.BM injection in the tail vein. Plasma counting of (E) AST, (F) BUN, (G) ALT and (H) creatinine were assessed before tumour cells inoculation (T0) and at endpoint. Statistical analysis was carried out with 1-way ANOVA and Sidak's multiple comparisons tests (statistical results shown are significantly different from T0, (*) $p < 0.03$; (**) $p < 0.0007$; (***) $p < 0.0003$; (****) $p < 0.0001$). AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine transaminase; BUN: blood urea nitrogen. (s) represents the values of the surviving mice.

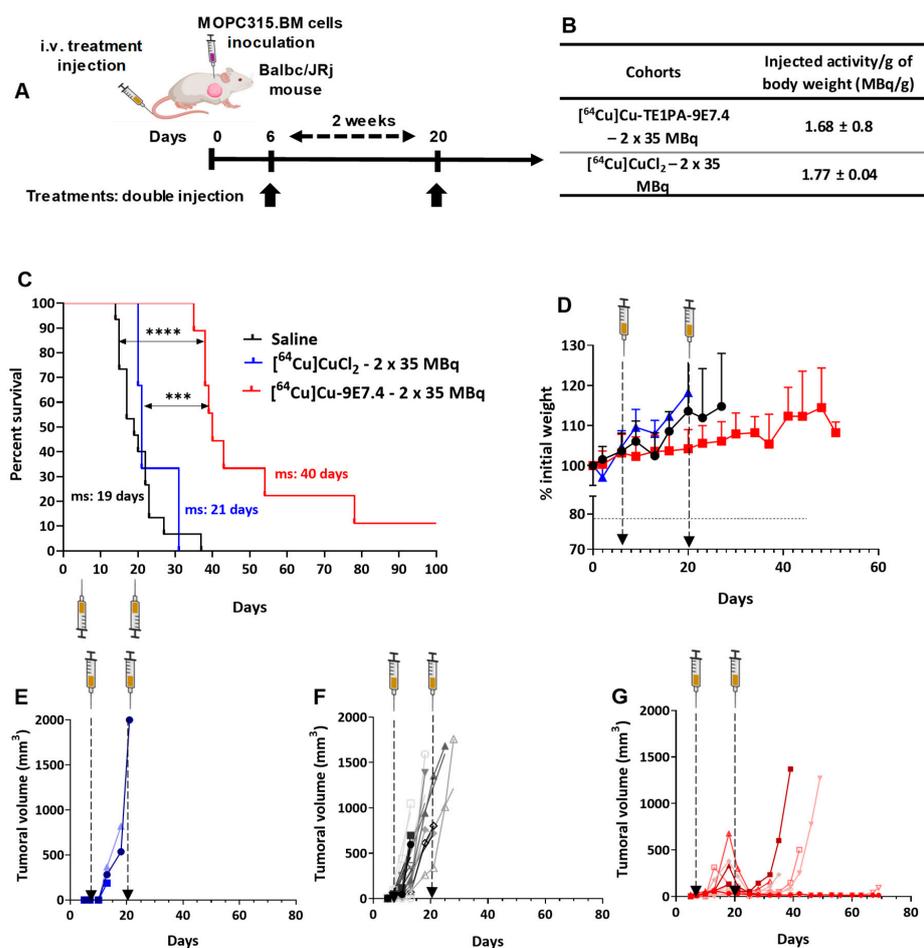


Figure 6. Therapy experiment with repeated dose of treatments and saline in BALB/cJrJ mice bearing s.c. MOPC315.BM tumours. (A) Treatment schedule for repeated dose treatment after s.c. tumour cells injection (2×10^5 cells). (B) Total activity injected per group expressed in MBq and MBq per gram of body weight (MBq/g). (C) Kaplan–Meier survival curves. Total duration of the study was 100 days. ($n = 3$ –15; (***) $p < 0.0002$, (***) $p < 0.0001$, Log-rank (Mantel–Cox) test). (D) Mean body weight variation for each group expressed as a % of initial body weight. Tumour growth curves for mice receiving (E) [⁶⁴Cu]CuCl₂ ($n = 3$), (F) saline ($n = 10$), or (G) [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 ($n = 10$). Each curve represents a mouse. Tumour volume was measured twice per week until signs of tumour necrosis, paralysis or volume reached 2000 mm³. Created with Biorender.com.

As in the orthotopic model, injection of radioactivity induced a transient and moderate decrease in white blood cells count but had no effect on platelets and red blood cell rates (Figure 7). A steady decline over time in platelet, white blood cells and red blood cell counts induced by the progression of the disease is apparent in the saline control group. All of these results confirm the efficacy of this treatment regimen in controlling tumour growth and improving survival in this model.

Biochemical analysis of liver toxicity showed a significant increase in mean AST levels in each of the three cohorts compared with the baseline levels observed at time T0 (Figure 7D), with a greater increase in values for the [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4-treated group (from 14.3 ± 12.7 U/L at T0 till 386.2 ± 196.2 U/L, $p < 0.0001$). Again, for the mouse that survived to the end of the study, the AST level assayed at sacrifice was equivalent to the baseline at T0 (see (s) on the graph). For ALT assays in each cohort at sacrifice, the values obtained were not significantly different than those of mice in the T0 reference group (Figure 7F). As in the orthotopic model, no significant differences were observed in creatinine (Figure 7G) or BUN levels (Figure 7E), which are markers of potential renal toxicity.

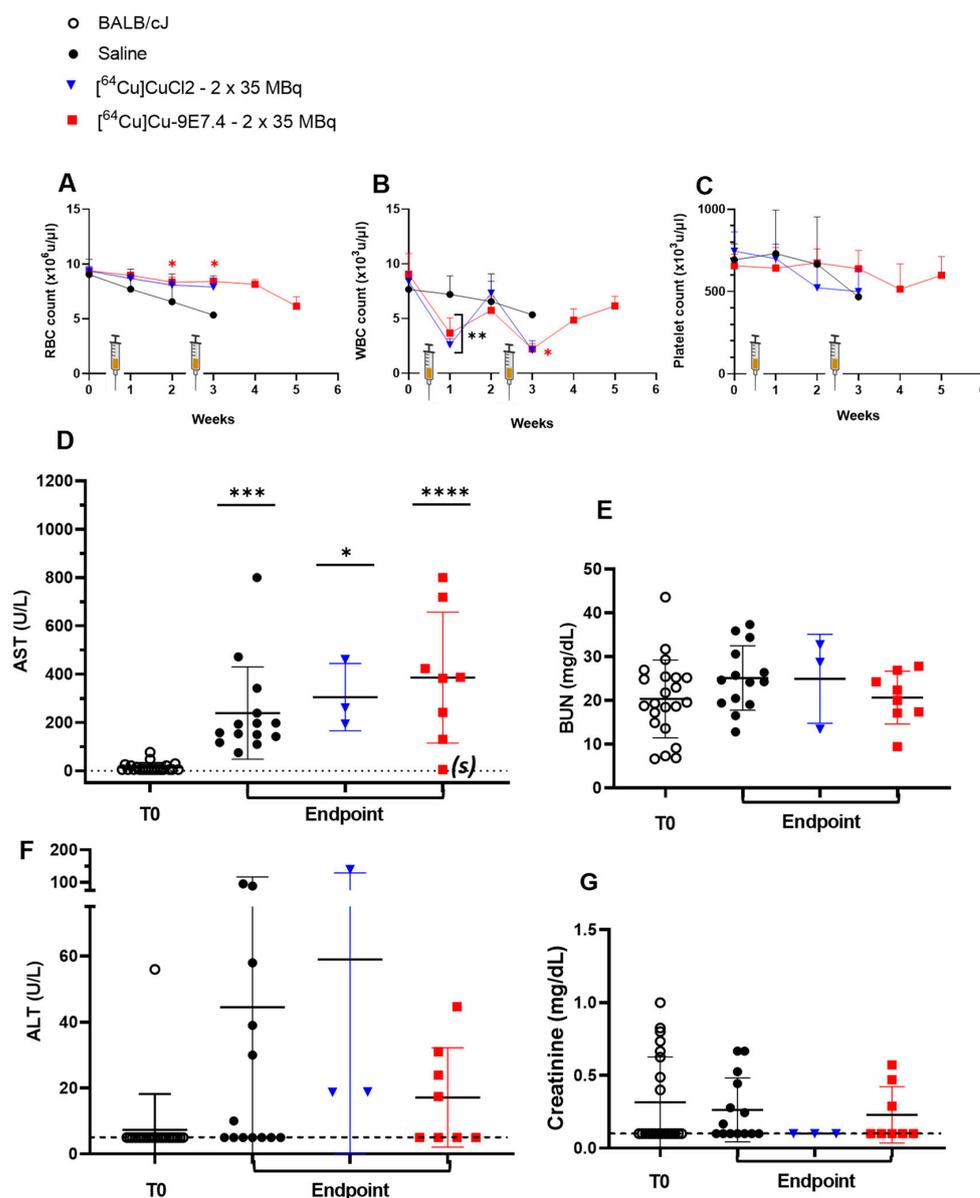


Figure 7. Haematological and biochemical toxicity during therapy experiments in BALB/cJrj mice bearing s.c MOPC315.BM tumours ($n = 3\text{--}22$). Haematotoxicity was assessed by counting (A) red blood cells, (B) white blood cells and (C) platelets once a week after MOPC315.BM subcutaneous inoculation. Biochemical toxicity was evaluated by plasma counting of (D) AST, (E) BUN, (F) ALT, and (G) creatinine before tumour inoculation (T0) and at endpoint. Dashed lines represent the threshold values of parameters. Statistical analysis was carried out with 1-way ANOVA and Sidak's multiple comparisons tests (statistical results shown are significantly different from T0, (*) $p = 0.0237$; (**) $p < 0.001$; (***) $p = 0.0007$; (****) $p < 0.0001$). AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine transaminase; BUN: blood urea nitrogen.

To support the notion of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$'s therapeutic efficacy, a precise follow-up of each of the mice was carried out, and results concerning the mouse that survived to the end of the study are presented in Figure 8. After the first injection of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TE1PA-9E7.4}$, the tumour volume of this mouse increased slowly to a maximum volume of 62 mm^3 14 days after tumour transplantation (Figure 8A). TEP-CT imaging performed 24 h after the first therapeutic dose was injected confirmed the presence of the tumour, which was palpable, since the image reveals a strong signal at the tumour site (Figure 8B). At the second injection, the tumour volume measured by calliper was 31.4 mm^3 , the treatment reduced

the tumour volume by 60% to 12.6 mm³ 46 days after tumour transplantation. After that, no recurrence of the tumour was observed in this mouse. To confirm complete recovery of this mouse, PET-CT imaging was performed 131 days post-inoculation and revealed no positive signal at the tumour injection site (Figure 8B). At sacrifice, autopsy revealed no visible tumour and tissue from the original tumour site was removed. Histological analysis of the tissue sample by HPS staining (Figure 8C) revealed muscle, connective tissue and a lymph node (Figure 8D). No evidence of residual tumour tissue was found locally.

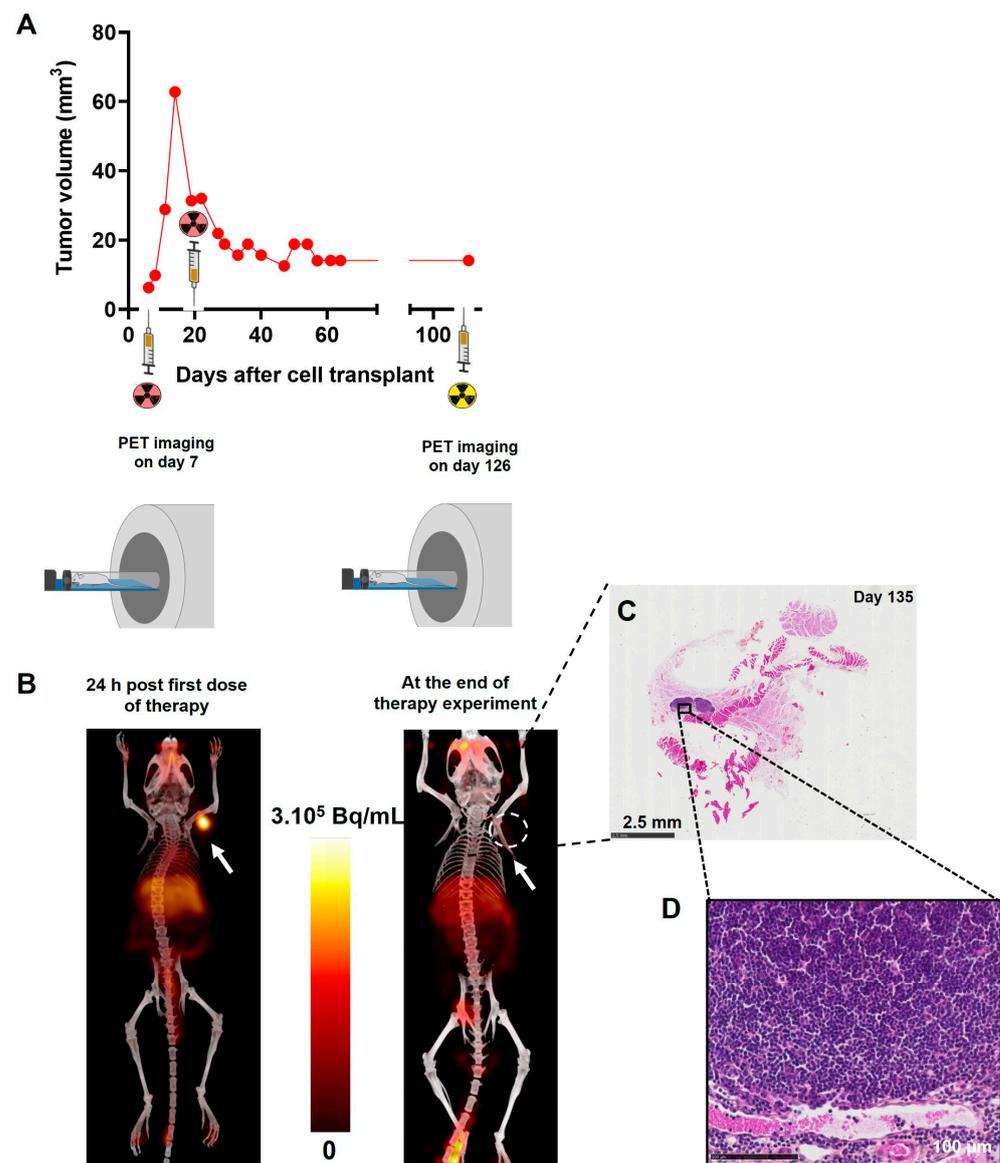


Figure 8. For illustration propose, specific results of the subcutaneous MOPC315.BM-bearing mouse that survived until the end of the study without any sign of disease or treatment-related toxicity are shown. (A) Tumour growth curve measured manually with a calliper. (B) PET-CT imaging performed at 24 h post injection of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 (29.6 MBq; 100 μg of 9E7.4 mAb) and at day 131 ([⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4; 8.4 MBq; 25 μg of 9E7.4 mAb) post cells inoculation. Images are presented as maximum intensity projection (MIP) and no smoothing was applied to PET and CT images. Arrows indicate the location of MOPC315.BM tumour. (C) HPS histological staining of the tissue taken from the initial tumour site. (D) Magnification of histological staining at the lymph node.

4. Discussion

Theoretically, the nuclear properties of copper-64 (β^+ 17.4%; β^- 39.0%, EC 44%) make it a promising radioisotope for theranostic use [2]. Indeed, copper-64 emits low energy positrons, which are suitable for PET imaging and allow one to obtain highly resolved PET images. Additionally, it emits β^- particles and Auger electrons enabling, via the adaptation of the administered activity, one to obtain a therapeutic effect.

Here, we tested a theranostic approach using a ^{64}Cu -radiolabelled antibody in an orthotopic and ectopic murine model of multiple myeloma based on intravenous and subcutaneous injection of myeloma cells in immunocompetent mice.

Based on the results previously published [20,26], we selected the TE1PA as a copper-64 chelating agent for the 9E7.4 antibody radiolabelling. Indeed, the use of the TE1PA chelate significantly reduces the transchelation phenomenon that causes the release of copper-64 in its free form and that can be taken up by the metalloproteins involved in copper transport. This transchelation phenomenon is more prominent when using DOTA or NOTA as copper-64 chelate and results in the redistribution of free copper-64 into the blood, lungs, and heart [20]. After radiolabelling and immunoreactivity verification, the radioimmunoconjugate, ^{64}Cu TE1PA-9E7.4, was tested for its potential theranostics performances including diagnostic and targeted radionuclide therapy.

First, the ^{64}Cu TE1PA-9E7.4 was evaluated as an imaging agent by PET-CT in subcutaneous tumour-bearing mice and ex vivo biodistribution at different times post radioimmunoconjugate injection. Contrasts were excellent at 24 h after ^{64}Cu TE1PA-9E7.4 injection, with high tumour-to-background ratios (Table S3). Ex vivo biodistribution studies were in accordance with radioactive signal in PET images, showing that tumour uptake of ^{64}Cu TE1PA-9E7.4 was 2.4-fold higher in the MOPC315.BM model, compared with the 5T33 model, with 32.3 ± 5.7 %ID/g and 13.6 ± 5.4 %ID/g, respectively [20]. This binding was significant and stable up to 48 h post injection. Hepatic uptake in this MOPC315.BM model was also high and was comparable with that found in the 5T33 model using ^{64}Cu TE1PA-9E7.4, with 9.1 ± 1.5 %ID/g and 12.0 ± 1.0 %ID/g respectively [20]. This high tracer uptake in the liver can be due to CD138 expression by normal hepatocytes that compose the liver parenchyma [28,29]. In all other tissues and organs, ^{64}Cu TE1PA-9E7.4 clearance was rapid, most notably in the vascular compartment which allowed identification of tumour foci as early as 2 h after tracer injection and then at 24 h with a good tumour-to-organ contrast. High contrast images are also due to the relatively low maximum energy of the positrons emitted by copper-64, which reduces the travel of the positrons in the matter before annihilation and limits the diffusion of the PET signal.

The dosimetric study performed from the ex vivo biodistribution results was in line with PET-CT imaging. The long-lasting high tumour uptake appeared promising for therapy. However, according to dosimetric calculations, the liver was considered to be the critical organ in terms of toxicity, so particular attention was paid to the detection of toxicity signs in this organ during our therapeutic studies by measuring AST and ALT transaminases.

Therapeutic experimentation on the orthotopic MOPC315.BM model demonstrated an anti-tumour effect of ^{64}Cu TE1PA-9E7.4 with significant improvement of survival in several cohorts. This efficacy cannot be attributed to the 9E7.4, as, when it was injected (as non-radiolabelled) at the same dose (100 μg), it did not increase mice survival and non-vectorized copper (^{64}Cu) chloride (^{64}Cu Cl₂) had only a very limited effect on survival. The potential efficacy of ^{64}Cu Cl₂ as a therapeutic agent is based on the elevated demand for copper from tumour cells and the overexpression of copper transports. In a preclinical study, ^{64}Cu Cl₂ was evaluated as a theranostic agent in B16F0 and A375M melanoma tumours, overexpressing the copper transporter Ctr1. The results show the ability of ^{64}Cu Cl₂ to visualise tumours by PET imaging and to produce an anti-tumour effect with a slowing cell proliferation and an improved survival of mice injected with 74 MBq compared with untreated mice [30].

In the orthotopic model, the maximum tolerated dose for [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 was not reached in spite of elevated injected activities. Only skin toxicity at the injection site on the tail has been observed in some mice that had received the highest activities (65 MBq cohort). Dose-escalation showed that 55 MBq was the most effective activity in improving survival, but without cure. Similar results were obtained in the 5T33 model of MM with 18.5 MBq of [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-9E7.4 [13]. A recent preclinical study compared the therapeutic efficacy of copper-64 to a lutetium-177 human prostate cancer xenograft model [12]. The results show that a single injection of 150 MBq of [⁶⁴Cu]Cu-DOTA_{H2}-PSMA or 120 MBq of [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 significantly increased the median survival of mice compared with control mice with similar results and without inducing significant toxicity. However, these experiments were performed in immunodeficient mice with an NOD-*Rag1*^{null} *IL2rg*^{null} (NRG) strain that is a radioresistant host [31]. Therefore, toxicity results need to be interpreted carefully within this particular context.

The therapeutic efficacy demonstrated in our study on immunocompetent mice was accompanied by moderate and transient haematologic toxicity affecting white blood cells and platelets. No platelet toxicity was observed in the MOPC315.BM heterotopic model. This seems to indicate an induced toxicity at the level of platelet precursors present in the BM where the tumour cells targeted by the treatment are also found in the orthotopic model. Additionally, in control mice, a progressive decrease in platelets over time was observed, indicating a possible toxicity induced by the progression of the disease.

Beyond an activity of 55 MBq as a single dose, the treatment is no longer as effective. A lack of therapeutic efficacy was demonstrated for mice treated with 65 MBq that developed signs of paralysis. Contrary to that which was observed in the other cohorts, mice that received 65 MBq activity showed a significant increase in ALT levels at the time of sacrifice, reflecting liver toxicity. As with the other cohorts, the toxicity on white blood cell and platelet counts was transient, although relatively more severe and slower to return to physiological levels. It is also important to note that, in this 65 MBq treated group, one mouse that showed signs of acute toxicity had to be sacrificed very early after rapid and significant weight loss. These results suggest that the therapeutic effectiveness of 65 MBq is limited by the induced toxicity. Again, equivalent results were observed with a 27.75 MBq injection of [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-9E7.4 [13], suggesting deleterious toxicity to the liver and bone marrow. This beta emitter-induced liver and bone marrow toxicity has also been seen in the clinic. In particular with [¹⁷⁷Lu]Lu-J591 in the treatment of metastatic prostate cancer, which causes bone marrow toxicity in patients and leads to a limitation of administered activities [32].

In nuclear medicine, therapeutic protocols deliver the treatment by fraction in order to preserve healthy tissue as much as possible and to potentiate its effectiveness [33]. Previous preclinical studies have also demonstrated the efficacy of repeated dosing compared with single-dose therapy [34–36]. Therefore, we evaluated a repeat dose of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 in the preclinical orthotopic model. Monitoring of haematological toxicity during dose escalation allowed us to identify the nadir of the most treatment-impacted blood elements, white blood cells and platelets, which is reached one week after treatment injection. For repeated-dose therapy experiments, we chose a 2-week dose interval to allow the mice to recover from the effects of the first dose before treating again.

Although our study in the orthotopic model was performed in small cohorts, repeat treatments with 35 MBq (*n* = 6) or 55 MBq (*n* = 6) of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 significantly improved the survival of mice compared with the control mice. Repeated administration of 35 MBq of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 resulted in the survival of two mice, or approximately 30% of the cohort, who showed no signs of toxicity until the end of the study. In these two mice, AST levels measured at sacrifice were equivalent to those of the mice before tumour cell engraftment. In parallel, AST levels increased in the diseased mice, both control and treated. The evolution of this transaminase level could not be regularly evaluated during the study, which seems predictive of the disease progression, and can serve as a prognostic factor. Clinical studies have previously been able to identify liver abnormalities in MM

patients that presented increased AST levels [37], and another study has suggested that elevated AST levels in patients are associated with a poor vital prognosis [38]. Furthermore, the aggressiveness and robustness of the MOPC315.BM model—for which it has been shown that, with only 1000 cells injected into mice, 100% of individuals developed paraplegia within 3–4 weeks [18]—allows us to demonstrate the efficacy of our treatment on these cured mice that would have inevitably developed signs of disease had they not been treated.

Repeat dosing with 55 MBq activity did not improve the therapeutic response induced by a single 55 MBq dose. As with the cohort treated with 65 MBq, at sacrifice, ALT levels suggested liver toxicity that offset therapeutic efficacy. Injection of a third dose could almost certainly have further improved the survival of the mice, while avoiding liver or blood toxicity. This was demonstrated in a previous preclinical study in a mouse xenograft model of melanoma [39] in which injection of 3 doses of 25 MBq of [¹³¹I]ICF15002, a small molecule targeting melanin expressed by pigmented melanoma cells, slowed tumour proliferation with a doubling time of 17.7 ± 0.4 days with 2 doses of 25 MBq to 26.5 ± 7.8 days. Due to the logistics of ⁶⁴Cu production and radiolabelling, other dosing schemes with multiple injections and/or shorter dose intervals could not be considered in this work. However, with our experimental conditions, we demonstrated the theranostic potential of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 with therapeutic efficacy comparable to or even more effective than lutetium-177 in the 5T33 model [13].

Beta emitters remain interesting because they are more readily available and at a lower cost, and their therapeutic efficacy is proven. The properties of beta emitters could have an advantage especially in more advanced stages of the disease with larger tumour lesions in which the beta particles ranges would be of interest.

In this work we also evaluated the theranostic potential of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, on larger and less accessible tumour lesions. MOPC315.BM cells were subcutaneously injected in the same mouse strain, BALB/cJrj. This model permits a direct estimation of the treatment effect on the tumour mass in order to evaluate a possible anti-tumour effect. A repeated dose delayed tumour proliferation by about 20 days and significantly improved the survival of the mice. In parallel, although the small number of animals in this cohort ($n = 3$) must be taken into account, the administration of [⁶⁴Cu]CuCl₂ failed to slow tumour progression. No survival improvement was observed compared with the control group. This lack of beneficial effect observed in the subcutaneous ectopic model may be explained by the lack of accessibility of the tumour cells, whereas in the orthotopic model where the cells are injected intravenously, the myeloma lesions are close to the vascular zone, so that a relative therapeutic effect was observed.

With the injection of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 a moderate and transient decrease in white blood cells was observed, and, in two mice, the antiproliferative effect lasted for several weeks with one mouse being completely cured. A preclinical study evaluating the therapeutic potential of copper-64 on a primary tumour mass showed similar results in a rat pancreatic cancer model with a somatostatin-like peptide [7]. Repeat injections of 3 doses (3×740 MBq) stopped tumour proliferation for about 10 days during which the tumours were not palpable, before they grew back in all animals.

Interestingly, in the cohort of subcutaneous tumour-bearing mice treated with [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4, the mice were killed before the end of the study due to the appearance of signs of lower limb paralysis. The control mice were sacrificed because of a tumour mass approaching 2000 mm³. It seems that, with the prolonged survival, the MOC315.BM cells had time to detach from the tumour mass and migrate to the bone marrow. This observation corroborates the healing results obtained in the orthotopic model. Indeed, in the mouse that survived without tumour recurrence for up to 80 days, the residual cells in the bone marrow after treatment eventually proliferated given the highly invasive nature of this tumour line. This explains the very late recurrence observed in this mouse. On the other hand, the cure seems complete for the mouse in which no signs of the disease were observed, even after 100 days.

Our approach combines the exceptional specificity/affinity of the 9E7.4 anti-CD138 antibody with the high sensitivity of ^{64}Cu -based PET imaging. On the one hand, ^{64}Cu allows rapid, stable and high molar activity radiolabelling of the antibody at room temperature and particular decay properties of ^{64}Cu allows for high resolution PET images. On the other hand, the high affinity/specificity of the 9E7.4 antibody for CD138 and the sufficiently high and long-lasting tumour uptake of the radio-immunoconjugate allows for efficient irradiation of the tumour lesions.

Our results provide confirmation of the theranostic potential of ^{64}Cu -radiolabelled vectors and pave the way for further theranostic evaluation of copper-64-based therapies, evaluating different therapeutic regimens including shorter treatment intervals or longer administration cycles, as well as combination therapy with chemotherapy or immunotherapy. A recent study has reported the enhanced effectiveness of combination therapy using [^{64}Cu]Cu-NOTA-panitumumab F(a') 2 with radiosensitizing Gemcitabine and the PARP inhibitor, rucaparib, in terms of slowing tumour growth and improving median survival [8]. Additionally, combination of ^{64}Cu -based targeted radionuclide therapy using the $\alpha\beta 3$ integrin-targeted ^{64}Cu -DOTA-EB-cRGDfK (925 MBq/kg) with programmed death-ligand 1 (PD-L1)-based immunotherapy using $\alpha\text{PD-L1}$ mAb (10 mg/kg) has been tested in an MC38 tumour model and resulted in a significant delay in tumour growth [40]. It is well established that ionizing radiation-based therapies (radiotherapy and TRT) can stimulate the immune system in several ways. For example, targeted radiotherapy, including RIT, can contribute to the shifting of an immunosuppressive tumour microenvironment to a more favourable immune stimulatory effect. Hence, it makes sense to combine TRT with immunotherapy to substantially enhance efficacy.

5. Conclusions

In this work, we demonstrate the ability of the copper-64 radiolabelled monoclonal antibody 9E7.4, coupled with the chelate TE1PA, to detect tumour cells that express CD138 in the MOPC315.BM syngeneic murine model of MM. This detection performance, combined with the performance of copper-64 for PET imaging, allowed the [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 to produce highly contrasted diagnostic PET images. Dosimetric estimation from ex vivo biodistribution data revealed acceptable absorbed dose values to healthy organs and tissues, and a very encouraging tumour absorbed dose for targeted radionuclide therapy applications. With high activities, the treatment showed therapeutic efficacy resulting in delayed tumour growth and increased survival without inducing major or irreversible toxicity. These promising results also demonstrate that repeated injections of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 are safe and can be effective in this syngeneic preclinical model of MM.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics15071817/s1>, Table S1: Specific activity of [^{64}Cu]Cu-TE1PA-9E7.4. Figure S1: In vivo PET-CT imaging in MOPC315.BM tumour-bearing mice; Table S2: Ex vivo biodistribution experiments in normal (healthy) mice. Table S3: Ex vivo biodistribution experiments in MOPC315.BM tumour-bearing mice.

Author Contributions: Conceptualization, L.R.-V., C.M., M.C., F.H. and A.F.-C.; methodology, L.R.-V., P.L.S., J.G., N.C. and A.F.-C.; validation, L.R.-V., N.C. and A.F.-C.; formal analysis, C.M., L.R.-V., N.C., A.F.-C. and C.C.; investigation, C.M., P.L.S., L.R.-V., N.C., S.M.-L., N.L.B., J.P., C.C., S.M.-L. and C.A.; resources, F.H., C.A., J.G., P.O.H., B.B., R.T., N.L.B. and J.P.; data curation, L.R.-V., C.M., P.L.S., A.F.-C.; writing—original draft preparation, C.M., L.R.-V. and A.F.-C.; writing—review and editing, L.R.-V., C.M., N.C., P.O.H., B.B., S.M.-L. and A.F.-C.; visualization, C.M., L.R.-V. and N.C.; supervision, L.R.-V. and A.F.-C.; project administration, L.R.-V.; funding acquisition, L.R.-V.; M.C., N.C. and F.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the NEXt “Nantes Excellence Trajectory” initiative (I-SITE call for projects), an action of the second Future Investments Program (PIA2) launched by the ‘State and implemented by the ANR (reference ANR-16-IDEX-0007). This initiative takes place in the Pays de la Loire region, in Nantes Métropole. This research was also funded by the Ligue Régionale Contre le Cancer Grand Ouest (Loire-Atlantique committee and Finistère committee).

Institutional Review Board Statement: All experiments involving animals were conducted according to the European directive 2010/63/EU and its transposition in the French law (Décret n° 2013-118). Preclinical studies were conducted on the UTE platform (SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes) (authorization D44- 278). The authorization of the animal experimentation project (APAFIS #22766; 01/2020) was delivered by the Ministry of Higher Education and Research, after a favourable opinion of the local ethics committee for animal experimentation (CEEA) of Pays de Loire (CEEA-06).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, [LRV], upon reasonable request.

Acknowledgments: We thank Catherine Sai-Maurel (Inserm UMR1307) and François Davodeau for technical expertise in the preliminary animal experiments. We thank the UTE animal facility (SFR François Bonamy), the Radioactivity technical platform (SFR François Bonamy), CIMA, the preclinical imaging facility (Centre d’Imagerie Multimodale Appliquée, CICI²NA) the Cytometry and FACS facility “CytoCell” (SFR François Bonamy), and the tissue imaging core facility “Micropicell” (SFR François Bonamy) for expert technical assistance. We thank the cyclotron Arronax for supply of copper-64. The authors gratefully acknowledge Florian Chocteau for his help in analysis and interpretation of histological images.

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

References

1. Duan, H.; Iagaru, A.; Aparici, C.M. Radiotheranostics—Precision Medicine in Nuclear Medicine and Molecular Imaging. *Nanotheranostics* **2022**, *6*, 103–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gutfilen, B.; Souza, S.A.L.; Valentini, G. Copper-64: A Real Theranostic Agent. *Drug Des. Dev. Ther.* **2018**, *12*, 3235–3245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ahmedova, A.; Todorov, B.; Burdzhiev, N.; Goze, C. Copper Radiopharmaceuticals for Theranostic Applications. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 1406–1425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. McMillan, D.D.; Maeda, J.; Bell, J.J.; Genet, M.D.; Phooswadi, G.; Mann, K.A.; Kraft, S.L.; Kitamura, H.; Fujimori, A.; Yoshii, Y.; et al. Validation of ⁶⁴Cu-ATSM Damaging DNA via High-LET Auger Electron Emission. *J. Radiat. Res.* **2015**, *56*, 784–791. [[CrossRef](#)]
5. Lewis, J.S.; Laforest, R.; Buettner, T.L.; Song, S.-K.; Fujibayashi, Y.; Connett, J.M.; Welch, M.J. Copper-64-Diacetyl-Bis(N⁴-Methylthiosemicarbazone): An Agent for Radiotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 1206–1211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Yoshii, Y.; Yoshimoto, M.; Matsumoto, H.; Tashima, H.; Iwao, Y.; Takuwa, H.; Yoshida, E.; Wakizaka, H.; Yamaya, T.; Zhang, M.R.; et al. Integrated Treatment Using Intraperitoneal Radioimmunotherapy and Positron Emission Tomography-Guided Surgery with ⁶⁴Cu-labeled Cetuximab to Treat Early- and Late-Phase Peritoneal Dissemination in Human Gastrointestinal Cancer Xenografts. *Oncotarget* **2018**, *9*, 28935–28950. [[CrossRef](#)]
7. Lewis, J.S.; Lewis, M.R.; Cutler, P.D.; Srinivasan, A.; Schmidt, M.A.; Schwarz, S.W.; Morris, M.M.; Miller, J.P.; Anderson, C.J. Radiotherapy and Dosimetry of ⁶⁴Cu-TETA-Tyr3-Octreotate in a Somatostatin Receptor-Positive, Tumor-Bearing Rat Model. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 3608–3616.
8. Boyle, A.J.; Cao, P.J.; Cai, Z.; Chan, C.; Hedley, D.W.; Reilly, R.M. Radioimmunotherapy of Human Pancreatic Cancer Xenografts in NOD-Scid Mice with [⁶⁴Cu]Cu-NOTA-Panitumumab F(Ab)² Alone or Combined with Radiosensitizing Gemcitabine and the PARP Inhibitor, Rucaparib. *Nucl. Med. Biol.* **2020**, *84–85*, 46–54. [[CrossRef](#)]
9. Yoshii, Y.; Matsumoto, H.; Yoshimoto, M.; Oe, Y.; Zhang, M.R.; Nagatsu, K.; Sugyo, A.; Tsuji, A.B.; Higashi, T. ⁶⁴Cu-Intraperitoneal Radioimmunotherapy: A Novel Approach for Adjuvant Treatment in a Clinically Relevant Preclinical Model of Pancreatic Cancer. *J. Nucl. Med.* **2019**, *60*, 1437–1443. [[CrossRef](#)]
10. Jin, Z.; Tsuji, A.B.; Degardin, M.; Sugyo, A.; Yoshii, Y.; Nagatsu, K.; Zhang, M.; Fujibayashi, Y.; Dumy, P.; Boturyn, D.; et al. Uniform Intratumoral Distribution of Radioactivity Produced Using Two Different Efficacy in a Small Animal Tumor Model. *EJNMMI Res.* **2018**, *8*, 54. [[CrossRef](#)]
11. Milot, M.-C.; Benesty, O.B.; Dumulon-Perreault, V.; Ait-Mohand, S.; Richard, P.O.; Rousseau, É.; Guérin, B. ⁶⁴Cu-DOTHA2-PSMA, a Novel PSMA PET Radiotracer for Prostate Cancer with a Long Imaging Time Window. *Pharmaceutics* **2022**, *15*, 996. [[CrossRef](#)]

12. Milot, M.-C.; Béliasant-Benesty, O.; Dumulon-Perreault, V.; Ait-Mohand, S.; Geha, S.; Richard, P.O.; Rousseau, É.; Guérin, B. Theranostic ^{64}Cu -DOTHA2-PSMA Allows Low Toxicity Radioligand Therapy in Mice Prostate Cancer Model. *Front. Oncol.* **2023**, *13*, 1073491. [[CrossRef](#)]
13. Fichou, N.; Gouard, S.; Maurel, C.; Barbet, J.; Ferrer, L.; Morgenstern, A.; Bruchertseifer, F.; Faivre-Chauvet, A.; Bigot-Corbel, E.; Davodeau, F.; et al. Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 Is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model. *Front. Med.* **2015**, *2*, 76. [[CrossRef](#)]
14. Gouard, S.; Maurel, C.; Marionneau-Lambot, S.; Dansette, D.; Bailly, C.; Guérard, F.; Chouin, N.; Haddad, F.; Alliot, C.; Gaschet, J.; et al. Targeted-Alpha-Therapy Combining Astatine-211 and Anti-Cd138 Antibody in a Preclinical Syngeneic Mouse Model of Multiple Myeloma Minimal Residual Disease. *Cancers* **2020**, *12*, 2721. [[CrossRef](#)]
15. Bailly, C.; Gouard, S.; Lacombe, M.; Remaud-Le Saëc, P.; Chalopin, B.; Bourgeois, M.; Chouin, N.; Tripier, R.; Halime, Z.; Haddad, F.; et al. Comparison of Immuno-PET of CD138 and PET Imaging with $^{64}\text{CuCl}_2$ and ^{18}F -FDG in a Preclinical Syngeneic Model of Multiple Myeloma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 9061–9072. [[CrossRef](#)]
16. Bailly, C.; Gouard, S.; Guérard, F.; Chalopin, B.; Carlier, T.; Faivre-Chauvet, A.; Saëc, P.R.L.; Bourgeois, M.; Chouin, N.; Rbah-Vidal, L.; et al. What Is the Best Radionuclide for Immuno-PET of Multiple Myeloma? A Comparison Study Between ^{89}Zr -And ^{64}Cu -Labeled Anti-CD138 in a Preclinical Syngeneic Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. White, J.M.; Escorcia, F.E.; Viola, N.T. Perspectives on Metals-Based Radioimmunotherapy (RIT): Moving Forward. *Theranostics* **2021**, *11*, 6293–6314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Hofgaard, P.O.; Jodal, H.C.; Bommert, K.; Huard, B.; Caers, J.; Carlsen, H.; Schwarzer, R.; Schünemann, N.; Jundt, F.; Lindeberg, M.M.; et al. A Novel Mouse Model for Multiple Myeloma (MOPC315.BM) That Allows Noninvasive Spatiotemporal Detection of Osteolytic Disease. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Frindel, M.; Camus, N.; Rauscher, A.; Bourgeois, M.; Alliot, C.; Barré, L.; Gestin, J.-F.; Tripier, R.; Faivre-Chauvet, A. Radiolabeling of HTE1PA: A New Monopicolinate Cyclam Derivative for ^{64}Cu Phenotypic Imaging. In Vitro and In Vivo Stability Studies in Mice. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41*, e49–e57. [[CrossRef](#)]
20. Navarro, A.-S.; Le Bihan, T.; Le Saëc, P.; Bris, N.L.; Bailly, C.; Saï-Maurel, C.; Bourgeois, M.; Chérel, M.; Tripier, R.; Faivre-Chauvet, A. TE1PA as Innovating Chelator for ^{64}Cu Immuno-TEP Imaging: A Comparative in Vivo Study with DOTA/NOTA by Conjugation on 9E7.4 MAb in a Syngeneic Multiple Myeloma Model. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 2393–2403. [[CrossRef](#)]
21. Bolch, W.E.; Eckerman, K.F.; Sgouros, G.; Thomas, S.R. MIRD Pamphlet No. 21: A Generalized Schema for Radiopharmaceutical Dosimetry—Standardization of Nomenclature. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 477–484. [[CrossRef](#)]
22. Jan, S.; Santin, G.; Strul, D.; Staelens, S.; Assié, K.; Autret, D.; Avner, S.; Barbier, R.; Bardiès, M.; Bloomfield, P.M.; et al. GATE—Geant4 Application for Tomographic Emission: A Simulation Toolkit for PET and SPECT. *Phys. Med. Biol.* **2004**, *49*, 4543–4561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Segars, W.P.; Tsui, B.M.W.; Frey, E.C.; Johnson, G.A.; Berr, S.S. Development of a 4-D Digital Mouse Phantom for Molecular Imaging Research. *Mol. Imaging Biol.* **2004**, *6*, 149–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Andersson, M.; Johansson, L.; Eckerman, K.; Mattsson, S. IDAC-Dose 2.1, an Internal Dosimetry Program for Diagnostic Nuclear Medicine Based on the ICRP Adult Reference Voxel Phantoms. *EJNMMI Res.* **2017**, *7*, 88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tomayko, M.M.; Reynolds, C.P. Determination of Subcutaneous Tumor Size in Athymic (Nude) Mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1989**, *24*, 148–154. [[CrossRef](#)]
26. Le Bihan, T.; Navarro, A.S.; Le Bris, N.; Le Saëc, P.; Gouard, S.; Haddad, F.; Gestin, J.F.; Chérel, M.; Faivre-Chauvet, A.; Tripier, R. Synthesis of: C -Functionalized TE1PA and Comparison with Its Analogues. An Example of Bioconjugation on 9E7.4 MAb for Multiple Myeloma ^{64}Cu -PET Imaging. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 4261–4271. [[CrossRef](#)]
27. Hayashi, K.; Hayashi, M.; Jalkanen, M.; Firestone, J.H.; Trelstad, R.L.; Bernfield, M. Immunocytochemistry of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycan in Mouse Tissues. A Light and Electron Microscopic Study. *J. Histochem. Cytochem.* **1987**, *35*, 1079–1088. [[CrossRef](#)]
28. Regős, E.; Karászi, K.; Reszegi, A.; Kiss, A.; Schaff, Z.; Baghy, K.; Kovalszky, I. Syndecan-1 in Liver Diseases. *Pathol. Oncol. Res.* **2020**, *26*, 813–819. [[CrossRef](#)]
29. Meyerholz, D.K.; Leidinger, M.R.; Goeken, J.A.; Businga, T.R.; Akers, A.; Vizuett, S.; Kaemmer, C.A.; Kohlmeyer, J.L.; Dodd, R.D.; Quelle, D.E. Utility of CD138/Syndecan-1 Immunohistochemistry for Localization of Plasmacytes Is Tissue-Dependent in B6 Mice. *BMC Res. Notes* **2022**, *15*, 219. [[CrossRef](#)]
30. Qin, C.; Liu, H.; Chen, K.; Hu, X.; Ma, X.; Lan, X.; Zhang, Y.; Cheng, Z. Theranostics of Malignant Melanoma with $^{64}\text{CuCl}_2$. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55*, 812–817. [[CrossRef](#)]
31. Pearson, T.; Shultz, L.D.; Miller, D.; King, M.; Laning, J.; Fodor, W.; Cuthbert, A.; Burzenski, L.; Gott, B.; Lyons, B.; et al. Non-Obese Diabetic–Recombination Activating Gene-1 (NOD–*Rag 1 Null*) Interleukin (IL)-2 Receptor Common Gamma Chain (*IL 2 R γ Null*) Null Mice: A Radioresistant Model for Human Lymphohaematopoietic Engraftment. *Clin. Exp. Immunol.* **2008**, *154*, 270–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bander, N.H.; Milowsky, M.I.; Nanus, D.M.; Kostakoglu, L.; Vallabhajosula, S.; Goldsmith, S.J. Phase I Trial of ^{177}Lu -Labeled J591, a Monoclonal Antibody to Prostate-Specific Membrane Antigen, in Patients with Androgen-Independent Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 4591–4601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. DeNardo, G.L.; Schlom, J.; Buchsbaum, D.J.; Meredith, R.F.; O'Donoghue, J.A.; Sgouros, G.; Humm, J.L.; DeNardo, S.J. Rationales, Evidence, and Design Considerations for Fractionated Radioimmunotherapy. *Cancer* **2002**, *94*, 1332–1348. [[CrossRef](#)]

34. Bonnet-Duquennoy, M.; Papon, J.; Mishellany, F.; Labarre, P.; Guerquin-Kern, J.L.; Wu, T.D.; Gardette, M.; Maublant, J.; Penault-Llorca, F.; Miot-Noirault, E.; et al. Targeted Radionuclide Therapy of Melanoma: Anti-Tumoural Efficacy Studies of a New ¹³¹I Labelled Potential Agent. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 708–716. [[CrossRef](#)]
35. Bonnet, M.; Mishellany, F.; Papon, J.; Cayre, A.; Penault-Llorca, F.; Madelmont, J.C.; Miot-Noirault, E.; Chezal, J.M.; Moins, N. Anti-Melanoma Efficacy of Internal Radionuclide Therapy in Relation to Melanin Target Distribution. *Pigment. Cell Melanoma Res.* **2010**, *23*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Joyal, J.L.; Barrett, J.A.; Marquis, J.C.; Chen, J.; Hillier, S.M.; Maresca, K.P.; Boyd, M.; Gage, K.; Nimmagadda, S.; Kronauge, J.F.; et al. Preclinical Evaluation of an ¹³¹I-Labeled Benzamide for Targeted Radiotherapy of Metastatic Melanoma. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4045–4053. [[CrossRef](#)]
37. Poudel, B.; Mittal, A.; Shrestha, R.; Farooqui, M.S.; Yadav, N.K.; Shukla, P.S. Liver Involvement in Multiple Myeloma: A Hospital Based Retrospective Study. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2012**, *13*, 2153–2155. [[CrossRef](#)]
38. Kiba, T.; Ito, T.; Nakashima, T.; Okikawa, Y.; Kido, M.; Kimura, A.; Kameda, K.; Miyamae, F.; Tanaka, S.; Atsumi, M.; et al. Bortezomib and Dexamethasone for Multiple Myeloma: Higher AST and LDH Levels Associated with a Worse Prognosis on Overall Survival. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 462. [[CrossRef](#)]
39. Rbah-Vidal, L.; Vidal, A.; Billaud, E.M.F.; Besse, S.; Ranchon-Cole, I.; Mishellany, F.; Perrot, Y.; Maigne, L.; Moins, N.; Guerquin-Kern, J.L.; et al. Theranostic Approach for Metastatic Pigmented Melanoma Using ICF15002, a Multimodal Radiotracer for Both PET Imaging and Targeted Radionuclide Therapy. *Neoplasia* **2017**, *19*, 17–27. [[CrossRef](#)]
40. Wen, X.; Zeng, X.; Liu, J.; Zhang, Y.; Shi, C.; Wu, X.; Zhuang, R.; Chen, X.; Zhang, X.; Guo, Z. Synergism of ⁶⁴Cu-Labeled RGD with Anti-PD-L1 Immunotherapy for the Long-Acting Antitumor Effect. *Bioconjug. Chem.* **2022**, *33*, 2170–2179. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Preclinical Evaluation of a ⁶⁴Cu-Based Theranostic Approach in a Murine Model of Multiple Myeloma

Cassandra Métivier ¹, Patricia Le Saëc ¹, Joëlle Gaschet ¹, Catherine Chauvet ¹, Séverine Marionneau-Lambot ², Peter O. Hofgaard ³, Bjarne Bogen ³, Julie Pineau ⁴, Nathalie Le Bris ⁴, Raphaël Tripier ⁴, Cyrille Alliot ^{1,5}, Férid Haddad ^{6,5}, Michel Chérel ^{1,7}, Nicolas Chouin ⁸, Alain Faivre-Chauvet ² and Latifa Rbah-Vidal ^{1,*}

¹ Nantes Université, Inserm, CNRS, Université d'Angers, CRCI²NA, 44007 Nantes, France; cassandra.metivier@etu.univ-nantes.fr (C.M.); patricia.lesaec@univ-nantes.fr (P.L.S.); joelle.gaschet@univ-nantes.fr (J.G.); catherine.chauvet@univ-nantes.fr (C.C.); cyrille.alliot@univ-nantes.fr (C.A.); michel.cherel@univ-nantes.fr (M.C.)

² Nantes Université, Inserm, CNRS, Université d'Angers, CRCI²NA, CHU Nantes, 44007 Nantes, France; severine.marionneau-lambot@univ-nantes.fr (S.M.-L.); alain.faivre-chauvet@univ-nantes.fr (A.F.-C.)

³ Department of Immunology, Oslo University Hospital, 04024 Oslo, Norway; p.o.hofgaard@medisin.uio.no (P.O.H.); bjarne.bogen@medisin.uio.no (B.B.)

⁴ Univ. Brest, UMR CNRS 6521 CEMCA, 6 Avenue Victor le Gorgeu, 29200 Brest, France; julie.pineau@univ-brest.fr (J.P.); nathalie.lebris@univ-brest.fr (N.L.B.); raphael.tripier@univ-brest.fr (R.T.)

⁵ GIP ARRONAX, 44800 Saint-Herblain, France

⁶ IMT Atlantique, Nantes Université, Subatech, 44307 Nantes, France; haddad@arronax-nantes.fr

⁷ Nuclear Medicine Department, ICO-René Gauducheau Cancer Center, 44800 Saint-Herblain, France

⁸ Nantes Université, Inserm, CNRS, Université d'Angers, Oniris, CRCI²NA, 44007 Nantes, France; nicolas.chouin@oniris-nantes.fr

* Correspondence: latifa.rbah-vidal@univ-nantes.fr

Table S1 : Specific activity of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4.

Experiments	PET imaging	Therapy using 22MBq	Therapy using 35 MBq	Therapy using 55 MBq	Therapy using 65 MBq
Specific activity (MBq/mg) at the end of radiosynthesis	236	262	383 ± 46	580 ± 50	651

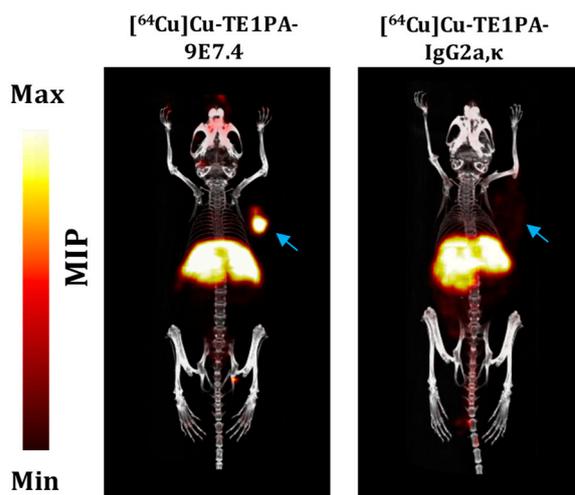


Figure S1. In vivo PET-CT imaging in MOPC315.BM tumour-bearing mice. Images were acquired 24 h after i.v injection of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 (10.01 MBq ;25 µg of 9E7.4) or [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-IgG2a,κ (7.1 MBq; 25 µg of IgG2a,κ isotype). Mice were imaged 5 minutes, 2, 24, 48 and 72 h post injection. Images are presented as MIP ("maximum intensity projection"). Blue arrows indicate the location of the MOPC315.BM tumour.

Table S2: Ex vivo biodistribution experiments in normal (healthy) mice. Experiments were performed at 5 minutes, 2, 24, 48 and 72 h post intravenous injection of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 (8.5 ± 0.75 MBq ;25 µg of 9E7.4).. * Values statistically different from the values obtained in the biodistribution of mice bearing a MOPC315.BM s.c tumour; † statistically different from that obtained at the previous time p.i (multiple t-tests with the Holm-Sidak method, p<0.05).

	Healthy mice				
	5 min p.i	2 h p.i	24 h p.i	48 h p.i	72 h p.i
Liver	35.8 ± 8.4	27.8 ± 12.3	21.8 ± 5.8 *	15.0 ± 3.8 *†	15.7 ± 1.4 *
Blood	26.6 ± 7.8	14.6 ± 8.2 †	7.0 ± 1.2 *	5.3 ± 0.6 *	2.7 ± 0.07 *
Muscle	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2
Salivary glands	3.3 ± 1.1	ND	3.8 ± 0.9	3.4 ± 0.3	3.1 ± 0.3 *
Brain	1.2 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1
Nodes	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.7 ± 0.4	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.2
Bones	2.1 ± 0.4	2.0 ± 1.0	1.9 ± 0.4	1.7 ± 0.4	1.5 ± 0.2
Lungs	11.0 ± 3.8	6.1 ± 3.1	6.5 ± 1.5	5.8 ± 1.2	5.8 ± 0.9 *
Heart	9.2 ± 3.1	5.1 ± 2.5	3.6 ± 0.8	3.0 ± 0.4	2.5 ± 0.2
Spleen	6.9 ± 1.7	10.9 ± 4.7	13.7 ± 2.7 *	12.5 ± 2.5 *	11.8 ± 1.4 *

Kidneys	9.8 ± 3.0	10.5 ± 4.7	8.8 ± 1.5	7.1 ± 0.8	5.2 ± 0.4 *
Empty bowel	3.0 ± 0.8	3.8 ± 1.1	7.5 ± 1.5 *	8.5 ± 1.3 *	6.9 ± 0.7 *
Empty stomach	1.7 ± 0.8	2.3 ± 0.4	3.5 ± 0.9	3.2 ± 0.8	3.2 ± 0.1 *

Table S3: Ex vivo biodistribution experiments in MOPC315.BM tumour bearing mice. Experiments were performed at 5 minutes, 2, 24, 48 and 72 h post intravenous injection of [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 (8.46 ± 0.47 MBq ;25 µg of 9E7.4). Tumor-to-selected tissues ratios at 24 and 48 h p.i. are also presented. * Values statistically different from the values obtained in the biodistribution of healthy mice; † values statistically different from that obtained at the previous p.i. time (multiple t-tests with the Holm-Sidak method, p<0.05).

Tumour-bearing mice s.c MOPC315.BM

	5 min p.i	2 h p.i	24 h p.i	48 h p.i	72 h p.i
Tumor	9.2 ± 0.7	45.6 ± 5.1 †	32.3 ± 5.7 †	62.5 ± 17.1 †	33.2 ± 12.5 †
Liver	29.8 ± 0.4	23.5 ± 1.6 †	10.4 ± 2.1 *†	9.1 ± 1.5 *†	7.2 ± 1.0 *
Blood	27.8 ± 2.9	10.9 ± 0.4 †	2.8 ± 0.3 *†	2.5 ± 0.3 *	1.4 ± 0.2 *
Muscle	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0 *
Salivary glands	2.5 ± 0.4	1.9 ± 0.3	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Brain	1.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Nodes	0.8 ± 0.2	1.3 ± 1.3	1.7 ± 0.6	0.98 ± 0.2	1.0 ± 0.4
Bones	2.0 ± 0.3	1.6 ± 0.3	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Lungs	12.6 ± 2.4	5.5 ± 0.3 †	3.0 ± 0.3	3.1 ± 0.4	2.0 ± 0.3 *
Heart	8.9 ± 0.6	4.3 ± 0.3 †	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Spleen	5.3 ± 0.5	7.3 ± 1.2	4.9 ± 0.8 *	6.1 ± 0.8 *	4.3 ± 0.8 *
Kidneys	8.6 ± 0.7	12.0 ± 1.0	6.8 ± 0.2 †	6.1 ± 0.5	3.5 ± 0.1 *
Empty bowel	2.33 ± 0.37	4.9 ± 0.7	3.0 ± 0.5 *	4.0 ± 0.8 *	2.0 ± 0.3 *
Empty stomach	1.55 ± 0.18	2.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.1 ± 0.1 *
<i>Tumor-to-blood ratio</i>			11.5 ± 2.0	24.2 ± 5.4	
<i>Tumor-to-muscle ratio</i>			65.5 ± 22	145 ± 44	
<i>Tumor-to-liver ratio</i>			3.1 ± 0.1	6.7 ± 1.5	
<i>Tumor-to-bone ratio</i>			37.8 ± 7.9	62.2 ± 13.7	

Titre : Développement d'une approche théranostique utilisant le cuivre-64 dans un modèle murin de myélome multiple

Mots clés : théranostique, cuivre-64, imagerie TEP, radiothérapie interne vectorisée, myélome multiple

Résumé : La médecine nucléaire porte un intérêt grandissant à l'approche théranostique intégrant des outils de diagnostic à la stratégie thérapeutique. En oncologie nucléaire, cette approche repose sur l'utilisation de molécules de ciblage spécifiques de la tumeur ou de son microenvironnement, associées à des radionucléides, qui permettent, selon leurs propriétés d'émission, de combiner le diagnostic par l'imagerie moléculaire radioisotopique (TEP ou TEMP) et la radiothérapie interne vectorisée (RIV). Dans cette perspective, le cuivre-64 est un radionucléide innovant, qui possède des propriétés de désintégration adaptées pour l'imagerie TEP et potentiellement pour la RIV. Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons développé et évalué une approche théranostique utilisant un anticorps anti-CD138 (AcM 9E7.4) radiomarqué au cuivre-64, le

[⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 chez un modèle murin de myélome multiple. Les résultats de l'imagerie par tomographie par émission de positons utilisant le [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 démontrent la capacité de radioimmunoconjugué à cibler les tumeurs surexprimant le CD 138. L'analyse dosimétrique effectuée à partir des données de biodistribution murine a révélé des valeurs de dose acceptables pour une utilisation en RIV. Le traitement avec des activités élevées a montré une efficacité thérapeutique avec un retard de la croissance tumorale et une augmentation de la survie associée à une toxicité modérée et transitoire. La deuxième partie de ces travaux détaille la production d'un anticorps anti-CXCR4 humain (AcM 12G5) radiomarqué au cuivre-64, et évalué pour ses capacités à cibler CXCR4 dans différentes lignées humaines du myélome multiple.

Title : Development of a theranostic approach using copper-64 in a murine multiple myeloma model

Keywords : theranostic, copper-64, PET imaging, targeted radionuclide therapy, multiple myeloma

Abstract : Nuclear medicine is increasingly interested in the theranostic approach, which integrates diagnostic tools into therapeutic strategies. In nuclear oncology, this approach is based on the use of targeting molecules specific to the tumour or its microenvironment, associated with radionuclides, which according to their emission properties, make it possible to combine diagnosis by radioisotope molecular imaging (PET or SPECT) and targeted radionuclide therapy (TRT). In this perspective, copper-64 is an innovative radionuclide, which has decay properties suitable for PET imaging and potentially for TRT. In the first part of this work of thesis, we developed and evaluated a theranostic approach using a copper-64 radiolabelled anti-CD138 antibody (mAb 9E7.4),

[⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 in a mouse model of multiple myeloma. Positron emission tomography imaging results using [⁶⁴Cu]Cu-TE1PA-9E7.4 demonstrate the ability of radioimmunoconjugate to target CD138 overexpressing tumours. Dosimetric analysis using murine biodistribution data indicated acceptable dose values for a TRT use. Treatment with high activities showed therapeutic efficacy with delayed tumour growth and increased survival associated with moderate and transient toxicity. The second part of this work details the production of a copper-64 radiolabelled anti-human CXCR4 antibody (mAb 12G5), evaluated for its ability to target CXCR4 in different human multiple myeloma lines.