

TABLE DES MATIERES

Table des sigles et abréviations	3
Introduction.....	5
I. Gliome et Glioblastome : définition, classification, clinique, stratégie thérapeutique	8
A. Définition et classification	8
B. Aspects cliniques et diagnostic	10
C. Épidémiologie	11
D. Stratégie thérapeutique du glioblastome	13
1) Stratégie thérapeutique standard	13
2) Les nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées	18
II. Nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188	24
A. Les nanocapsules lipidiques	24
1) Composition	24
2) Formulation	25
3) Caractérisation de la formulation de NCL	27
4) Données non cliniques	28
B. Le rhénium.....	29
1) Caractéristiques physico-chimiques	29
2) Production de rhénium-188	32
3) Caractérisation de l'élution de rhénium-188	35
4) Utilisations cliniques	35
C. Le complexe ¹⁸⁸ Re-SSS	37
1) Formule / Structure	37
2) Synthèse	38
3) Caractérisation du complexe rhénium-SSS	39
D. Synthèse non automatisée de NCL chargées en rhénium	40
III. Stratégie de la radiothérapie interne vectorisée par NCL chargées en rhénium-188	41
A. Données précliniques concernant l'utilisation de ¹⁸⁸ Re-SSS NCL	41
B. Programme de transfert à la clinique	43
1) Programme « IRAD »	44
2) Programme « RADIOHEAD»	44

C.	Problématiques liées à la production automatisée de lots cliniques expérimentaux de NCL radioactives.....	49
1)	Contextes juridiques, et référentiels.....	49
2)	Automatisation	50
3)	Automate de production	52
IV.	Développement d'une synthèse automatisée de NCL chargées en rhénium	58
	Introduction.....	58
A.	Matériels et Méthodes.....	59
1)	Matériels.....	59
2)	Automatisation de la production des NCL blanches sur automate SynChrom® R&D, Raytest®.....	60
3)	Production non automatisée des NCL chargées en rhénium-188	63
4)	Automatisation de la production de NCL radioactives	63
5)	Caractérisations	72
B.	Résultats	78
1)	Automatisation de la production de NCL blanches.....	78
2)	Production non automatisée des NCL chargées en rhénium-188	83
3)	Automatisation de la production de NCL radioactives	84
C.	Discussion	100
1)	Automatisation de la production de NCL blanches.....	100
2)	Automatisation de la production de NCL radioactives	102
	Conclusion	112
	Références Bibliographiques.....	114
	Table des figures	125
	Table des tableaux	128
	ANNEXES	129

TABLE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

^{18}F -FDG	2-désoxy-2-(^{18}F) fluoro-D-glucose
^{188}Re	rhénium-188
^{188}Re -SSS	Complexe bis(trithioperoxybenzoate)(dithiobenzoate) de rhénium-188
^{188}Re -SSS-NCL	Nanocapsules chargées en complexe bis(trithioperoxybenzoate)(dithiobenzoate) de rhénium-188
^{188}W	tungstène-188
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	technétium-99 métastable
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS	Complexe bis(trithioperoxybenzoate)(dithiobenzoate) de technétium-99m
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS-NCL	Nanocapsules chargées en complexe bis(trithioperoxybenzoate)(dithiobenzoate) de technétium-99m
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	Agence Nationale de Sécurité des Médicaments
ARS	Agence Régionale de Santé
AVK	Anticoagulant anti-vitamine K
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BPP	Bonnes pratiques de Préparations
CED	Convection Enhanced Delivery (distribution accrue par convection)
cGRPP	Current Good Radiopharmacy Practice
c-KIT	Mast/stem Cell Growth Factor Receptor (SCFR) (recepteur du facteur de croissance des cellules souches ou des mastocytes)
c-MET	Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR) (recepteur du facteur de croissance des hépatocytes)
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CMC	Chemistry, Manufacturing and Control
CPP	Comité de Protection des Personnes
CSP	Code de la Santé Publique
DTB	Dithiobenzoate de sodium
EGF/EGFR	Epidermal Growth Factor (facteur de croissance épidermique) / Epidermal Growth Factor Receptor
GBM	Glioblastome
GMP	Good Manufacturing Practice
HAS	Haute Autorité de Santé
HEDP	Acide 1-Hydroxyethylidene-1, 1-Diphosphonique
HDD	4-hexadecyl 1-2,9,9-tetramethyl-4,7-diaza-1,10-decanethiol
EANM	European Association of Nuclear Medicine
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
LCR	Liquide céphalo-rachidien
m-TOR	Mammalian Target Of Rapamycin (cible de la rapamycine chez les mammifères)

Me-SSS	Complexe bis(trithioperoxybenzoate)(dithiobenzoate) de métal (188Re ou 99mTc)
Me-SSS-NCL	Nanocapsules chargées en complexe bis(trithioperoxybenzoate)(dithiobenzoate) de métal (188Re ou 99mTc)
MGMT	Méthyl Guanine méthyl Transférase
NCL	NanoCapsules Lipidiques
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Principe Actif
PC	Phosphatidy Choline
PDGF/PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor (facteur de croissance dérivé des plaquettes) / Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PE	Phosphatidyl Ethanolamine
PEG	Poly Ethylène Glycol
PEG-HS	Poly Ethylène Glycol-Hydroxyl Stéarate
PKC	Protéine Kinase C
PTCA	Angioplastie Coronaire Transluminale Percutanée
PUI	Pharmacie à Usage Intérieur
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RE	Radiothérapie externe
RIV	Radiothérapie interne vectorisée
SNC	Système Nerveux Central
TAE	Embolisation TransArtérielle
TACE	ChimioEmbolisation TransArtérielle
TEMP	Tomographie par Émission Mono-Photonique
VEGF / VEGFR	Vascular Endotheliale Growth Factor (facteur de croissance de l'endothelium vasculaire) / Vascular Endotheliale Growth Factor Receptor

INTRODUCTION

Améliorer le traitement du glioblastome est un enjeu de santé publique faisant l'objet de nombreuses recherches, en témoigne les 289 études cliniques qui sont ouvertes à travers le monde dont 19 en France¹. Un seul essai clinique récent (ouverture en mars 2014) étudie la radiothérapie interne vectorisée.

L'unité Micro et Nanomédecine Biomimétiques Inserm UMR_S 1066 dirigée par le Professeur Jean-Pierre Benoit a développé et breveté un système nanoparticulaire, les nanocapsules lipidiques (NCL) qui présente de nombreux avantages. La production des NCL utilise uniquement des matières premières pharmacopées et leur structure, un cœur lipidique entouré par une barrière d'agents tensio-actifs, permet aussi bien l'encapsulation d'agents anticancéreux pour la chimiothérapie [1]–[6] que de radionucléides pour la radiothérapie [7]–[9]. Parmi les isotopes utilisés en médecine nucléaire, le rhénium-188 est un radionucléide émetteur bêta (-) dont les propriétés physiques (nature et énergie du rayonnement, période physique, production à partir d'un générateur) sont intéressantes pour la radiothérapie interne des cancers [10].

L'un des atouts de la radiothérapie interne vectorisée par des nanocapsules radioactives est qu'elle permet, contrairement à la radiothérapie externe qui va irradier des tissus sains sur le trajet du faisceau incident, de confiner la dose d'irradiation délivrée à la zone tumorale (lors d'une injection intratumorale). Des études précliniques réalisées au sein de l'UMR_S 1066 ont évalué avec succès l'efficacité de ces nanocapsules chargées en rhénium dans un modèle de glioblastome chez le rat avec un taux d'éradication des

¹ Données issues de la consultation du site ClinicalTrials.gov au 31/07/2014

tumeurs de près de 83% [7] mais également dans un modèle d'hépatocarcinome chez le rat permettant avec succès une augmentation de la médiane de survie de 54% [8].

Les ^{188}Re -SSS-NCL représentent donc un outil de vectorisation thérapeutique à fort potentiel pour la prise en charge de patients atteints de tumeurs solides et notamment de GBM. Cette technologie pourrait également être utilisée pour le carcinome hépatocellulaire dont les possibilités de traitements sont actuellement limitées [11].

La possibilité d'automatiser la production des NCL chargées en rhénium-188 est un enjeu crucial dans le développement préclinique et clinique de ce radiopharmaceutique. En effet, en termes de limitation de l'irradiation des opérateurs notamment lors des productions à hautes activités, et en termes de maîtrise des différents paramètres de production, l'automatisation représente une étape indispensable permettant le transfert de cette technologie vers la clinique et vers les industriels.

L'objectif de ce travail est d'automatiser la production de nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188 en vue d'une production de lots cliniques expérimentaux. Les réactivités physique et chimique proches entre le rhénium et le technétium, permettent d'utiliser le technétium, émetteur gamma, comme modèle dont la dosimétrie est plus favorable. Ceci est intéressant durant la mise au point du radiomarquage nécessitant plusieurs interventions manuelles. L'automatisation implique le montage et la programmation de l'automate afin de reproduire et d'optimiser les étapes de synthèse du complexe de rhénium-188-SSS (Re-SSS) et de la formulation des NCL.

Dans un premier temps, l'automatisation de nanoformulations blanches, c'est-à-dire ne contenant pas de radionucléides, sera développée. Dans un deuxième temps, les productions sur paillasse (= à petite échelle et non automatisée) de ^{188}Re -SSS-NCL seront analysées en particulier concernant les rendements de production. Dans un troisième temps, les études réalisées porteront sur la production de NCL chargées en

^{99m}Tc . Certaines étapes, solubilisation et purification, seront spécifiquement étudiées et adaptées pour permettre une automatisation plus aisée. En effet, le Labrafac[®], huile entrant dans la composition des NCL, a été étudié comme solvant alternatif au dichlorométhane. De même une méthode de purification plus adaptée au procédé automatisé a été étudiée.

I. GLIOME ET GLIOBLASTOME : DÉFINITION, CLASSIFICATION, CLINIQUE, STRATÉGIE THÉRAPEUTIQUE

A. Définition et classification

Sur le plan histologique, le SNC est composé de 3 principales populations cellulaires : les neurones, les cellules gliales, et les cellules vasculaires. Entre ces différents types cellulaires se loge la matrice extracellulaire. Il existe 4 variétés de cellules gliales : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires et les cellules microgliales. Les glioblastomes dérivent des cellules astrocytaires.

Les astrocytes sont nettement plus nombreux que les neurones (ratio 10 : 1) et représentent 25 à 50 % du volume cérébral [12]. Ces cellules ont de nombreux rôles qui ne sont pas encore tous parfaitement connus. On peut cependant citer les rôles suivants [12] :

- rôle de support physique. Leur densité dans le cerveau leur permettrait de constituer le réseau tridimensionnel qui assure le maintien des structures cérébrales.
- rôle synaptique par le recyclage des neurotransmetteurs et par la modulation de l'activité synaptique en émettant des co-transmetteurs.
- rôle nourricier pour les neurones : transmettre le glucose sanguin aux neurones et le stocker sous forme de glycogène.
- rôle de maintien de l'homéostasie ionique du LCR.

Un cancer du système nerveux central est une masse, de volume variable, au niveau du cerveau ou de la moelle épinière, due à une multiplication anormale de cellules de ce système. Le plus souvent, ces cancers se développent à partir des cellules gliales et portent

le nom de gliome. Ces tumeurs neuroépithéliales regroupent également les épendymomes et les médulloblastomes plus rares et touchant principalement les enfants. Un cancer primitif cérébral se développe à partir des cellules du système nerveux central et se distingue de la métastase (ou tumeur secondaire) formée à partir de cellules cancéreuses qui se sont détachées d'une tumeur située dans une autre partie du corps.

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes de l'adulte (49,6% de l'ensemble des tumeurs primitives) [13]. Le terme de gliomes regroupe de nombreuses pathologies caractérisées par une grande diversité histologique, moléculaire, et clinique. La classification des tumeurs du système nerveux central OMS 2007 [14], [15] distingue les gliomes en fonction de leur morphologie (astrocytomes, oligodendrogliomes, oligoastrocytomes) et de leur grade de malignité (de I à IV) [14].

La classification OMS des gliomes est celle reconnue par la communauté médicale et scientifique internationale. Elle permet d'organiser les patients en catégories homogènes de pathologie permettant la réalisation d'études épidémiologiques et d'essais cliniques. Elle est basée sur l'identification du type cellulaire prédominant et le degré de ressemblance morphologique avec le constituant histologique dont la tumeur est supposée dériver. Chaque type tumoral est ensuite subdivisé en fonction de l'existence de signes histologiques d'agressivités tels que les atypies cytonucléaires ou les mitoses, en grades histologiques de gravité croissante [16]. Cette classification est toujours sujette à débats. En effet, dans certaines situations, la définition d'un type tumoral manque de précision, ce qui laisse le choix à l'observateur. A l'inverse, la prise en compte de nombreux paramètres histopathologiques pour définir chaque type tumoral et son grade génère des problèmes de reproductibilité inter- et intra-observateur [17], [18]. Depuis la version initiale de 1979 de la classification OMS, trois versions ont été éditées (1993, 2000 et 2007) intégrant successivement les données d'immuno-histochimie puis clinico-radiologiques et moléculaires [14], [19].

Dans la classification OMS actuelle, il existe quatre grades histo-pronostiques (de I, bénin à IV, hautement malin). Schématiquement, on peut opposer les gliomes circonscrits toujours bénins (grade I) aux gliomes infiltrants qui peuvent être de bas grade (II) ou malins (grade III ou IV) [19].

Les gliomes circonscrits, dont le type histologique le plus fréquent est l'astrocytome pilocytique, sont de croissance lente et le traitement repose sur l'exérèse chirurgicale totale. Les astrocytomes pilocytiques affectent en particulier l'enfant.

Les gliomes infiltrants sont de type astrocytaire, oligodendrocytaire ou mixte et siègent essentiellement dans les hémisphères cérébraux. Quel que soit leur grade initial, ils évoluent inexorablement vers la malignité [19]. La forme la plus maligne, le glioblastome (grade IV) de type astrocytaire, se caractérise notamment par une densité cellulaire élevée, des atypies cytonucléaires importantes, une prolifération endothéliocapillaire et des zones de nécrose [20].

Les gliomes sont le plus souvent des tumeurs uniques mais il existe également des formes multifocales qui posent le problème du diagnostic différentiel avec des métastases cérébrales. Une gliomatose est une forme particulière infiltrant plus de 3 lobes.

B. Aspects cliniques et diagnostic

Le diagnostic d'un glioblastome suit une logique commune aux cancers primitifs du système nerveux central. Le diagnostic est le plus souvent suspecté devant des signes neurologiques d'aggravation progressive, avec extension des symptômes dite «en tache d'huile» [21]. Les symptômes sont variés, insidieux, non spécifiques. Le mode de révélation peut également être brutal avec, par exemple, une crise d'épilepsie et/ou des signes d'hypertension intracrânienne. L'IRM cérébrale est l'examen de référence qui permet de confirmer le syndrome de masse et d'orienter vers un diagnostic. Le diagnostic

de certitude repose sur l'examen anatomo-pathologique du tissu tumoral, prélevé par biopsie ou lors d'une exérèse chirurgicale [22]. À la différence des autres cancers, les tumeurs cérébrales primitives métastasent exceptionnellement en dehors du système nerveux central. Le pronostic est déterminé par un ensemble de paramètres relatifs à la tumeur (type, grade, anomalies moléculaires) mais également au patient (âge, état cognitif, degré de handicap) [16].

C. Épidémiologie

En France, l'incidence des cancers primitifs du système nerveux central a été estimée à 4500 cas pour l'année 2009 ce qui représente un taux d'incidence d'environ 7/100000, soit environ 2 % des tumeurs malignes de l'adulte [21]. Le nombre de décès estimés de cancers primitifs du SNC en 2009 est de 3000 [21].

Les gliomes représentent 80 % des tumeurs malignes du SNC [23]. 70 à 75 % des gliomes sont de haut grade [21] (cf Figure I-1).

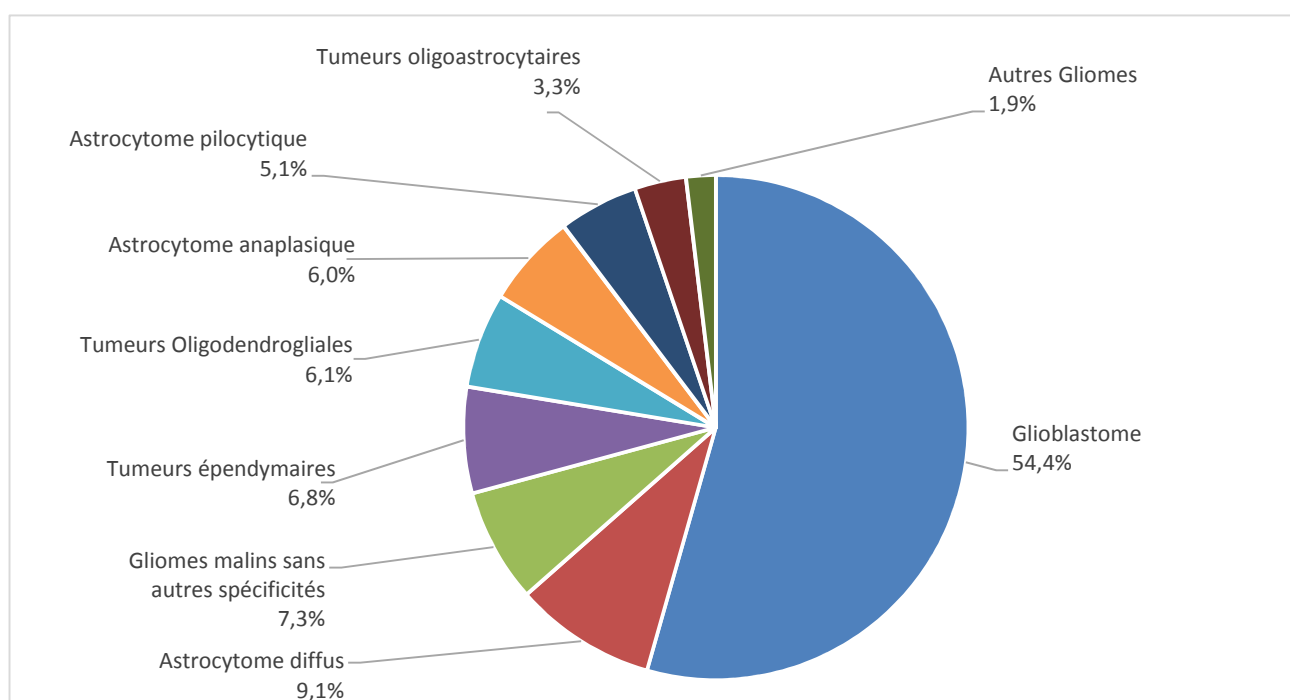


Figure I-1 : Répartition des gliomes par sous types histologiques (N=92504); [23]

Les glioblastomes (grade IV) représentent la grande majorité des gliomes soit environ 54,4 % [23]. Le taux d'incidence des glioblastomes varie entre 2/100 000 en Finlande, 3,19/100 000 aux États-Unis d'Amérique et 4,96/100 000 en Gironde [13], [23], [24]. Très faible chez l'enfant, l'incidence des GBM augmente linéairement jusqu'à 75 ans pour diminuer ensuite. La fréquence des glioblastomes est supérieure pour les hommes.

L'incidence a augmenté ces dernières décennies [21], [24], [25]. Cette augmentation peut s'expliquer, par le vieillissement de la population, et l'amélioration des méthodes de diagnostics ainsi que de leur accès.

Tableau 1 : Fréquences des différents grades de gliomes [21]

Gliomes	Grades	Fréquence
Astrocytome pilocytique	I (bénin)	5 %
Bas grade	II	20 - 25 %
Haut grade	III et IV	70 – 75 %

Le glioblastome est la forme de gliome la plus fréquente mais également la plus grave. En effet, en regard de la difficulté de diagnostic précoce, de sa progression et de la fréquence des récurrences, le GBM est une tumeur intracrânienne très agressive. La médiane de survie évolue de 10 à 17 mois [21] en fonction des facteurs pronostiques qui sont notamment l'âge du patient, l'indice de Karnofsky² et l'opérabilité (exérèse/biopsie). Certains facteurs moléculaires, comme par exemple la méthylation du promoteur du gène de la MGMT, ont un impact pronostique fortement suspecté. Un certain nombre de facteurs de risques de survenue des glioblastomes ont été identifiés. Le Tableau 2 résume les principaux facteurs décrits.

² L'Indice de Karnofsky est un indicateur d'état de santé global qui s'apparente à une échelle synthétique de qualité de vie. L'IK mesure sur une échelle de 0 (décès) à 100 % (autonomie complète) la dépendance fonctionnelle du sujet selon l'aide dont il a besoin pour les gestes de la vie courante (besoins personnels, habillage, etc.) et les soins médicaux qu'il requiert. Les patients pris en charge en HAD ont un IK variant de 10 % (« moribond ») à une autonomie quasi-totale (90-100 %)

Tableau 2 : Principaux facteurs modifiant le risque de survenue d'un glioblastome, extrait de « Epidémiologie des glioblastomes » [24], [25]

Augmentation du risque	Pas d'influence démontrée	Diminution probable du risque
Age	Composés nitrosés	Allergies
Ethnie	Tabac	Maladies auto-immunes
Sexe	Alcool	Consommation d'anti-oxydants
Syndromes de prédisposition	Aspartame	Infections par certains virus
Polymorphisme génétique	Acrylamide	Anti-inflammatoires
Radiothérapie encéphalique	<i>Champs électromagnétiques : GSM</i>	Traitements hormonal substitutif
	<i>Pesticides</i>	Méthylation du promoteur de MGMT

D. Stratégie thérapeutique du glioblastome

1) Stratégie thérapeutique standard

Le traitement de référence du glioblastome est une exérèse chirurgicale large si possible suivie d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie par témozolomide concomitante puis adjuvante selon le protocole de Stupp. [26] (niveau de preuve A). Cependant pour les patients présentant un état général altéré (IK < 70), il n'y a pas de traitement de référence, la stratégie thérapeutique est discutée en RCP [21].

a) Chirurgie

L'exérèse chirurgicale maximaliste améliore le pronostic des patients porteurs d'un glioblastome [22] (niveau de preuve B). Le geste chirurgical et la technique employée doivent limiter le risque fonctionnel car la préservation des fonctions neurologiques est un facteur pronostic aussi important que la qualité de l'exérèse chirurgicale (standard) [22]. On peut noter que l'ablation de la masse tumorale améliore le plus souvent l'état clinique du patient [22]. Une étude randomisée de phase III a montré que la chirurgie guidée par fluorescence permet d'augmenter le taux de résection complète de 36 à 65 % [27]. La qualité de l'exérèse chirurgicale est appréciée par une IRM réalisée dans les 72 heures suivant l'intervention (standard). La résection complète est définie par l'absence de prise de contraste sur l'IRM postopératoire. La persistance d'un résidu est évaluée par une analyse volumique. La qualité de l'exérèse définie par l'IRM postopératoire aurait une valeur pronostique forte [27], [28].

L'exérèse chirurgicale permet d'obtenir une histologie fiable et d'obtenir des prélèvements pour la tumeurthèque [22].

Comme toute chirurgie, et particulièrement puisqu'elle touche le SNC, l'exérèse du gliome comporte des risques importants qui doivent être explicités au patient par le neurochirurgien [21] :

- Mortalité opératoire (1 à 3 %)
- Morbidité postopératoire dans les 30 jours après l'intervention (10 %) : et par ordre décroissant de fréquence : thromboses veineuses profondes, dégradation neurologique (5 à 10 %) ou parfois transitoire, douleurs cicatricielles, céphalées, méningocèle et fuite de LCR, infection du site opératoire, épilepsie, hydrocéphalie, ostéite du volet.

b) Radiothérapie

En complément de la chirurgie, un des piliers actuels du traitement des GBM est la radiothérapie externe (RE) [29]–[31]. La RE nécessite un volume d'irradiation précis. Tous les champs doivent être irradiés le même jour par une dose fractionnée variant de 1,8 à 2 Grays cinq fois par semaine, la dose ne devant pas dépasser un total de 60 Grays [22]. Il est recommandé de limiter le volume de la cible au volume tumoral macroscopique défini par l'imagerie, additionné d'une zone périphérique de sécurité de 20 mm dans les trois dimensions de l'espace. La radiothérapie externe procure une amélioration significative en termes de survie lors du traitement de première intention dans les gliomes de haut grade (niveau de preuve A). Les stratégies utilisées pour augmenter la dose d'irradiation sur la tumeur par brachythérapie, radiochirurgie, et la neutronthérapie par capture de Bore n'ont pas démontré leur utilité à ce jour. Un bénéfice de la radiothérapie externe a été constaté pour les patients âgés de plus de 70 ans [32] avec une survie médiane qui passe de 16,9 à 29,1 semaines (recommandation B) sans

dégradation de qualité de vie. La dose de radiothérapie pour les sujets âgés de plus de 70 ans peut être réduite à 40 Grays en 15 fractions sur trois semaines [33] (accord d'expert).

Les effets indésirables sont les suivants (par ordre décroissant de fréquence) [21]:

- alopecie : systématique en regard des faisceaux d'irradiation, mais pas nécessairement complète. Elle apparaît à partir de la 3ème semaine d'irradiation, une repousse plus ou moins complète est attendue dans les 2 à 4 mois
- fatigue de type lassitude : fréquente, non spécifique de la radiothérapie
- céphalées : syndrome de somnolence ou déficit attentionnel survenant dans les 2 à 3 mois
- otite séreuse
- aggravation transitoire des symptômes, répondant aux corticoïdes
- effets indésirables retardés : troubles cognitifs, leuco-encéphalopathie, radionécrose focale (exceptionnelle), télangiectasies et micro-saignements, insuffisance hypophysaire. La tolérance de la radiothérapie est d'autant meilleure que la tumeur est petite ou que son exérèse a été satisfaisante.

c) Chimiothérapie

Les nitrosurées (carmustine, fotémustine et lomustine) peuvent être proposés dans le traitement adjuvant des gliomes de haut grade (niveau de preuve B). Une méta-analyse [34] a montré que la chimiothérapie néo-adjuvante augmentait la survie à un an de 6 à 10 %. L'étude de phase III de Stupp et al. (2005) [26] a comparé la radiothérapie seule (60 grays sur six semaines) avec radiothérapie et traitement concomitant par temozolomide (Temodal®) suivis de six cures en adjuvant. La médiane de survie avec radiothérapie + Temodal® est de 14,6 versus 12,1 mois [26] avec radiothérapie seule. La survie à deux ans est de 26,5 % dans le groupe radiothérapie associée au Temodal®, contre 10,4 % dans le groupe radiothérapie seule (niveau de preuve A). Il a été également mis en évidence l'impact de l'expression du gène MGMT dans l'effet du Temodal® [30]. L'utilisation d'une

chimiothérapie locale à l'aide d'implant contenant de la carmustine Gliadel® a montré un bénéfice en termes de médiane de survie en passant de 11,6 à 13,9 mois avec les implants [35] (recommandation IB).

Tableau 3 : Tableau des principales chimiothérapies utilisées dans le traitement des gliomes [21]

Voie d'administration	Molécules	Modalités d'administration
Voie orale	Témozolomide	En continu (7 j/7) pendant la radiothérapie ou en discontinu (5 j tous les 28 j)
	Lomustine	En discontinu
Voie intraveineuse	Carmustine	En discontinu
	Fotémustine	En discontinu
Mixte (selon les molécules)	Protocole PCV (procarbazine, lomustine, vincristine)	En discontinu
Implant intracavitaire	Carmustine	Unique, peropératoire

d) Traitements symptomatiques

La prescription, l'adaptation et le suivi des traitements symptomatiques (antiépileptiques, corticoïdes, anticoagulants, antalgiques...) sont essentiels tout au long de la maladie.

1) Corticothérapie :

L'indication des corticoïdes est essentiellement symptomatologique afin de réduire l'œdème péri-tumoral. De fortes doses (2 à 3 mg/kg) peuvent être utilisées en doses d'attaque. Sauf exception, elles ne doivent pas être prolongées. Étant donné le risque d'effets indésirables et d'interactions avec les autres médicaments, les corticoïdes doivent être administrés à la plus faible dose possible et le moins longtemps possible. Une administration en 1 ou 2 prises par jour, à prédominance matinale, est suffisante. L'indication et les modalités de la corticothérapie doivent être régulièrement ré-évaluées en fonction de l'état du patient (hypertension intracrânienne, signes focaux). Son arrêt doit être progressif. La surveillance et le traitement préventif des effets indésirables d'une corticothérapie au long cours doivent être instaurés (ostéoporose, rétention hydrosodée éventuellement). La glycémie et l'équilibre ionique doivent être régulièrement surveillés. [36]

2) Antiépileptiques

Il n'y a pas d'indication établie à traiter systématiquement l'épilepsie de façon préventive. Néanmoins, un traitement antiépileptique est fréquemment mis en place dans la période péri opératoire. En cas de crise épileptique inaugurale, un traitement sera institué et devra être poursuivi. En cas de crise per et postopératoire ou en cas de traitement préventif péri- opératoire, le traitement peut être arrêté dans les 2 à 4 semaines. Une grande part des médicaments antiépileptiques est susceptible d'altérer le métabolisme enzymatique hépatique. Ainsi ils peuvent diminuer l'effet (induction enzymatique) ou augmenter l'effet voire la toxicité (inhibition enzymatique) des autres agents pharmacologiques. En cas d'administration concomitante avec la chimiothérapie ou la corticothérapie, l'utilisation de traitements antiépileptiques inducteurs enzymatiques (carbamazépine, phénytoïne, barbituriques) et d'inhibiteurs enzymatiques (valproate) doit tenir compte des interactions médicamenteuse [36], [37]. Les antiépileptiques de nouvelles générations (gabapentine, lévétiracétam, prégabalin) n'influent pas sur le complexe enzymatique du cytochrome P450. L'arrêt d'un traitement antiépileptique doit être progressif.

3) Antalgiques

La douleur doit être évaluée et prise en charge. La plupart des céphalées, témoignant d'un effet de masse intracrânien, sont contrôlées avec un traitement par corticoïdes seuls. Des antalgiques de niveau I ou II peuvent y être associés. Le recours aux antalgiques de niveau III est plus rarement nécessaire, sauf en cas de dissémination méningée.

4) Traitement anticoagulant

Les thromboses veineuses profondes compliquent souvent l'évolution d'une tumeur cérébrale (le taux de thromboses veineuses profondes symptomatiques est de 20 à 30 % chez les patients atteints d'un gliome)[38]. Il n'y a pas d'indication d'un traitement préventif systématique. L'indication est fonction des facteurs de risque liés au patient

(antécédents, mobilité, etc.). Le traitement anticoagulant sera effectué de préférence avec des héparines de bas poids moléculaire (HBPM) au long cours, plutôt qu'avec des antivitamines K (AVK)[38].

Malgré un traitement lourd reposant sur la chirurgie, la radiothérapie encéphalique et la chimiothérapie cytotoxique, le glioblastome reste une pathologie dont le pronostic est très défavorable.

2) Les nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées

a) Thérapie moléculaire ciblée

Les recherches en biologie ont permis l'identification d'altérations moléculaires et la compréhension de mécanismes d'oncogénèses impliqués dans le glioblastome. La thérapie moléculaire ciblée correspond à un médicament qui permet le blocage d'une voie métabolique impliquée dans le développement tumoral et surexprimée dans une cellule tumorale porteuse de l'anomalie moléculaire ciblée. Ce concept vise à stopper la progression tumorale, jusqu'à détruire la tumeur, mais en limitant l'action toxique sur les cellules saines.

Le Tableau 4 synthétise les données concernant les principales cibles moléculaires testées cliniquement. Parmi les thérapies ciblées, plusieurs études de phase II [39], [40], ainsi que de nombreuses études rétrospectives évaluant le bévacizumab en monothérapie ou en association à une chimiothérapie comportant ou non de l'irinotécan, ont permis de démontrer l'intérêt du bévacizumab dans les glioblastomes (gliomes de grade IV) en récurrence. Un taux de survie à un an de 37 % vs 20 % sans anti-VEGF a notamment été décrit [40].

Tableau 4 : Cibles moléculaires thérapeutiques testées cliniquement dans le traitement du glioblastome [40], [41].

<i>Classes de thérapies moléculaires</i>	<i>Cibles moléculaires inhibées</i>	<i>Molécules (Spécialités)</i>	<i>inhibitrices</i>
<i>Inhibiteurs des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase</i>	Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR)	Gefitinib (Tarceva®) Erlotinib (Iressa®) EGFR anticorps h-R3 (125)I-m anticorps 425I	
	Platelet derived growth factor receptor (PDGFR) et de c-KIT	Imatinib (Glivec®)	
	c-MET	XL184 (Exelixis®)	
<i>Inhibiteurs des voies de signalisation intracellulaires en aval des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase</i>	mTOR	Temsirolimus (Torisel®)	
	PKC	Enzastaurine	
		Ionafarnib (Sarasar®) Tipifarnib (Zarnestra®)	
<i>Autres thérapies moléculaires ciblées</i>	Protéasome	Bortésomib (Velcade®)	
	Intégrines	Cilengitide	
	Histones déacétylases	suberoylanilide hydroxamic acid ou SAHA (Vorinostat®)	
<i>Traitements antiangiogéniques</i>		Thalidomide (Thalidomide Celgene®) Lenalidomine (Revlimide®)	
	Vascular endothelial growth factor (VEGF) et/ou son récepteur (VEGFR)	Bevacizumab (Avastin®) Valatinib AZD2171 (Cediranib®) pazopanib (GW786034)	
	Multicibles tyrosines kinases	Sunitinib (Sutent®) Sorafenib (Nexavar®)	

b) Traitements pharmaceutiques locorégionaux et Convection Enhanced Delivery CED

Une difficulté rencontrée dans le cas du traitement du glioblastome par injection systémique, malgré l'utilisation de thérapie ciblée, est d'atteindre la cible tumorale. En effet pour cela il est nécessaire de franchir un dispositif de protection du système nerveux central, la barrière hémato-encéphalique BHE. L'incapacité de passage au travers de la BHE se traduit par une inefficacité thérapeutique mais également par une action toxique systémique.

Un radionucléide une fois dans l'organisme dépose son énergie (dosimétrie) quel que soit sa position dans les tissus et il n'est pas possible de libérer cette énergie de manière conditionnelle. Ainsi une mauvaise localisation du radionucléide provoque l'irradiation des tissus sains à la place des tissus tumoraux. La dissémination tumorale systémique étant rare dans le cas du glioblastome, l'amélioration du contrôle local de la tumeur est une option thérapeutique pertinente. Le traitement de référence débute par l'exérèse chirurgicale, ce temps opératoire est utilisable également pour injecter, dans la cavité d'exérèse, un médicament agissant localement sur les cellules tumorales infiltrées.

Les traitements locorégionaux se sont révélés très prometteurs, et les essais cliniques se sont multipliés depuis 1999 [35], [42]–[47]. Depuis cette date existe l'implant Gliadel® (carmustine), la première thérapie pharmaceutique locorégionale avec AMM destinée au traitement des GBM. Ce traitement consiste à déposer dans la cavité chirurgicale des implants permettant une libération prolongée de carmustine. La matrice de l'implant est composée d'un copolymère de polyanhydride biodégradable (polifeprosan 20 : polymère de 1,3-bis-(p-carboxyphenoxy)propane et d'acide sébacique, à respectivement 20:80 de ratio molaire) qui se dégrade par hydrolyse et libère progressivement la carmustine. Des méta-analyses de ce traitement chez les patients atteints de GBM ont trouvé un modeste bénéfice en termes de survie (6 % à 10 % à 1 an) [34], [35], [48]. Bien que cette technique

présente certains avantages tels qu'une libération prolongée et contrôlée du principe actif, on constate cependant une faible pénétration tissulaire ainsi qu'une quantité pondérale en principe actif PA limité par la taille de l'implant.

Une méthode développée dans les années 90 (Bobo et Al.)[49], la Convection Enhanced Delivery CED, lorsqu'elle est combinée à une injection intra-tumorale stéréotaxique, constitue une autre option locorégionale intéressante. La CED est une technique de convection fluïdique qui permet d'améliorer la distribution dans le tissu cérébral en établissant un gradient de pression sur une molécule quel que soit sa taille ou sur une particule. Au cours d'une CED, la distribution tissulaire dans le liquide interstitiel est dépendante des phénomènes de diffusion et de convection. La diffusion, selon la loi de Fick, est dépendante du gradient de concentration de l'élément diffusé, et de la nature de l'élément diffusé (coefficient de diffusion dans le milieu considéré) [50]. La convection, quant à elle, dépend du gradient de pression induit par une administration à très faible débit (en $\mu\text{l}/\text{min}$) et continue. La convection permet d'augmenter ou de contrôler le volume de distribution des molécules ou des nano-objets [51] administrés, L'utilisation de la convection a montré, par rapport à la simple diffusion, un contrôle du volume de distribution avec une répartition plus homogène du médicament [52], [53].

La CED permet, en jouant sur les paramètres de débit d'injection et de volume total injecté, de mieux maîtriser la distribution cérébrale du principe actif qu'en injection simple [5]. L'objectif sur le même principe que la radiothérapie externe est de distribuer le PA dans un volume contenant la tumeur avec une marge de sécurité permettant d'atteindre également les cellules tumorales infiltrées autour de la tumeur macroscopique. Pour les études pré-cliniques sur le rat, des volumes, des débits et des durées de CED ont été testés avec différentes solutions (sérum physiologique, albumine humaine, sucre, éthanol, taxol) et des concentrations variables [52]. La faisabilité a été étudiée avec des ^{188}Re -SSS-NCL [9]. L'injection au travers d'une aiguille de 32G avec un

débit de 0,5µl/min durant 2h a par exemple été utilisée pour l'injection stéréotaxique de ^{188}Re -SSS-NCL chez le rat [7], [9].

La maîtrise de l'injection CED requiert la connaissance de l'influence de nombreuses variables. En effet, la distribution après CED est sensible aux objets injectés (la composition, la taille et la charge des molécules ou vecteurs [54]), aux dispositifs et techniques d'injections (le diamètre interne et la forme du biseau de l'aiguille d'injection, le positionnement de l'aiguille,) mais également à des paramètres propres aux patients (la qualité du tissu environnant, pression intra-tissulaire).

Les améliorations dans le domaine de la chirurgie stéréotaxique et de la CED, ont permis l'émergence d'une autre vision de la radiothérapie interne vectorisée (RIV). C'est l'association de la technique d'injection intra-tumorale avec la nanoencapsulation qui permet la vectorisation passive. Dans ce contexte, l'injection CED intra-tumorale de nano-objets radioactifs constitue une voie thérapeutique possible. Une étude clinique a débuté en octobre 2013 portant sur le traitement du glioblastome récidivant par des nanoliposomes chargés en rhénium 186. Cette étude de phase I/II, réalisée par « The Cancer Therapy and Research Center » à San Antonio, Texas, USA, vise à caractériser la dose maximale tolérée, la sécurité et l'efficacité de ce traitement. Cette première étude de RIV du GBM souligne à la fois le caractère novateur de cette stratégie mais également sa faisabilité et renforce la validité du projet de recherche dans lequel s'inscrit le projet d'automatisation de la synthèse des nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188.

Le premier agent injecté par CED en clinique dans le traitement du gliome malin fut la toxine diphtérique conjuguée à la transférine (Tf-CRM107) [55]. Depuis, des essais cliniques ont également été réalisés avec des agents anti-cancéreux tel que le paclitaxel [45] ou des anticorps marqués par iode-131 en radio-immunothérapie [56]. Peu d'études portent sur des agents thérapeutiques intégrés dans des vecteurs. Ceux-ci peuvent présenter un intérêt pour le traitement locorégional puisque d'un côté la CED permet

d'améliorer la distribution et de circonscrire la zone à traiter mais l'intégration dans des nano-objets permettrait de maintenir le PA dans la zone cible, d'éviter sa diffusion à distance en dehors de la zone cible et de limiter la diffusion dans la circulation systémique.

c) Radiothérapie interne vectorisée

Historiquement, le premier radionucléide utilisé pour la radiothérapie interne est l'iode-131 qui suit fidèlement le métabolisme de l'iode froid, s'accumulant dans le tissu thyroïdien, et le détruisant par émission d'un rayon bêta moins d'énergie maximale 606 keV. On parle alors de radiothérapie métabolique. L'iode-131 est utilisé dans traitement des cancers thyroïdiens différenciés et l'hyperthyroïdie.

Actuellement, est préféré le terme de radiothérapie interne vectorisée pour insister sur la nécessité d'un vecteur et éviter la confusion avec certaines techniques de curiethérapie qui laisse des sources en place [57] (grains d'iode 125 utilisés dans le traitement des cancers ophtalmique ou prostatique). Selon l'ASN [58], « *La radiothérapie interne vectorisée vise à administrer un radiopharmaceutique dont les rayonnements ionisants délivrent une dose importante à un organe cible dans un but curatif ou palliatif* ». Le plus souvent l'injection est réalisée par voie intraveineuse mais peut aussi être administrée par voie cavitaire ou par voie intra-artérielle.

L'identification de cibles moléculaires associées à un mécanisme pathologique a conduit à l'élaboration de nouvelles stratégies de radiothérapie interne (RI) dirigée contre ces cibles moléculaires. Cette RIV consiste en l'association de radionucléides avec une molécule permettant d'adresser la radioactivité sur la cible moléculaire. Ces vecteurs porteurs de radionucléides peuvent être des anticorps monoclonaux (radio-immunothérapie), des peptides, ou des vecteurs colloïdaux (nanoparticules....).

II. NANOCAPSULES LIPIDIQUES CHARGÉES EN RHÉNIUM-188

A. Les nanocapsules lipidiques

1) Composition

Il s'agit d'un système nanoparticulaire sous forme de suspension en milieu aqueux de taille 50 nm. Ces nanovecteurs sont constitués d'un cœur lipidique stabilisé par une coque tensioactive (Figure II-1).

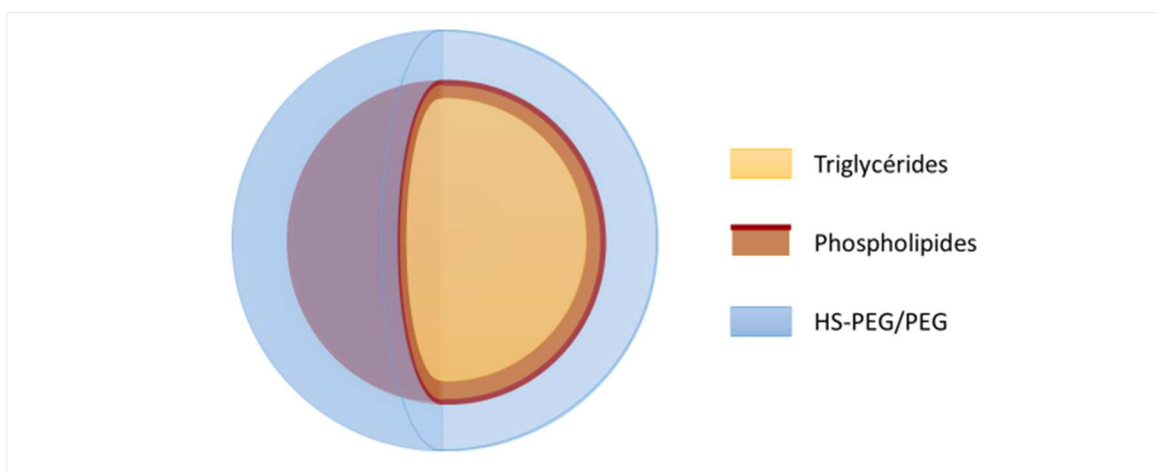


Figure II-1 : Représentation schématique d'une nanocapsule lipidique

Liste des matières premières nécessaires à la formulation :

- o LIPOÏD® mélange de lécithine de soja (69 % Phosphatidylcholine), BASF (Ludwigshafen, Germany)
- o SOLUTOL® HS 15 mélange de polyéthylène glycol (poids moléculaire : 660 Da), et d'hydroxy-stéarate de polyéthylène glycol, BASF (Ludwigshafen, Germany)
- o LABRAFAC® CC mélange de triglycérides d'acide caprique (C10) et caprylique (C8), Gattefosse S.A. (Saint Priest, France)
- o Chlorure de sodium, Prolabo (Fontenay-sous-bois, France)
- o Eau désionisée obtenue par un système Milli-Q Plus, résistivité de 18,3 MΩ.cm à 25°C (Millipore, Paris, France)

2) Formulation

Les nanocapsules de taille 50 nm sont préparées par un procédé d'inversion de phase entre une émulsion huile dans eau (H/E) et une émulsion eau dans huile (E/H) suite à une augmentation et une diminution de la température du milieu réactionnel [59] (Figure II-2 A).

En fonction des proportions de chaque constituant, une zone d'inversion de phase (ZIP) est déterminée par suivi conductimétrique. Une conductivité très faible ($< 10\text{-}20\ \mu\text{S.cm}^{-1}$) caractérise une émulsion E/H, tandis qu'une conductivité forte traduit une émulsion H/E (Figure II-2 B).

La variation de proportion des constituants permet de moduler la taille des NCL. Les proportions utilisées sont issues des données publiées par *Heurtault et Al.* [59], [60]

La stabilisation des NCL consiste en l'ajout d'eau froide (« volume de trempe ») à la température d'inversion de phase, préalablement déterminée lors du suivi conductimétrique. Ainsi, ce refroidissement rapide du système permet l'obtention de NCL sans recours à un solvant organique et sans consommation importante d'énergie.

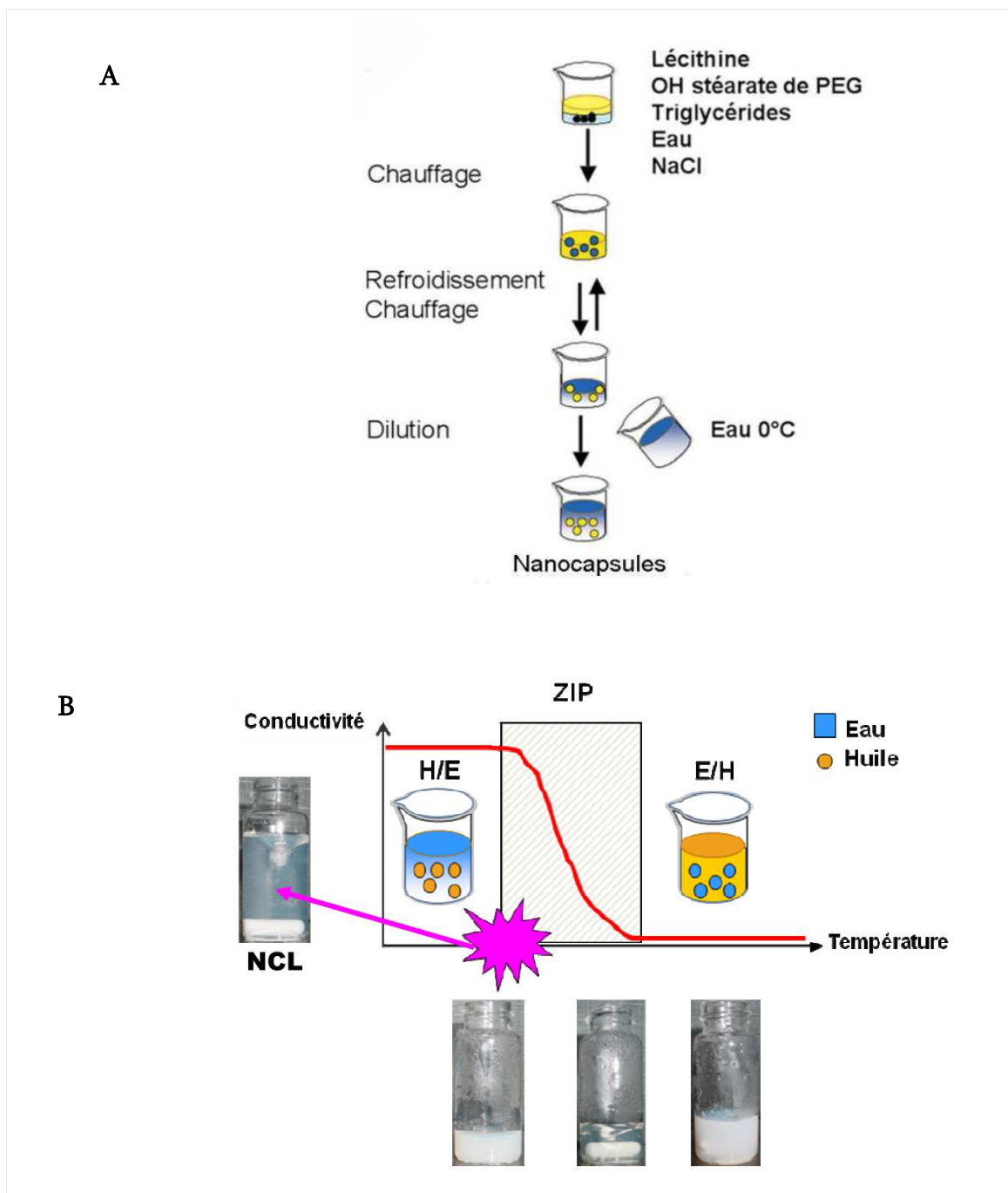


Figure II-2, [108] : A- Représentation schématique des étapes de la formulation des nanocapsules lipidiques
B-Mesure de la conductivité en fonction de la température au cours d'une nano-formulation

3) Caractérisation de la formulation de NCL

a) Aspect visuel

L'effet Tyndall³ donne un aspect bleuté à la suspension de nanoparticules qui peut être constaté en fin de synthèse. La présence de cet aspect bleuté visible à l'œil nu, marque la présence de nano-objets en suspension dans une solution.

b) Taille des particules et dispersion en taille

La distribution en taille des NCL est analysée par diffusion dynamique de la lumière (DLS), également appelée spectroscopie de corrélation photonique (PCS) Malvern Zetasizer® Nano Serie DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK).

Cette technique mesure les fluctuations d'intensité au cours du temps de la lumière diffusée générée par le mouvement aléatoire Brownien des particules ou molécules. La vitesse de ce mouvement Brownien est mesurée par DLS et appelé coefficient de diffusion translationnelle (D) et peut être converti en diamètre hydrodynamique (DH) par les équations de Stokes-Einstein. Le diamètre obtenu par DLS correspond au diamètre hydrodynamique d'une sphère possédant le même coefficient de diffusion que la particule mesurée [61].

Les échantillons mesurés sont dilués au 1/60^{ième}. Les paramètres étudiés sont le z-average qui exprime le diamètre des particules en considérant qu'elles soient de formes sphériques. La valeur cible est de 50 nm [59], et le PDI (Indice de PolyDispersité) qui

³ Tyndall (Effet) : effet de diffusion de la lumière au travers d'une suspension de particules fines (nanométriques). Les courtes longueurs d'ondes (rouge) ont tendance à être réfléchies tandis que les grandes longueurs d'ondes (bleu) sont diffusées, ce qui confère un aspect bleuté à la suspension de nanoparticules.

exprime la distribution en taille des particules. L'objectif est d'obtenir une population particulière monodisperse en taille (c'est-à-dire possédant un $PdI < 0,1$).

4) Données non cliniques

Selon Vonarbourg et Al. 2006 [62], les NCL sont de très faibles activateurs du complément. Bien que les NCL soient constituées de composants activateurs du complément (phosphatidyle choline et lécithine), ceux-ci sont cachés par le PEG. La surface hydrophile (connue pour diminuer l'opsonisation) serait aussi à l'origine de la faible activation du complément par les NCL (contrairement aux nanoparticules en PMMA). La densité des chaînes polymériques à la surface des NCL joue un rôle important dans l'activation du complément.

Cette même publication [62] montre également qu'il y a d'autant plus de phagocytose par les macrophages que la taille des NCL augmente. Cet effet de taille est corrélé avec l'augmentation de PEG à la surface des NCL :

Tableau 5 : Influence de la taille des NCL sur le phénomène de phagocytose par les macrophages

Diamètre de NCL (nm)	Densité surfacique en PEG (mol/mm ²)	Proportion de NCL phagocyté (%)
20	1,14	26 %
50	1,67	38 %
100	2	83 %

Concernant les mécanismes d'entrée dans les cellules, Paillard et Al. 2010 [4] ont démontré que la prise en charge des NCL par les cellules de gliome F98 est un processus actif, rapide (entrée dans la cellule après 2 minutes) et saturable suggérant une endocytose. Quel que soit la taille des NCL testée, le cholestérol endogène semble essentiel à l'internalisation des nanoparticules. Cependant, la voie requise pour les NCL 20 et 50 nm est indépendante des clathrines et cavéoles. De plus, les NCL échappent aux lysosomes et s'accumulent dans le cytoplasme.

B. Le rhénium

1) Caractéristiques physico-chimiques

L'existence du rhénium fut d'abord prédite grâce à la classification périodique de Mendeleïev avant d'être découvert en 1925 par Tacke, Noddack et Berg [63]. Le rhénium est un métal de transition du groupe du manganèse (groupe 7 et Période 6).

En solution aqueuse et saline le rhénium s'oxyde sous forme de perrhénate ReO_4^- (+VII). *In vivo*, la forme perrhénate est stable et éliminée telle quelle par voie rénale [64]. L'association du rhénium à une autre molécule est réalisée par réaction de complexation. La chimie de complexation du rhénium utilise des degrés d'oxydations inférieurs (+V notamment) à celui du perrhénate. La présence d'un réducteur est donc nécessaire pour ces réactions.

Tableau 6 : Quelques caractéristiques comparées du Technetium et du rhénium

	Tc	Re
Numéro atomique	43	75
Configuration électronique	[Kr] 4d5 5s2	[Xe] 4f14 5d5 6s2
Rayon métallique (Å)	1,36	1,37
Énergie de première ionisation (eV)	7,28	7,87
E0 (V) MO4-/M	+ 0,48	+ 0,37
MO2/M	+ 0,28	+ 0,26
MO4-/MO2	+ 0,74	+ 0,55

La chimie du rhénium présente un certain nombre d'analogies avec celle du technétium. Par exemple, du fait de leurs rayons atomiques et ioniques voisins (cf. Tableau 6), il est possible d'effectuer une comparaison directe des structures des complexes du technétium et du rhénium [63], [65]. Les complexes des deux métaux possèdent des propriétés physiques proches (taille, lipophilie, etc...) ainsi qu'une chimie similaire, ce qui a été mis à profit, par exemple dans le cas des complexes hexakis(isonitrile)technétium (I) à partir des analogues rhéniés connus [66]. Dans ce travail les complexes du technétium-99m servent de modèles pour des complexes analogues du rhénium-188.

Cependant, malgré de fortes similitudes, des différences importantes existent, en particulier pour les potentiels redox et les cinétiques d'échange de ligands. Les complexes du rhénium possèdent des potentiels redox plus bas (cf. Tableau 6) et sont moins réactifs. Pour des paires de complexes analogues du rhénium et du technétium, celui du technétium est toujours plus facile à réduire et plus dur à oxyder [64]. Cependant, les différences en potentiels redox dans les paires sont variables. Cette stabilité accrue du perrhénate implique une plus grande quantité de réducteur ainsi que la présence d'un stabilisant (acide ascorbique, acide gentisique...) et des conditions plus drastiques pour la synthèse des radiopharmaceutiques rhéniés [67].

Le rhénium, sous forme non radioactive, a été étudié pour ces propriétés cytotoxiques. Un nombre croissant de publications a révélé le potentiel anti-cancéreux de différents complexes organo-métalliques rhéniés avec une cytotoxicité parfois supérieure à celle du cisplatine [68]. Par ailleurs, le rhénium est décrit comme un des éléments métalliques les moins toxiques, et a été étudié sous forme de complexes séléniés (diseleno-ethers de rhénium(I)) [69], [70] pour une action cytotoxique.

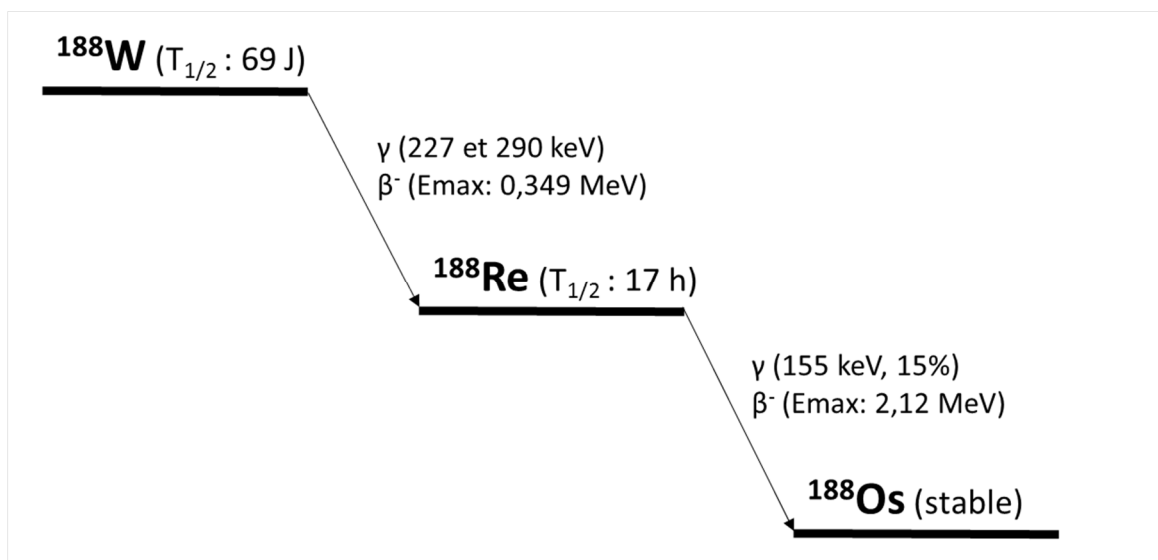


Figure II-3 : Principales émissions caractéristiques du schéma de désintégration du tungstène 188 (^{188}W) vers l'osmium 188 (^{188}Os). schéma inspiré de [76]

Le ^{188}Re se désintègre à 100 % par émission bêta (-) vers l'Osmium-188. Une proportion significative de 71,1 % des transitions atteint directement le niveau fondamental (Figure

II-3). L'énergie de l'émission bêta (-) est alors de 2120,4 keV [71]. Ce rayonnement possède un parcours maximal d'environ 11 mm dans les tissus (parcours moyen de 3,1 mm). Ce rayonnement confère au ^{188}Re des propriétés intéressantes pour des applications thérapeutiques. L'émission gamma principale (15,2 %) de 155,041 keV, proche de celle du $^{99\text{m}}\text{Tc}$, est compatible avec une imagerie TEMP (Tomographie par émission monophotonique), permettant ainsi un suivi *in vivo* de la biodistribution des nano-objets étudiés et une estimation de la dosimétrie. Le temps de demi-vie de 17,005 heures [72] est compatible avec des applications de radiothérapie.

Un autre radio-isotope du rhénium, le ^{186}Re , a été étudié à visée thérapeutique. Les propriétés physiques et le mode de production sont différents. La période physique de décroissance du ^{186}Re est supérieure (90 heures), et l'émission bêta (-) d'énergie maximale 1,08MeV inférieur à celle du ^{188}Re , possède une pénétration tissulaire inférieure (parcours moyen 1mm). L'émission gamma d'énergie principale 135 KeV [73] est également compatible avec l'imagerie TEMP. Une autre différence notable avec le ^{188}Re concerne le mode de production du ^{186}Re par réaction nucléaire au cours d'une irradiation neutronique d'une cible enrichie en rhénium-185 [74], supposant de travailler avec un accélérateur de particules, et implique la présence d'entraîneur (^{185}Re).

2) Production de rhénium-188

Le rhénium-188 est aisément obtenu à partir d'un générateur ($^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$), sous forme de perrhénate de sodium. Le ^{188}W sous forme d'acide tungstique est piégé dans une colonne d'alumine entourée de verre [75]. Ce générateur (cf Figure II-4) est l'analogue thérapeutique du générateur ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$). La demi-vie du tungstène-188 de 69 jours permet un usage prolongé sur plusieurs mois. Ces générateurs sont disponibles sous forme commerciale en qualité GMP stérile (Institut des Radioéléments IRE, Fleurus, Belgium).



Figure II-4 : Générateur de rhénium (source : IRE)

a) Production de tungstène-188

La production de tungstène-188, ^{188}W , nécessite un flux de très haute énergie pour permettre une activité spécifique suffisante du générateur $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$. L'activité spécifique en ^{188}W reste cependant faible (seulement 4-5 Ci/g pour une irradiation durant 24 jours avec un flux $>10^{15}$ neutrons $\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ [76]). En effet la réaction nucléaire (Figure II-5) nécessite une double capture neutronique à partir du ^{186}W , or les sections efficaces des W-186 et W-187 sont faibles (respectivement de 37,9 et 64,0 barn) [76] et il existe un phénomène de compétition par « burn up » du ^{188}W . En raison de cette faible activité spécifique, il est nécessaire d'utiliser une quantité importante d'alumine dans la colonne

du générateur $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ce qui augmente le volume d'élution et réduit l'activité volumique.

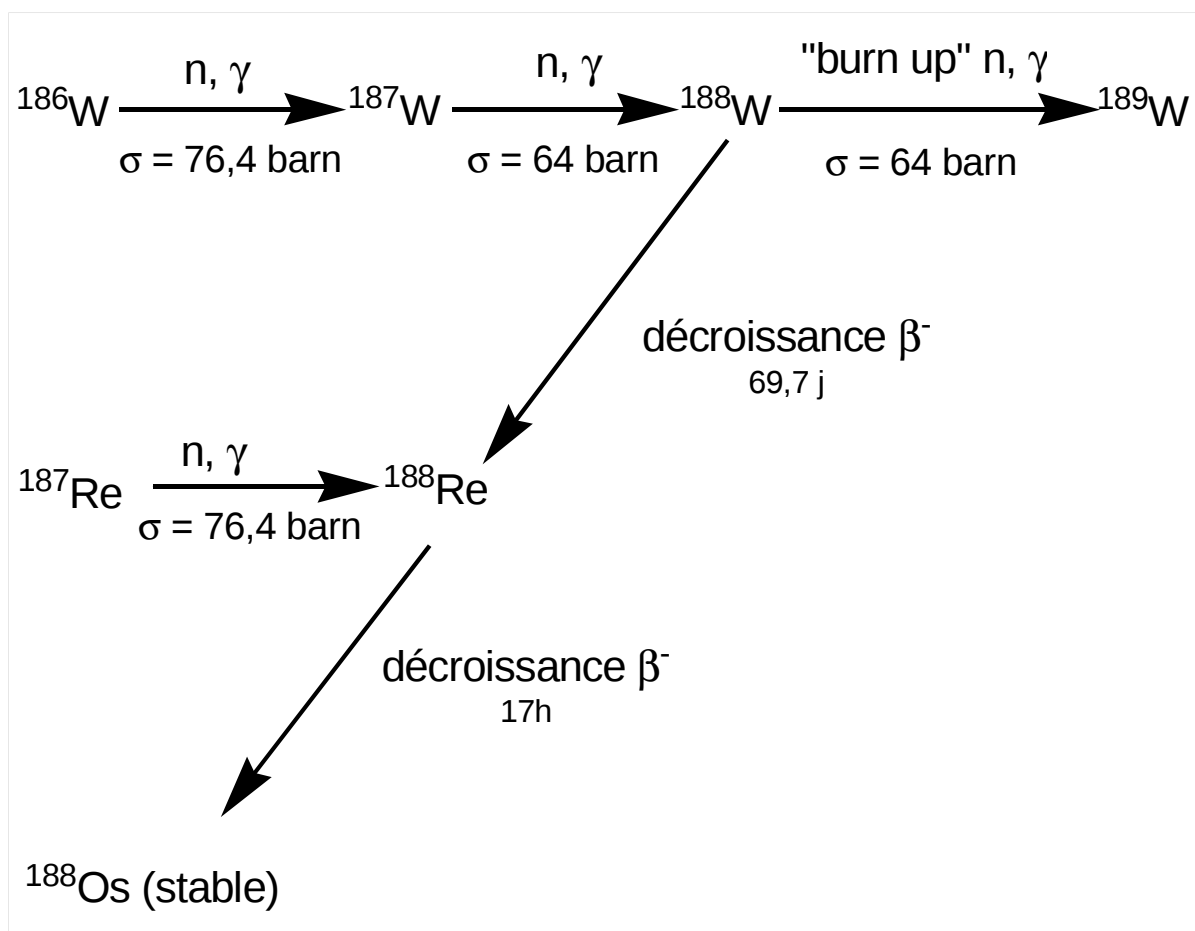
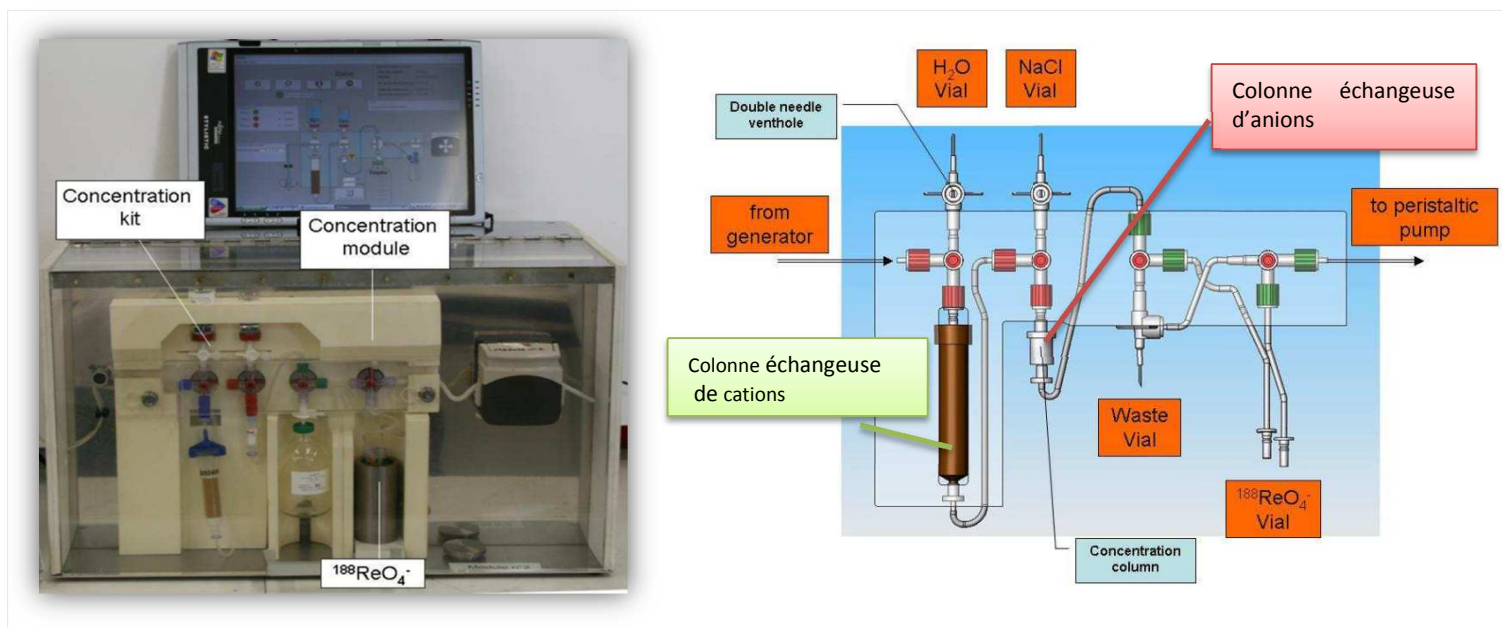


Figure II-5 : Schéma de la réaction nucléaire de production du ^{188}W
(σ : section efficace ; j : jour ; h : heures)

La cible utilisée est enrichie en ^{186}W (>95 %) permettant d'optimiser le rapport Activité produite en ^{188}W / Masse de la cible, et pour minimiser la co-production d'autres espèces chimiques radioactives. Le tungstène peut être utilisé sous forme de métal, ou sous forme d'oxyde mais également sous forme de métaux compressés et frités.

b) Élution / concentration du générateur de rhénium-188

Figure II-6 : Photographie et schéma du kit de concentration de l'élution de ReO_4^- du centre Eugène Marquis, Rennes

Après élution d'un générateur de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, le ^{188}Re est obtenu sous forme de perrhéate de sodium $\text{Na}[^{188}\text{ReO}_4]$ en solution dans du sérum physiologique. Cette élution est suivie d'une concentration du ^{188}Re (Figure II-6). En effet, au terme du procédé d'élution, l'activité volumique de la solution obtenue est trop faible (environ 740 MBq/ml dans un volume de 70ml [77]) pour être utilisée à des fins médicales. L'élution est donc suivie d'un procédé de concentration qui permet d'augmenter la concentration jusqu'à 27750 MBq/ml dans 2 ou 5 ml [77]. Le kit de concentration (Figure II-6) est composé d'une colonne échangeuse de cations suivie d'une colonne échangeuse d'anions. La colonne échangeuse de cations piège les ions Na^+ , ensuite la colonne échangeuse d'anions piège les ions ReO_4^- sous forme AgReO_4 . Enfin, lors de l'élution de NaCl sur la deuxième colonne, il y a précipitation d' AgCl et libération du ReO_4^- par les ions Na^+ , dans un volume réduit.

3) Caractérisation de l'élution de rhénium-188

a) Pureté radionucléidique

- Identification du pic d'émission gamma à 155 keV du ^{188}Re par mesure du spectre gamma au moyen d'un scintillateur puit à NaI et vérification l'absence de pic d'émission du ^{188}W .
- Calcul de la demi-vie de décroissance radioactive par deux mesures du même échantillon séparées par un temps significatif en regard de la demi-vie physique du ^{188}Re de 17 heures.

4) Utilisations cliniques

Un certain nombre d'essais cliniques ont étudié l'intérêt du ^{188}Re combiné à différentes molécules vectrices dans le cadre de radiothérapie interne vectorisée.

Combiné à un bisphosphonate, molécule ayant un tropisme pour le tissu osseux en mimant le pyrophosphate, le ^{188}Re , sous forme ^{188}Re -HEDP (acide 1-hydroxyéthane 1,1-diphosphonique), a été utilisé pour le traitement palliatif des métastases osseuses douloureuses. Le traitement palliatif des douleurs a été efficace pour 60 % à 75 % des patients ayant reçu une activité de 2,6 GBq [78]. Une meilleure efficacité du traitement palliatif a été constatée lors d'une injection répétée à 8 semaines d'intervalle versus une seule injection. Cette efficacité a été constatée au niveau du soulagement de la douleur (92 %, 5,66 mois vs 60 %, 2,55 mois), de la réduction du taux de prostate-specific antigen PSA (39 % vs 7 %), de la durée médiane de survie progression (12,7 mois vs 7 mois) [79]. Une autre étude a montré une amélioration d'environ 15 % de l'indice de Karnofsky et une réduction de 25 % de la douleur sur échelle visuelle analogique [80].

Une autre application médicale étudiée consiste en l'utilisation d'anticorps NCA95 (Anti-CD66) marqués par le ^{188}Re associés à un rayonnement externe comme protocole de

myélo-suppression dans le cadre d'un conditionnement pré-greffe de cellules souches hématopoïétiques pour des patients leucémiques [81]. 39 % de survie globale à 4 ans ont été constatés. Aucun impact n'a été visualisé sur la mortalité non associé à la rechute et sur le taux de rechute.

Des radiopharmaceutiques marqués au rhénium-188 ont également été testés sur des tumeurs hépatiques réfractaires primitives ou métastatiques. Il s'agit d'une technique dérivée de la TAE ou TACE. Le produit est injecté par voie transartérielle dans une branche de l'artère hépatique, permettant ainsi de cibler la zone tumorale. Le ^{188}Re -HDD-Lipiodol® a été le plus étudié avec notamment un essai clinique multicentrique internationale [82]. Cette étude a présenté des résultats encourageants. Le ^{188}Re associé à d'autres complexes, tels que ReN-DEDC [83] ou Re-SSS [84], au sein du Lipiodol® ou le rhénium associé à des microsphères d'albumine [85] ont également été étudiés dans cette indication. L'arrêt de commercialisation du Lipiocis® dans cette indication a freiné les recherches sur cette stratégie utilisant le Lipiodol®. Le Lipiocis® était un radiopharmaceutique marqué par l'iode-131 constitué d'esters éthyliques d'acides gras (acide linoléique C18 ω -6, oléique C18 ω -9, stéarique C18, et palmitique C16 [86]) iodés de l'huile de pavots (=Lipiodol® marqué par iode-131). Son arrêt de commercialisation a été décidé en octobre 2010 par l'ANSM, en raison du risque accru de pneumopathie interstitielle d'évolution fatale.

Le ^{188}Re sous forme perrhénate ou complexé au Technescan MAG3® (Mallinckrodt®), a été utilisé pour réduire le risque de re-sténose par inhibition de l'hyperplasie endovasculaire après angioplastie coronarienne dans le cadre d'une procédure de type Angioplastie Coronaire Transluminale Percutanée PTCA. Les radiopharmaceutiques sont ici utilisés au sein des ballons de dilatation remplis de liquide et délivrent leurs doses sur la paroi des vaisseaux [87], [88].

C. Le complexe ^{188}Re -SSS

Les nanocapsules lipidiques à cœur huileux permettent l'encapsulation de molécules lipophiles, or le perrhénate issu de l'élution du générateur de rhénium-188 est hydrophile. Il est donc nécessaire de transformer ce caractère hydrophile par une réaction de complexation qui permet la formation d'une espèce chimique lipophile contenant le rhénium.

1) Formule / Structure

Il s'agit d'un hétéro complexe bis(trithioperoxybenzoate)(dithiobenzoate) de rhénium (III) dont la structure est représentée en Figure II-7.

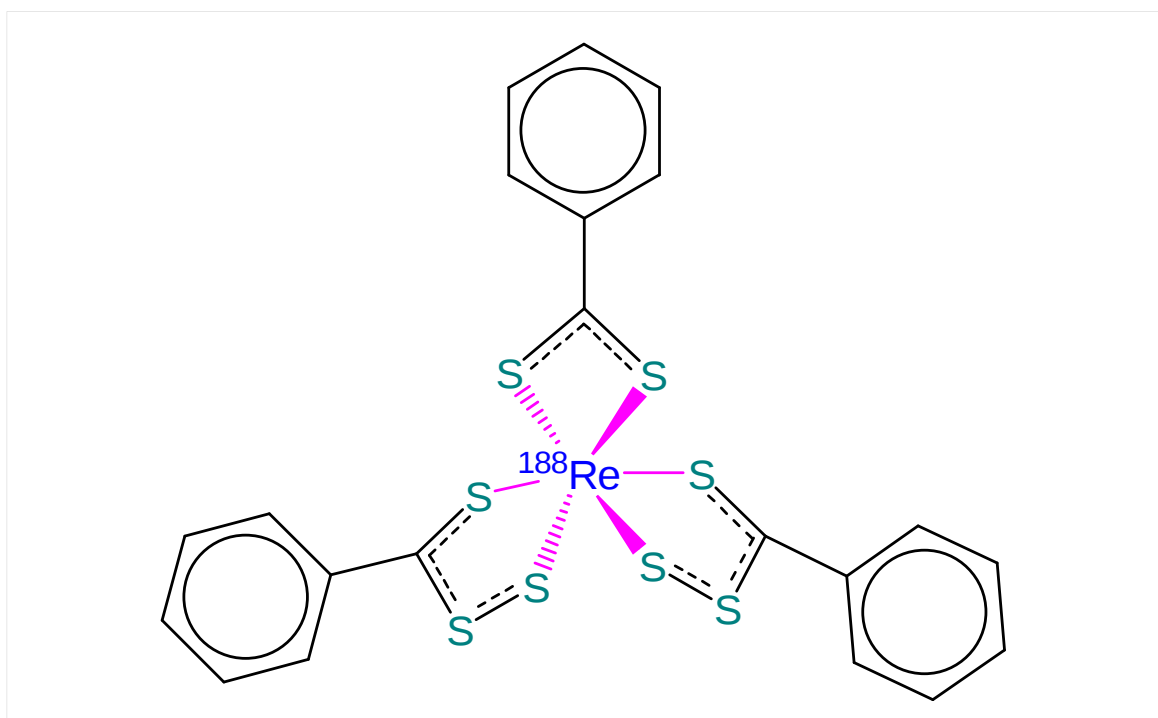


Figure II-7 : Formule topographique du ^{188}Re -SSS
Liaison colorée = liaison dative

Les dénominations simplifiées sont : $\text{Re}(\text{PhCS}_3)_2(\text{PhCS}_2)$, Re-SSS , $^{188}\text{Re-SSS}$. La formule brute est $\text{C}_{21}\text{H}_{15}^{188}\text{ReS}_8$. La masse moléculaire est de 711,82 g/mol. Ce complexe possède un caractère lipophile très marqué : le logP calculé (chemDraw Ultra®) est de 8,404.

Ces complexes sont surnommés SSS, pour « Super-Six Sulphur », car le cœur métallique est lié par coordination à 6 atomes de soufre. Le métal est sous un état d'oxydation (+III) qui est plus stable que l'état (+V) [89], [90]. Ce complexe, avec les ligands dithiobenzoate et trithioperoxybenzoates, peut être formé à la fois avec le rhénium [90] et le technétium [89]

2) Synthèse

Le complexe lipophile de rhénium-188, ^{188}Re -SSS, a été décrit en premier par Mévellec F. et al. en 1999 [90]. Sa synthèse est réalisée selon la méthode décrite par Lepareur N. et al. [91], [92] (Figure II-8).

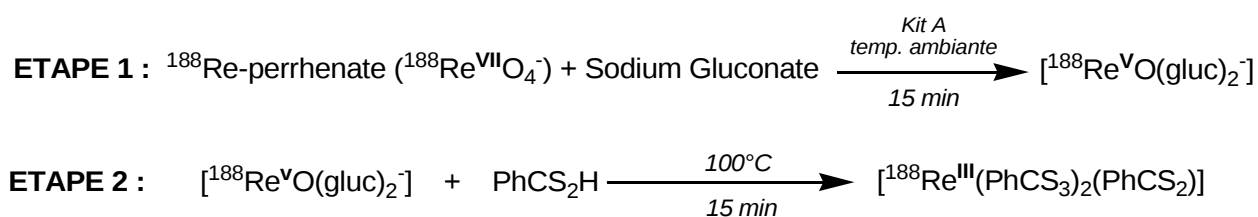


Figure II-8 : Schéma de synthèse du complexe lipophile de rhénium-188, ^{188}Re -SSS

Il s'agit d'une synthèse en deux étapes, avec passage par un intermédiaire de degré V chélaté par un ligand labile, le gluconate. 4 mg de SnCl_2 , 30 mg de gluconate de sodium, 30 mg d'acide ascorbique, 40 mg d'oxalate de potassium sont contenus dans un kit A. Ce kit est reconstitué dans 0,5 ml de sérum physiologique. Le perrhéate (environ 0,5 ml) est ajouté et la solution est agitée 15 min à température ambiante. Puis, le kit B contenant 40 mg de ligand dithiobenzoate de sodium, solubilisé dans 0,5 ml de sérum physiologique, est ajouté. Enfin la solution est chauffée 15 minutes [91] ou 30 minutes [84] à 100°C .

La synthèse du complexe technétié, [89], [93] suit exactement le même schéma (Figure II-8) en remplaçant ^{188}Re et perrhéate par $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et pertechnétate, et avec des conditions de réductions du métal moins drastiques. Ainsi la composition du kit A nécessaire à la

première étape de synthèse est différente de celle du kit A spécifique à la synthèse de complexes rhéniés. Le kit A spécifique à la synthèse de complexes technétiés ne contient que 30 mg de gluconate de sodium et 0,8 mg de chlorure d'étain (ratio molaire divisé par deux, cf Tableau 7) et ne contient ni acide ascorbique, ni oxalate de potassium. Lors de la seconde étape de la synthèse, seulement 20 mg de ligand dithiobenzoate de sodium sont nécessaires à la formation du complexe ^{99m}Tc -SSS.

Les ratios molaires des réactifs rapportés aux atomes radioactifs sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Calcul des ratios molaires de matières premières sur moles d'atomes radioactif
 *(XX/XX) : le chiffre de gauche fait référence aux conditions de synthèse définies avec le ^{99m}Tc , celui de droite avec le ^{188}Re

	^{99m}Tc		^{188}Re	
	740 MBq	5000 MBq	740 MBq	5000 MBq
Nombres atomes	2,306E+13	1,558E+14	6,534E+13	4,415E+14
Quantités (moles)	3,829E-11	2,587E-10	1,085E-10	7,331E-10

				Ratios molaires			
MP	Masse (mg)	MM (g/mol)	Quantité (mol)	MP/ ^{99m}Tc 740 MBq	MP/ ^{99m}Tc 5000 MBq	MP/ ^{188}Re 740 MBq	MP/ ^{188}Re 5000 MBq
DTB de sodium	20/40*	177	1,130E-04/2,260E-04*	2 950 784	436 716	2 082 949	308 279
gluconate de sodium	75/30*	218,1	3,439E-04/1,376E-04*	8 981 457	1 329 339	1 268 203	187 633
oxalate de potassium (monohydrate)	--/40	184,2	2,172E-04	N.A.	N.A.	2 001 490	296 221
acide ascorbique	--/30	176,1	1,704E-04	N.A.	N.A.	1 570 164	232 384
chlorure d'étain	0,8/4*	225,6	3,346E-06/1,773E-05*	87 386	12 934	163 410	24 185

En raison de la précipitation du complexe lipophile en solution aqueuse, le ^{188}Re -SSS est extrait par du dichlorométhane (1 ml). La phase dichlorométhane qui contient le Re-SSS mais également des impuretés hydrophiles peut être rincée à plusieurs reprises par du sérum physiologique (1ml) afin d'extraire les impuretés.

3) Caractérisation du complexe rhénium-SSS

a) Aspect visuel



Les cristaux de Re-SSS et Tc-SSS sont respectivement verts et rouges. Les solutions des complexes Re-SSS et Tc-SSS apparaissent ainsi respectivement vertes et roses.

b) Pureté radiochimique

La pureté radiochimique est contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM) par la radioactivité ayant migrée rapportée à la radioactivité totale. Les CCM sont réalisées sur des plaques d'aluminium greffées par de la silice 60 et une solution d'éther de pétrole/dichlorométhane (6/4, v/v) comme éluant ($R_f = 0,7$) [91]. La mesure de la radioactivité est évaluée par un phospho-imager (Packard, Cyclone storage phosphore system).

D. Synthèse non automatisée de NCL chargées en rhénium

Pour obtenir une suspension d'environ 4,2 ml de ^{188}Re -SSS-NCL, 18,75 mg de Lipoid® S75-3, 211,5 mg de Solutol® HS-15, 257 mg de Labrafac®, 22,25 mg de NaCl et 740,5 mg d'eau milli-Q sont mélangés sous agitation mécanique. Le complexe ^{188}Re -SSS extrait par le dichlorométhane (1 ml) est rincé par 1ml d'eau milli-Q à une ou deux reprises. La phase dichlorométhane est ajoutée aux autres composés de l'émulsion. La phase organique est évaporée en chauffant à 60°C pendant 15 min. Trois cycles de chauffage et refroidissement progressifs entre 85 et 60°C sont par la suite réalisés pour permettre le passage de l'émulsion dans sa zone d'inversion de phase. Ces cycles sont suivis par un choc irréversible, par dilution de l'émulsion avec 3,125 ml d'eau ppi à 0°C permettant de figer les nanocapsules formées. La suspension finale est filtrée sur un filtre 0,22µm avant utilisation.

L'activité spécifique est comprise entre 40 to 1000 MBq/ml à l'heure et date de calibration.

III. STRATÉGIE DE LA RADIOTHERAPIE INTERNE VECTORISÉE PAR NCL CHARGÉES EN RHÉNIUM-188

A. Données précliniques concernant l'utilisation de ^{188}Re -SSS NCL

L'efficacité des NCL chargées en ^{188}Re a été évaluée dans un modèle de gliome chez le rat [7].

Des injections stéréotaxiques de ^{188}Re -SSS-NCL ont été menées dans un modèle de gliome 9L. Deux types d'injection ont été retenus : l'injection par SI (injection simple ; volume final: 10 μL ; débit 1 $\mu\text{L}/\text{min}$; activité injectée: 2,8 MBq), et l'injection par « Convection Enhanced Delivery » (CED ; volume final: 60 μL ; débit 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$; activité injectée: 2,8 MBq). La distribution au sein même du cerveau est plus focalisée sur le point d'injection lors d'une injection SI que lors d'une injection CED, qui elle, permet une plus grande diffusion des NCLs (Figure III-1 e, f, g). Ces données permettent d'observer ainsi l'établissement d'un gradient de dose lors de la combinaison de ces deux types d'injection [7].

L'encapsulation du ^{188}Re dans des nanocapsules permet de maintenir celui-ci autour du site d'injection et de limiter la toxicité systémique du rhénium libre sous forme $^{188}\text{ReO}_4^-$. L'injection stéréotaxique intratumorale (cérébrale) de ^{188}Re -SSS-NCL n'entraîne que peu de dissémination systémique de rhénium-188 (environ 80 % de la dose injectée est retrouvée dans le cerveau 24h après l'injection, Figure III-1 b) et le taux d'élimination rénale et hépatique sont très faibles (4 % de la dose injectée est retrouvée dans les urines et les selles 96h après l'injection comparé à 65 % 96h après injection de $^{188}\text{ReO}_4^-$) (Figure III-1 a). Une élimination urinaire presque exclusive (97 % vs 3 % dans les selles) est

constatée pour le $^{188}\text{ReO}_4^-$ alors qu'elle est mixte urinaire (75 %) et fèces (25 %) pour le $^{188}\text{Re-SSS-NCL}$ (Figure III-1 c, d).

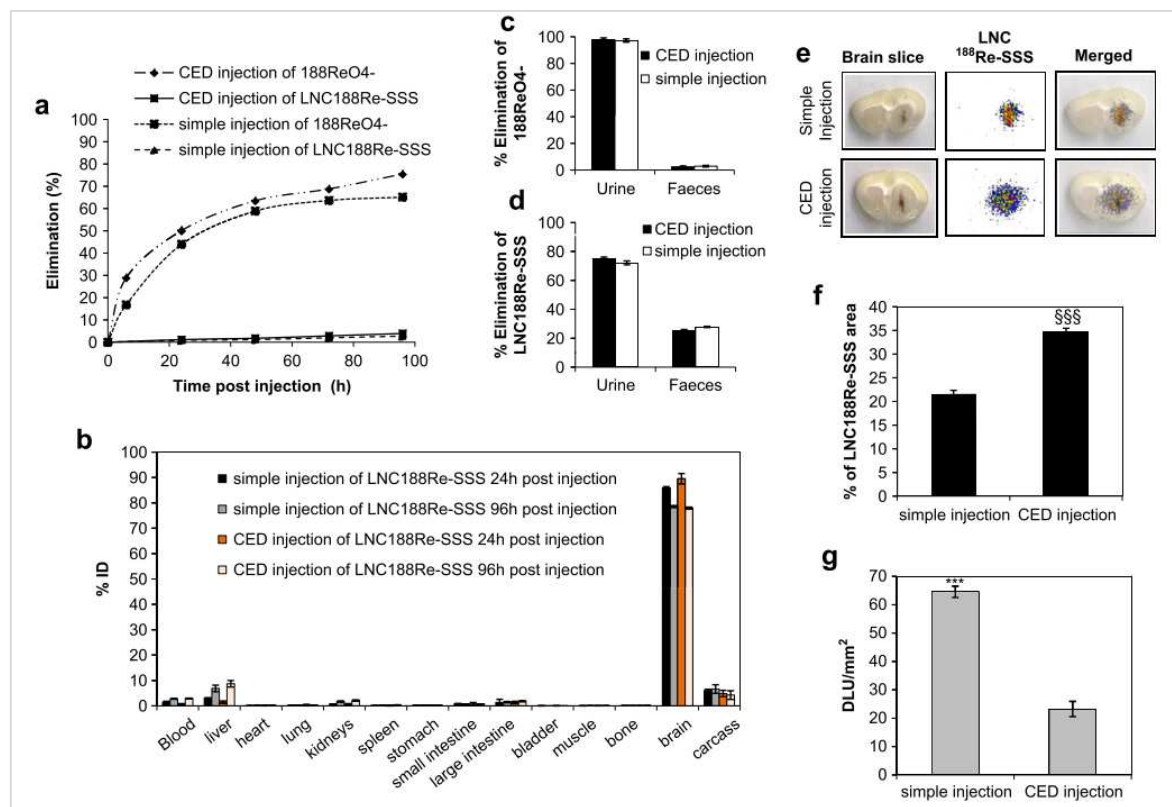


Figure III-1 : Distribution des NCL chargées en rhénium-188 **a**: Mesure par comptage gamma de l'élimination urinaire et fécale du ^{188}Re durant 96 h suivant l'injection SI ou CED de $^{188}\text{ReO}_4^-$ et de $^{188}\text{Re-SSS-NCL}$, dans des rats porteurs de modèle de gliome à cellules 9L, 6 jours après implantation des cellules 9L. Répartition entre urine et selles du $^{188}\text{ReO}_4^-$. (**c**) et $^{188}\text{Re-SSS-NCL}$ (**d**). **b**: Biodistribution par organe de solution de $^{188}\text{ReO}_4^-$ (n = 8) et de $^{188}\text{Re-SSS-NCL}$ (n = 8) 24 and 96 h après injection; les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe, moyenne $\pm$ SD. **e**: Vues autoradiographiques de $^{188}\text{Re-SSS-NCL}$ injecté par SI and CED, 24 h après injection. **f**: Aire de distribution totale des $^{188}\text{Re-SSS-NCL}$ sur coupe de cerveau. **g**: Activité surfacique moyenne (DLU/mm²) de l'aire de distribution en $^{188}\text{Re-SSS-NCL}$ après injection en bolus et par CED. (extrait de C. Vanpouille-box et Al. 2011 [7])

Les $^{188}\text{Re-SSS-NCL}$ utilisées pour la radiothérapie interne fractionnée permettent une réponse remarquable en termes de survie dans un modèle de gliome orthotopique chez le rat (taux de guérison de 83 %). L'efficacité maximale est obtenue par des protocoles combinant injection simple permettant la concentration de la dose au cœur de la tumeur et CED permettant de distribuer la dose dans une zone plus grande.

L'activation du système immunitaire induite par ce traitement a été soulignée par stimulation périphérique des cytokines interleukine-2 et interféron- γ . Ceci s'accompagne également d'un recrutement local de cellules immunitaires effectrices

(CD4+, CD8+) et d'un processus d'immunisation puisque 14/17 animaux sont partiellement ou totalement (3/17) immunisés après ré-injection de cellules 9L.

B. Programme de transfert à la clinique

Les résultats des premières études d'efficacité étant encourageants, cette nanotechnologie fait aujourd'hui l'objet de programmes de recherche multidisciplinaire et multicentrique visant à transférer cette solution thérapeutique vers la clinique. Le passage vers la clinique impose la réalisation de plusieurs étapes obligatoires.

Premièrement, il est impératif d'être capable de produire des nanocapsules chargées en rhénium-188 selon les référentiels européens GMP (Good Manufacturing Practice) ainsi que de maîtriser l'exposition des opérateurs à ces sources radioactives selon les recommandations de l'ASN (Autorité de Sûreté Nucléaire). L'utilisation d'un automate de production permet une production conforme à un usage humain et reproductible, et de réduire l'irradiation des opérateurs.

Deuxièmement, il est nécessaire avant d'utiliser ce produit chez l'homme de compléter les données d'efficacité et de toxicité pré-clinique, et d'optimiser la technique d'injection stéréotaxique.

Troisièmement, avant de réaliser l'essai clinique, il est indispensable de soumettre le projet à autorisation par l'autorité nationale compétente : l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). L'autorisation d'essai clinique (AEC) délivrée par l'ANSM suppose de décrire l'essai clinique (DEC) ainsi que le dossier technique (DT), contenant l'ensemble des informations disponibles sur le radiopharmaceutique expérimental. Ce DT contient le dossier de médicament expérimental (DME) qui est composé de trois parties dont le DME1 qui décrit les données relatives à la qualité pharmaceutique, chimique et biologique du médicament, le DME2

qui traite des données non-cliniques et du DME3 reprenant l'ensemble des données cliniques accessibles concernant le médicament expérimental.

Aussi, afin de compléter les données nécessaires à la constitution de ce dossier, deux programmes de recherche s'articulant l'un avec l'autre, et portant sur l'utilisation des ^{188}Re -SSS-NCL pour le traitement des GBM ont été soutenus :

- Le programme Cancéropôle Grand Ouest « IRAD »
- Le programme l'ANR (agence nationale de la recherche EMERGENCE 2012) « RADIOHEAD »

Ces deux programmes impliquant différents établissements et spécialités de professionnels sont portés et coordonnés par le Dr François Hindré (Inserm UMR_S 1066 « Micro et Nanomédecines biomimétiques » MINT).

1) Programme « IRAD »

Cette étude pré-clinique chez le chien atteint spontanément de gliome a pour objectif de fournir des preuves que la radiothérapie interne vectorisée au travers des nanocapsules lipidiques chargées avec du rhénium-188 (^{188}Re -SSS-NCL) est réalisable pour le traitement des GBM. Il s'agit ici de compléter les données d'efficacité et de toxicité pré-clinique, ainsi que de perfectionner la technique d'injection stéréotaxique. Cette étude permet notamment de compléter la partie II du Dossier du Médicament Expérimental (DME) concernant les données non cliniques.

2) Programme « RADIOHEAD »

L'objectif principal de ce projet est d'établir la preuve de concept au niveau clinique des nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188 (^{188}Re -SSS-NCL) dans le traitement des glioblastomes. Ainsi, le programme proposé doit démontrer la faisabilité du transfert vers

la clinique de cette technologie innovante que sont les nanomédecines représentées ici par les nanocapsules lipidiques. Les résultats attendus dans cette première phase d'étude doivent conduire à la mise en place d'un essai clinique de phase I/II utilisant ces systèmes particuliers. Le programme scientifique est donc décliné en trois phases que sont :

- l'automatisation du procédé de formulation à haute activité des nanocapsules de rhénium-188.
- l'étude préclinique regroupant une étude dosimétrique et une étude de toxicité réalisée en sous-traitance auprès d'une structure agréée (CERB Baugy).
- la réalisation de l'essai clinique après acceptation par l'ANSM du dossier de médicament expérimental utilisant les nanocapsules de rhénium-188 dans le traitement du glioblastome.

a) Automatisation du procédé de formulation des nanocapsules de rhénium-188

L'objectif de cette étape est de permettre la réalisation de ce nano-radiopharmaceutique (NCL chargées avec du ^{188}Re) à l'aide d'un module de synthèse automatisée (SynChrom® R&D RAYTEST®). Il s'agit d'un automate à transfert de flacon par pression. Cet automate est piloté à l'aide d'un ordinateur par un logiciel spécifique (GINA® SynChrom®).

Au sein de l'équipe UMR_S 1066, cette technique permet de conserver tous les paramètres de formulation dans un environnement sécuritaire et confiné (une enceinte blindée à flux laminaire, LEMER PAX® CEB4R HE PB50®). Le choix d'un module de synthèse polyvalent permet le contrôle de nombreux paramètres de formulation. Cette approche permet alors l'optimisation de la formulation par variation notamment de la température, du temps de réaction, de la nature des matières premières, dont le solvant

de solubilisation du complexe de ^{188}Re -SSS, et des quantités de matières premières. Cet outil permet d'obtenir des nano-radiopharmaceutiques avec des caractéristiques contrôlées et reproductibles.

Le dernier objectif est de transposer ce procédé en conditions GMP stérile, apyrogène au sein de l'unité de radiopharmacie et de réaliser la production d'au moins trois lots de ^{188}Re -SSS-NCL aux caractéristiques reproductibles et conformes aux spécifications.

b) Études précliniques : évaluation dosimétrique et toxicité

Des études de biodistribution chez le rat après injection CED intracérébrale de ^{188}Re -SSS-NCL devront être réalisées. De ces études, une estimation dosimétrique par organe sera menée selon les méthodes de formalisme du Medical Internal Radiation Dose (MIRD) et de Monte Carlo.

En raison des exigences réglementaires, les études de toxicités doivent être réalisées selon les recommandations de Bonne Pratique de Laboratoire (BPL). C'est pourquoi un sous-traitant spécialisé dans les études de toxicité et certifié BPL mènera les études.

Ces études constituent une étape préliminaire et obligatoire en vue de l'obtention d'une autorisation d'essai clinique.

c) Demande d'autorisation et réalisation de l'essai clinique de phase I/II

A partir des données disponibles sur la formulation, la caractérisation, les études mécanistiques et pré-cliniques impliquant les ^{188}Re -SSS-NCL, le Centre de Recherche Clinique du CHU d'Angers dirigera la rédaction du formulaire de demande d'essai clinique, le dossier administratif, le dossier sur l'essai clinique, la brochure pour

l'investigateur, et le dossier technique relatif aux produits utilisés. Tous les documents seront soumis à l'ANSM et au comité d'éthique local.

Après autorisation par l'ANSM et le comité d'éthique, l'essai clinique pourra débuter. Il s'agira d'un essai monocentrique (Service de Neurochirurgie du CHU d'Angers) de phase I/II avec escalade de dose. Après pose chirurgicale du dispositif d'injection intra-tumorale en Neurochirurgie, les ^{188}Re -SSS-NCL seront administrées par CED (administration lente sur plusieurs heures) dans un environnement radioprotégé. Dix à vingt patients seront inclus. Ces patients seront atteints de glioblastome multiforme récidivant ou progressant malgré l'utilisation d'un traitement de référence. Une cohorte de patients sera traitée de manière séquentielle avec des doses croissantes de ^{188}Re -SSS-NCL pour évaluer la toxicité. Les études de pharmacocinétique et de dosimétrie seront également conduites sur un faible nombre de patients. Au cours de cet essai, les ^{188}Re -SSS-NCL seront produites au sein de la salle dédiée à la recherche clinique de la radiopharmacie.

Ces deux programmes s'intègrent dans le projet « Laboratoire d'excellence » Labex IRON (Innovative Radiopharmaceuticals in Oncology and Neurology, cf Tableau 8) auquel participe le laboratoire Inserm UMR_S 1066 MINT du Professeur Jean-Pierre Benoit. Le projet Labex IRON vise à créer un centre de recherche international en médecine translationnelle avec l'objectif de transférer en clinique des nouveaux médicaments utilisés pour la médecine personnalisée dans trois domaines: imagerie fonctionnelle des maladies neuro-dégénératives, imagerie phénotypique en neurologie et oncologie, et nanomédecine et radiothérapie vectorisée.

Tableau 8 : Unités de recherche affiliées au LABEX IRON

Laboratoire(s)	Numéro(s) d'unité	Tutelle(s)
CRCNA –Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers, équipe Recherche en Oncologie Nucléaire	U892	Inserm, Université Nantes
ARRONAX	Groupement d'Intérêt Public ARRONAX	Ministère de la Recherche, CNRS, Inserm, Univ Nantes, École des Mines de Nantes, CHU de Nantes, ICO René Gauducheau, Conseil Régional de Pays de la Loire
LEMNA – Laboratoire d'économie et de management de Nantes atlantique	EA 4272	École des mines de Nantes – Université Nantes
BPMSS – Biostatistiques, Pharmacoépidémiologie et Mesures Subjectives en Santé	EA 4275	Université Nantes
Subatech – Laboratoire de Physique subatomique et des techniques associées	UMR 6457	École des mines de Nantes – CNRS - Université Nantes
MiNt – Micro et Nanomédecine Biomimétiques	UMR_S 1066	Inserm, Université Angers
Cyceron	UMR 6232	CNRS, Université Caen Basse Normandie, CEA
ICOA _ Institut de Chimie Organique et Analytique	UMR 6005	CNRS, Université Orléans
P3R – Pôle de Recherche en Radiochimie et Radiopharmacie		Université de Rennes, Ecole Nationale Supérieure de chimie Rennes, centre Eugène Marquis
IPHC – Institut Pluridisciplinaire hubert Curien	UMR 7178	CNRS
MiND – Imagerie Cérébrale et Handicaps	U825	Inserm, Université Toulouse
CERRP – Centre d'Étude et de Recherche sur les RadioPharmaceutiques	U930	Inserm, Université Tours

C. Problématiques liées à la production automatisée de lots cliniques expérimentaux de NCL radioactives

1) Contextes juridiques, et référentiels

a) Autorisation d'une production de radiopharmaceutique expérimental

Le médicament radiopharmaceutique expérimental répond à une double définition juridique. Celle du médicament radiopharmaceutique selon l'article L. 5121-1 (7°) du CSP : « *tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radionucléides, incorporés à des fins médicales* »

, et celle du médicament expérimental selon l'article L. 5121-1-1 du CSP : « *tout principe actif sous forme pharmaceutique ou placebo expérimenté ou utilisé comme référence dans une recherche biomédicale* »

Une recherche biomédicale utilisant un médicament radiopharmaceutique expérimental étant soumise à la fois aux dispositions relatives aux recherches biomédicales et à celles relatives à l'utilisation des rayonnements ionisants à des fins de recherches biomédicales, sa mise en œuvre nécessite au préalable l'obtention de diverses autorisations et avis. Plusieurs instances doivent alors être sollicitées (ANSM, CPP, assureur, ARS, ASN et IRSN) par les différents acteurs et structures impliqués dans la recherche que sont le promoteur, la PUI (pharmacie à usage intérieur) et le responsable de l'activité nucléaire [94].

b) Production d'un radiopharmaceutique expérimental

En France, les Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière (BPPH [95]) datant de juin 2001 et de manière plus explicite et récente, les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP [96]) datant de novembre 2007, sont deux références opposables qui contiennent des chapitres traitant spécifiquement de la production hospitalière de radiopharmaceutiques ou de médicaments expérimentaux.

A propos du contexte dans lequel s'inscrit ce travail, les BPP permettent de préciser les notions suivantes :

- Les généralités (Partie I, chap. 1 à 5) concernant les préparations, le contrôle, la gestion du système qualité et la gestion des anomalies, retours, réclamations et rappels de lots, et les conditions de sous-traitance
- Les lignes directrices spécifiques aux :
 - préparations de médicaments stériles (Partie II, chap. 6),
 - préparations rendues nécessaires par les recherches biomédicales, y compris préparations de médicaments expérimentaux (Partie III, chap. 8),
 - préparations de médicaments radiopharmaceutiques (Partie III, chap. 9).

En Europe le PICS/010 [97] (octobre 2008) apporte également quelques conseils complémentaires dans le domaine de la production hospitalière.

L'EANM propose deux guides qui traitent spécifiquement de production à petite échelle de radiopharmaceutiques (cGRPP [98]) et de la réglementation concernant des essais cliniques portant sur des radiopharmaceutiques [99].

2) Automatisation

Les automates de radiosynthèses ont été développés pour permettre la synthèse radiochimique avec deux objectifs principaux : protéger l'opérateur d'une exposition radioactive excessive et réduire les temps de production, en particulier pour les

radionucléides émetteurs de positons qui possèdent les durées de vie les plus courtes (^{15}O , ^{13}N , ^{11}C , ^{68}Ga , ^{18}F , dont les demi-vies respectives sont environ de 2, 10, 20, 68, et 110 minutes). En effet, il est couramment convenu que le temps entre la production d'un radionucléide et la libération d'un radiopharmaceutique ne doit pas dépasser 3 demi-vie (il reste alors $1/2^3 = 12,5\%$ de l'activité radioactive produite). Ces modules de synthèse doivent également permettre de maîtriser au mieux les paramètres de production afin de répondre aux exigences GMP stériles en vue d'une production clinique.

Le ^{188}Re ne pose pas de difficultés en ce qui concerne la durée de la production puisque sa demi-vie est d'environ 17 heures, ce qui laisse en principe jusqu'à 51 heures jusqu'à la libération pharmaceutique du radiopharmaceutique. De même, le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ qui possède une période physique de 6 heures autorise une attente de maximum 18 heures jusqu'à la libération.

Des mesures de radioprotection sont nécessaires en raison du rayonnement bêta de 2,1 MeV émis par le ^{188}Re . Ainsi les objectifs de la production automatisée de rhénium-SSS sont de réduire l'irradiation des opérateurs et permettre une production conforme aux exigences requises pour le transfert à la clinique de cette technologie. Pour des raisons de radioprotection les dimensions de l'automate de production doivent permettre son intégration dans une enceinte blindée. Cette enceinte permet de garantir une protection de l'irradiation à l'aide de son blindage, et de la contamination par projection (barrière physique) et par dégazage (dépressurisation de l'enceinte vis-à-vis de l'environnement extérieur).

La réalisation des 2 grandes étapes du procédé de production doit être transposable sur l'automate. Dans cet objectif la présence de deux réacteurs, un pour chaque grande phase est nécessaire. Dans un premier temps, la phase de synthèse du complexe, nécessite l'ajout dans un réacteur du kit réducteur, du perrhénate, du ligand dithiobenzoate, et du solvant de solubilisation du complexe. Ce réacteur doit permettre un chauffage jusqu'à au moins

100°C. Dans un second temps, un autre réacteur doit permettre la formulation par inversions de phases. Les inversions de phases sont réalisées par des étapes successives de chauffage-refroidissement. Un minimum de 3 cycles d'inversion de phases est requis. Un autre point important concerne le procédé d'ajout des matières premières nécessaires à la formulation. Parmi les matières premières utilisées, le solutol® est une pâte/solution visqueuse à température ambiante, le Labrafac® un liquide légèrement visqueux, et le NaCl, et le Lipoid® des poudres. Ces produits ne peuvent être utilisés tels quels dans un automate de production. En effet, les poudres doivent être dissoutes et les liquides visqueux risquent d'obturer le circuit (tubulures, électrovalves...). La solution choisie est de peser toutes les matières premières directement dans le réacteur dévoué à la nanoformulation, ce qui permet de s'affranchir des difficultés techniques associées à l'utilisation des matières premières aux propriétés physiques inadaptées à l'utilisation sur un automate. La contrepartie de ce choix est la difficulté à maintenir un état stérile de l'automate et de la production. Pour chaque production, une solution pourrait être l'utilisation d'un réacteur de formulation stérile contenant des matières premières stériles connecté stérilement à l'automate.

Entre les étapes de synthèse du complexe Me-SSS et de nano-encapsulation, l'extraction du complexe suivie de sa purification doivent également être transposées sur l'automate. La séparation de phase après décantation du dichlorométhane ayant extrait le complexe (cf. II. D.) a été utilisée jusqu'à présent lors de synthèse non automatisée. Cette méthode d'extraction/purification n'est pas utilisable sur l'automate Synchrom® R&D. Une solution alternative d'extraction en phase solide a été étudiée à l'aide de colonne Sep-Pak® C8.

3) Automate de production

On peut classer les différents types d'automate selon leur capacité à empêcher les contacts du circuit de production avec le milieu extérieur.

Les automates à circuit « ouvert » sont dédiés à la recherche et au développement. Ces automates permettent une grande variété de réactions et de conditions opératoires et sont par conséquent adaptables aux besoins de production. Cependant ce type d'automate nécessite pour la production de lots cliniques une assurance qualité renforcée garantissant l'absence de contamination : procédure de nettoyage, vérification de l'efficacité de la procédure, renouvellement du matériel d'usure (tubulures, valves, joints).

Les automates à circuits « clos » utilisent des troussees stériles à usage unique (cassettes et réactifs). Ces appareils permettent d'éviter les risques de contaminations (chimique ou microbiologique). Cet équipement facilite donc les procédures permettant de répondre aux exigences de la production clinique. Les premiers automates à systèmes clos étaient dédiés à la synthèse d'un seul radiopharmaceutique tels que le ^{18}F -FDG. On peut citer par exemple le module de radiochimie dédié à la synthèse ^{18}F -FDG, Tracerlab® du laboratoire GE Healthcare®.

Afin d'automatiser la production de ^{188}Re -SSS-NCL, nous disposons d'un automate type recherche et développement à circuit ouvert utilisant le principe de transfert de flacon par différence de pression conçu pour la substitution nucléophile en TEP, le SynChrom® R&D (Raytest®, Straubenhardt, Allemagne) (Figure III-2).



Figure III-2 : Module de synthèse automatisée SynChrom R&D® RAYTEST®

Cet automate est intéressant puisqu'il dispose de 2 réacteurs, permettant de séparer la synthèse de la formulation. La température dans les réacteurs peut être contrôlée et être modulée rapidement permettant les conditions nécessaires à la réalisation des étapes d'inversions de phase de la nano formulation. Les réacteurs transparents permettent d'apprécier visuellement ces inversions de phase.

Cet automate est piloté à l'aide d'un ordinateur par un logiciel spécifique (GINA® SynChrom®).

L'automate est relié à une arrivée d'hélium et une pompe à vide pour les transferts par pression ou dépression et une arrivée d'air comprimé pour le déplacement de piston actionnant les tubulures de prélèvement dans le réacteur et le chauffage/refroidissement des réacteurs.

Une agitation magnétique (vitesse non paramétrable) ainsi que la capacité de variation rapide de température en chauffage et refroidissement sont possibles dans chaque

réacteur ce qui est nécessaire pour la formulation des nanocapsules. La transparence des réacteurs permet de suivre le bon déroulement des différentes étapes.

La synthèse se décompose en 2 grandes phases : la synthèse du complexe lipophile de Re-SSS, puis la formulation des nanocapsules chargées en Re-SSS.

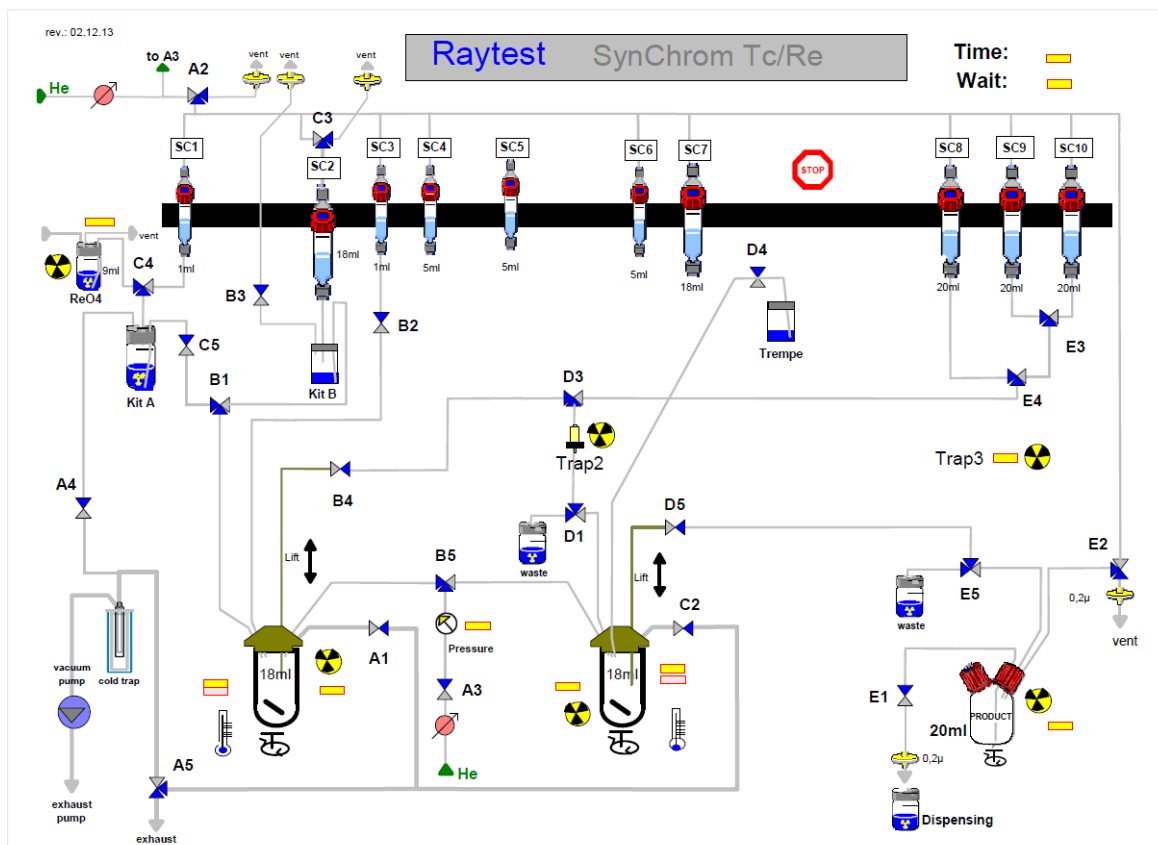


Figure III-3 : Copie d'écran de la fenêtre de contrôle paramétrée des instruments (logiciel GINA® SynChrom®)

La configuration suivante, utilisant les deux réacteurs de l'automate, a été choisie (Figure III-3) :

- Le réacteur 1 pour la synthèse du Re-SSS
 - o 3 entrées connectées au :
 1. Kit réducteur puis à l'élution de ReO_4^-
 2. Ligand : dithiobenzoate de sodium
 3. Dichlorométhane

- o 2 connectiques permettant une montée en pression (arrivée Hélium) ou une dépression (connexion à une pompe à vide)
- Un dispositif de transfert entre les deux réacteurs passant au travers d'une colonne Sep-Pak® connectée également à :
 - o 2 verreries différentes contenant des solvants de rinçage
 - o 1 verrerie contenant un solvant d'élution
 - o 1 flacon déchets
- Le réacteur 2 dédié à la formulation des nanocapsules avec le Re-SSS
 - o 2 connections d'entrées :
 1. dichlorométhane contenant Re-SSS
 2. Eau milli-Q ou EPPI pour le volume de trempe
 - o 2 connectiques permettant une montée en pression (arrivée Hélium) ou une dépression (connexion à une pompe à vide)
 - o 1 connectique de sortie reliée à un flacon de dispensation

Après le développement de la production automatisée il sera nécessaire, compte tenu du type d'automate utilisé, de mettre en place des étapes pour s'assurer des conditions GMP stériles de la production, conformément aux cGRPP, ou aux BPP. L'hygiène, à savoir la stérilité et de l'apyrogénicité, de chaque production doit être assurée. Parmi la somme de précautions complémentaires, on peut citer les points clefs suivants :

- Validation du procédé de production
 - o Qualification d'installation, opérationnelle, et de performance du module de synthèse, de l'environnement de travail,
 - o Test de remplissage aseptique
 - o Recherche d'endotoxines
- Mesures de routines
 - o Contrôle du circuit de production
 1. Test d'étanchéité (avant production)
 2. Test de l'intégrité des filtres et colonnes (après production)

o Mesures préventives

1. Environnement de manipulation de classe A (BPP)
2. Matières premières et consommables stériles, apyrogènes
3. Connexion aseptique à l'automate
4. pré-lavage, lavage et séchage du circuit de production

o Mesures curatives

1. Filtration terminale stérilisante

o Validation de la production

1. Recherche de croissance bactérienne sur un échantillon de production
2. Recherche d'endotoxines

IV. DÉVELOPPEMENT D'UNE SYNTHÈSE AUTOMATISÉE DE NCL CHARGÉES EN RHÉNIUM

Introduction

Dans un premier temps, l'automatisation de la formulation des nanocapsules « blanches », sans inclusion de radioactivité, a été évaluée et optimisée. Dans un deuxième temps, des productions non automatisées de ^{188}Re -SSS-NCL ont été réalisées et caractérisées. Dans un troisième temps, l'automatisation de la production de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS-NCL a été étudiée.

Pour chaque étude sur l'automate, une première étape de programmation a été nécessaire pour la transposition des étapes de production. Un programme a été défini puis optimisé pour la formulation de NCL blanches, pour la production de $^{188}\text{Re}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS-NCL. La production de NCL radioactives faisant intervenir de nombreuses étapes, un programme partiel a été développé pour permettre l'étude spécifique de certaines étapes comme l'extraction/purification.

Pour des raisons de radioprotection, de logistique, et de disponibilité en rhénium-188, le développement de la synthèse de NCL chargées en complexe Me-SSS a été réalisé avec le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (radionucléide modèle moins irradiant et plus disponible) avant l'utilisation de ^{188}Re . Le technétium-99m, du fait de ces propriétés chimiques proche de celles du rhénium-188 (cf. II. B. 1), a servi de modèle d'optimisation pour le procédé dans des conditions moins irradiantes.

A. Matériels et Méthodes

1) Matériels

Le ^{99m}Tc sous forme libre pertechnétate en solution de NaCl 0,9 % $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$ (PRC > 95 %) a été obtenu par élution d'un générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ CIS bio international (Gif-sur-Yvette, France).

Le ^{188}Re sous forme $\text{Na}[^{188}\text{ReO}_4]$ en solution de NaCl 0,9 % (PRC > 95 %) a été obtenu lors de l'élution puis de la concentration du générateur $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Institut des RadioEléments, (Fleurus, Belgique).

Pour la synthèse du complexe Me-SSS, à l'exception du ligand dithiobenzoate de sodium, les matières premières sont disponibles commercialement, et ont été conditionnées en flacon sous forme de lyophilisat formant le kit réducteur A, cf II. C. 2). Le dithiobenzoate de sodium a été fourni sous forme de poudre par le Centre Eugène Marquis (Rennes, France), et synthétisé selon la procédure décrite par *Roberie* et al [100]. Celui-ci a été pesé en flacon extemporanément à la production, formant ainsi le kit Ligand B.

Concernant l'étape de formulation des nanocapsules lipidiques, les matières premières sont toutes disponibles commercialement (cf II. A. 1), page 24) et sont pesées extemporanément à la production directement dans le flacon réactionnel (réacteur 2 sur automate SynChrom®).

Au cours des essais, deux automates ont été utilisés : l'automate Taddeo® Comecer® (Catelbolognese, Italie) et l'automate SynChrom® R&D Raytest® (Straubenhardt, Allemagne), cf III. C. 3), page 52.

Les colonnes Sep-Pak® C8 plus Short ont été fournies par Waters® (Milford, MA, USA) et les filtres stérilisant Minisart® (0,22 µm de diamètre de pore) par Sartorius Stedim France (Aubagne, France).

Les mesures de radioactivité ont été réalisées par comptage gamma au moyen d'un activimètre Scintidose® (Lemer Pax®), calibré sur le ^{99m}Tc et le ^{188}Re .

2) Automatisation de la production des NCL blanches sur automate SynChrom® R&D, Raytest®

L'absence de données concernant la capacité de formulation des NCL blanches avec l'automate SynChrom® R&D Raytest® suppose une étude préliminaire de synthèse automatisée de NCL blanches. En effet, bien que cet automate ait été choisi en raison de ses capacités techniques à répondre aux besoins physico-chimiques de la synthèse du complexe Re-SSS et de la NCL (cf III. C. 3), page 52), il s'agit avant tout d'un automate destiné à la synthèse radiochimique et non à la formulation de suspensions nanoparticulaires.

L'automate a été programmé, par transposition des étapes non automatisées, en vue de la formulation de NCL « blanches ». Les étapes suivantes ont été définies :

1. Les cycles successifs d'inversion de phases dans le réacteur 2 sous agitation magnétique
 - a. chauffage à 90°C
 - b. refroidissement à 50°C
2. Transfert du volume de trempe vers le réacteur 2 puis agitation 5 mn à température ambiante
3. Transfert du contenu du réacteur 2 de Re-SSS-NCL vers le flacon de dispensation.

4. Transfert du contenu du flacon de dispensation vers le flacon du produit final

Les matières premières nécessaires à la formulation des NCL ont été pesées directement dans le réacteur 2 avant la production.

Cette étude a consisté à modifier la programmation de l'automate en agissant sur les températures de consignes des cycles d'inversion de phase, le nombre de cycle d'inversion de phase, le transfert du volume de trempe, les quantités de matières premières ou le volume de trempe pour optimiser la production des NCL. Pour caractériser cette optimisation, les critères de jugement retenus ont été la distribution en taille des NCL (taille cible et monodispersité) et le rendement de production.

Le rendement de production correspond à la perte de quantités de matières premières en cours de production. Il est calculé de la manière suivante :

$$R = \frac{Masse_{prod} - \sum Masse_{mp}}{\sum Masse_{mp}} \times 100$$

$Masse_{prod}$: Masse de la production finale dans le flacon de dispensation

$\sum Masse_{mp}$: Sommes des Masses des matières premières ajoutées dans le réacteur.

L'objectif de production est une mono-dispersion ($PdI < 0,1$) au voisinage de 50 nm de diamètre. Cette valeur de référence est décrite par Heurtault [60]. Cependant, les tailles de références décrites ont été mesurées sur une ancienne génération d'appareil de spectroscopie à corrélation photonique (PCS), quelques variations par rapport à la taille de 50 nm d'un objet sont donc attendues.

Une phase préliminaire d'optimisation (phase 1) de production automatisée de NCL blanches est réalisée afin de permettre la production rapide de NCL (cf. Tableau 9).

Tableau 9 : Récapitulatif des étapes de la 1^{ère} phase d'optimisation de la formulation de NCL blanches

	Programme	Paramètres optimisés
Production 1 (P1)	LNCformulation1	Transposition à l'automate des étapes de synthèse
Production 2 (P2)	LNCformulation2	Températures de consignes d'inversion de phase
Production 3 (P3)	LNCformulation 3	Nombre de cycles d'inversion de phase
Production 4 (P4)	LNCformulation4	Transfert du volume de trempe
Production 5 (P5)	LNCformulation4	Réduction des quantités de matières premières par 2

Un cycle est constitué d'une montée et d'une descente en température autour de la température d'inversion de phase. On peut observer à l'œil nu le changement d'aspect de la solution. Avec l'élévation de la température, l'aspect passe successivement du blanc (émulsion H/E) au translucide (dans la zone d'inversion de phase) puis au blanc opaque (émulsion E/H), et inversement lorsque la température s'abaisse (cf II. A. 2), page 25).

Les productions P2, P3, et P4 ont été répétées à 3 reprises.

La seconde phase d'optimisation (phase 2), a permis d'étudier plus finement l'influence des principaux paramètres de formulation sur la dispersion en taille des NCL blanches et sur le rendement de production. Les paramètres étudiés sont résumés dans le Tableau 10. Lors de cette étude, les températures d'inversion de phase ne seront pas modifiées (50 et 90°C). Vingt-six productions ont été réalisées au cours de la phase 2.

Tableau 10 : Récapitulatif des étapes de la 2nd phase d'optimisation de la formulation de NCL blanches. VO : Version originale de la quantité de matières premières nécessaires pour la formulation de NCL de 50 nm de diamètre. V trempe = 4,15 ml dans le procédé originale

Paramètres de formulation	Productions réalisées
Influence du nombre de cycle	Nb cycle : 1 - 2 - 4 - 6 - 8
Influence des quantités de matières premières (avec nb cycle =4)	VO - VO/2 - VO/3 - VO/4,5
Influence du volume de trempe (avec nb cycle =4 et VO/4,5)	V trempe (ml) : 2,8 - 4,15 - 13

3) Production non automatisée des NCL chargées en rhénium-188

Trois productions sur paillasse, d'activités radioactives différentes, de ^{188}Re -SSS-NCL ont été réalisées. Ces productions sont réalisées conformément au mode opératoire présenté dans la section II. D., page 40. Ces productions ont été étudiées en terme de pureté radiochimique pour le complexe ^{188}Re -SSS, d'activités perdues et disponibles (RT, RE cf IV. A. 4) B), page 74). La distribution en taille des NCL a également été étudiée.

4) Automatisation de la production de NCL radioactives

Les étapes d'extraction/purification du complexe Me-SSS ont été optimisées. L'utilisation de Labrafac® comme solvant alternatif et non toxique au dichlorométhane pour solubiliser le complexe $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ -SSS a été testé. Une autre méthode de purification par extraction en phase solide du complexe $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ -SSS a été étudiée. Les résultats de ce travail ont ensuite été transposés et testés avec des procédés automatisés. Des productions de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS-NCL ont été réalisées et étudiées en termes de rendement de production et pureté radiochimique.

a) Optimisation de l'extraction/purification du complexe Me-SSS

Au cours de ce travail les conditions optimales permettant l'extraction et la purification du complexe Me-SSS ont été définies en premier lieu pour une production non automatisée, puis par la suite, transposées à un procédé automatisé. L'objectif de ce travail a consisté à réduire au maximum les pertes radioactives en cours des phases d'extraction/purification du complexe Me-SSS (Me : $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ou ^{188}Re).

Après extraction du complexe Me-SSS, deux stratégies de purification ont été étudiées :

- La séparation de phases par décantation qui est actuellement utilisée en synthèse non automatisée.
- L'extraction en phase solide (SPE) à l'aide d'une colonne Sep-Pak® qui est une solution alternative plus adaptée à l'automatisation du procédé.

i. **Optimisation de l'extraction/purification non automatisée**

a. Extraction : Labrafac® comme solvant alternatif au dichlorométhane

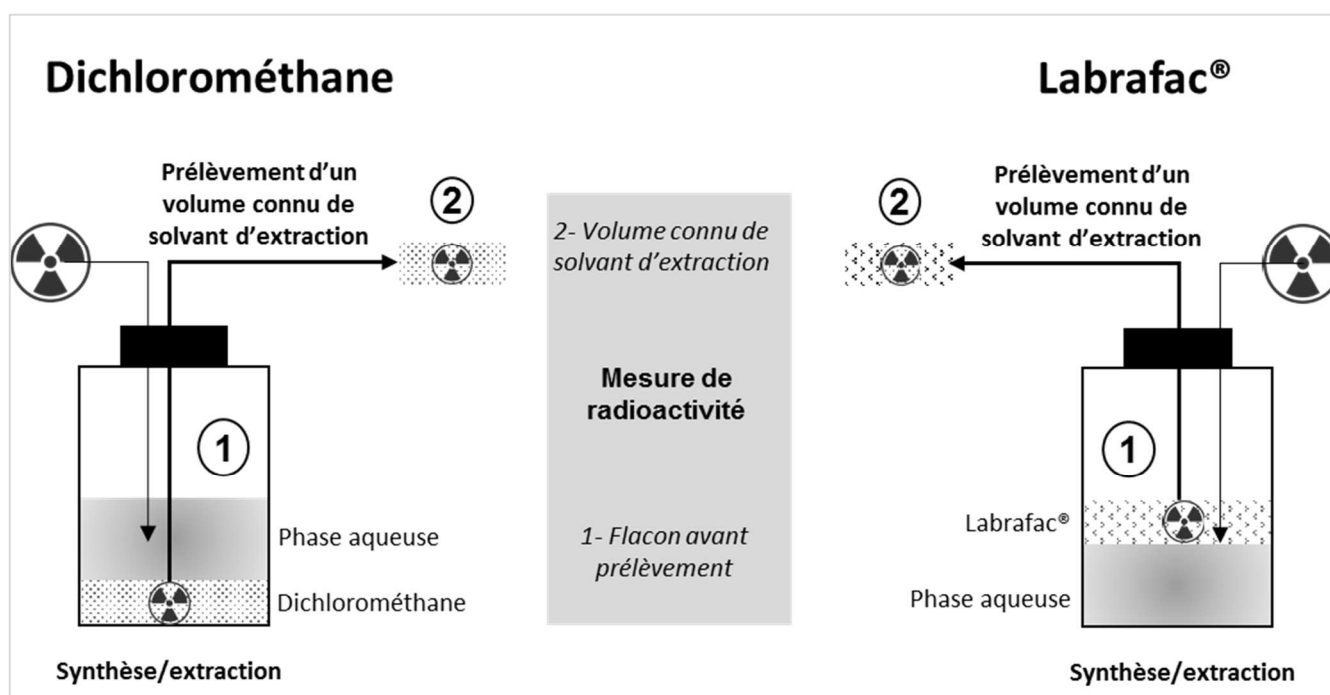


Figure IV-1 : Radioactivités mesurées pour le calcul du rendement d'extraction du complexe Me-SSS après synthèse, extraction avec un solvant organique (dichlorométhane et Labrafac®), puis décantation.

Après synthèse du complexe Me-SSS (cf II. C. 2)) dans le flacon réactionnel le précipité obtenu a été extrait par ajout d'un solvant organique (dichlorométhane ou Labrafac®). Le prélèvement d'un volume connu de la phase organique (dichlorométhane : phase inférieure, Labrafac® : phase supérieure) a ensuite été réalisé après un temps de décantation. Des mesures de radioactivité, à l'activimètre, ont été réalisées sur le flacon réactionnel avant prélèvement (cf ① Figure IV-1) sur un volume connu de phase extractive (cf ② Figure IV-1).

Trois types d'études ont été réalisés :

1. Extraction de Re-SSS par Labrafac® à froid vs dichlorométhane à température ambiante : Après synthèse et extraction, 0,2 ml de Labrafac® ont été prélevés dans une seringue de 1ml puis la radioactivité a été mesurée à l'activimètre. (réalisation de l'étude en triplicate)
2. Extraction de Tc-SSS par Labrafac® à 50°C, 75°C et 100°C : même méthode que 1. (une seule étude par température)
3. Extraction de Re-SSS par Labrafac® à 100°C : même méthode que 1. (Duplicate)

Le rendement d'extraction (%) a été mesuré par le rapport entre la radioactivité dans la phase d'extraction sur la radioactivité totale.

La pureté radiochimique a été contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM).

b. Extraction/Purification non automatisée en phase solide sur colonne Sep-Pak®

Quatre synthèses du complexe ^{99m}Tc -SSS ont été réalisées en parallèle avec chacune 150 à 200 MBq de ^{99m}Tc . Dans chaque flacon réactionnel, après sa synthèse, le complexe a été extrait par l'ajout d'un solvant organique. La totalité du volume réactionnel a été prélevée dans une seringue puis a été transférée sur la colonne Sep-Pak® non conditionnée. Cette colonne a ensuite été rincée d'abord par 10 ml d'eau milliQ®, puis par 2 ml d'un mélange (1:1, éthanol 100 % : eau milliQ®). Enfin, le complexe a été élué par ajout d'un solvant d'élution.

Différents solvants d'extraction et d'élutions ont été testés (cf. tableau-ci-dessous).

Tableau 11 : Conditions expérimentales appliquées dans l'étude de solubilisation et purification du complexe Tc-SSS sur colonne Sep-Pak®

CONDITIONS EXPERIMENTALES	CH ₂ CL ₂	ETOH	L/CH ₂ CL ₂	L100/ETOH
Solvant d'extraction	CH ₂ CL ₂ 1 ml	Ethanol absolu 1 ml	Labrafac 1 ml	Labrafac® 100°C 1 ml
Solvant d'élution	CH ₂ CL ₂ 1 ml	Ethanol absolu 1 ml	CH ₂ CL ₂ 1 ml	Ethanol absolu 2,5 ml

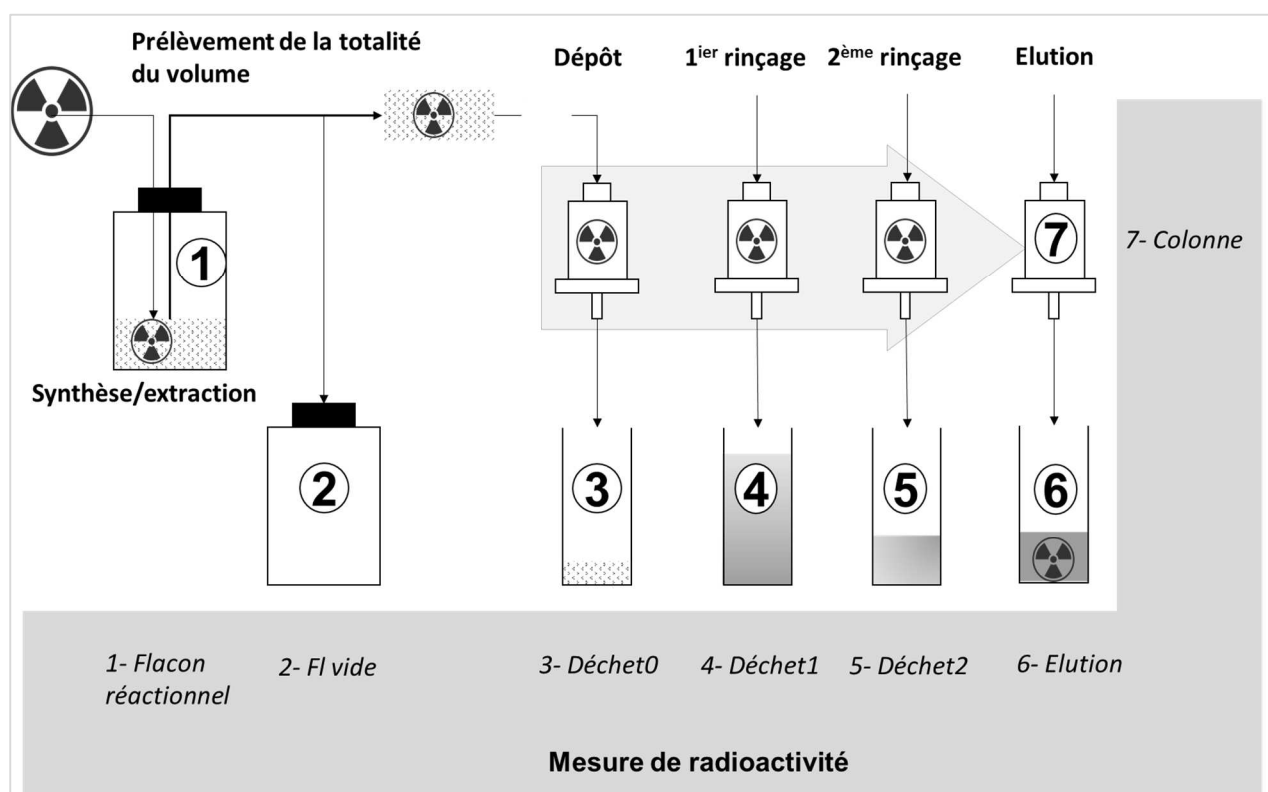


Figure IV-2 : Radioactivités mesurées en cours de purification en phase solide. Chaque échantillon analysé est identifié avec un numéro. Fl vide : flacon réactionnel après prélèvement. Déchet0 : volume élué dans les déchets après dépôt du contenu du flacon réactionnel sur la colonne. Déchet1 et Déchet2 : volumes élués dans les déchets après respectivement 1^{er} et 2^{ème} rinçage de la colonne. Colonne : colonne Sep-Pak® après élution du complexe Tc-SSS

Les radioactivités suivantes ont été mesurées à l'activimètre (cf. Figure IV-2) :

- radioactivité ajoutée dans le flacon réactionnel (Flacon réactionnel)
- radioactivité perdue dans les déchets par la colonne lors du transfert du contenu du flacon réactionnel après réaction (Déchet0)
- flacon réactionnel après prélèvement (Fl vide)
- Déchets après le 1^{er} rinçage (Déchet1) et le 2nd rinçage (Déchet2)
- volume obtenu par élution (Elution)
- colonne après élution (Colonne).

Pour chaque condition expérimentale ont été calculés : le rendement de récupération de l'activité initiale R_{mesure} , le rendement pour chaque étape RE et l'efficacité d'élution EEL.

ii. Automatisation et optimisation de l'extraction/purification

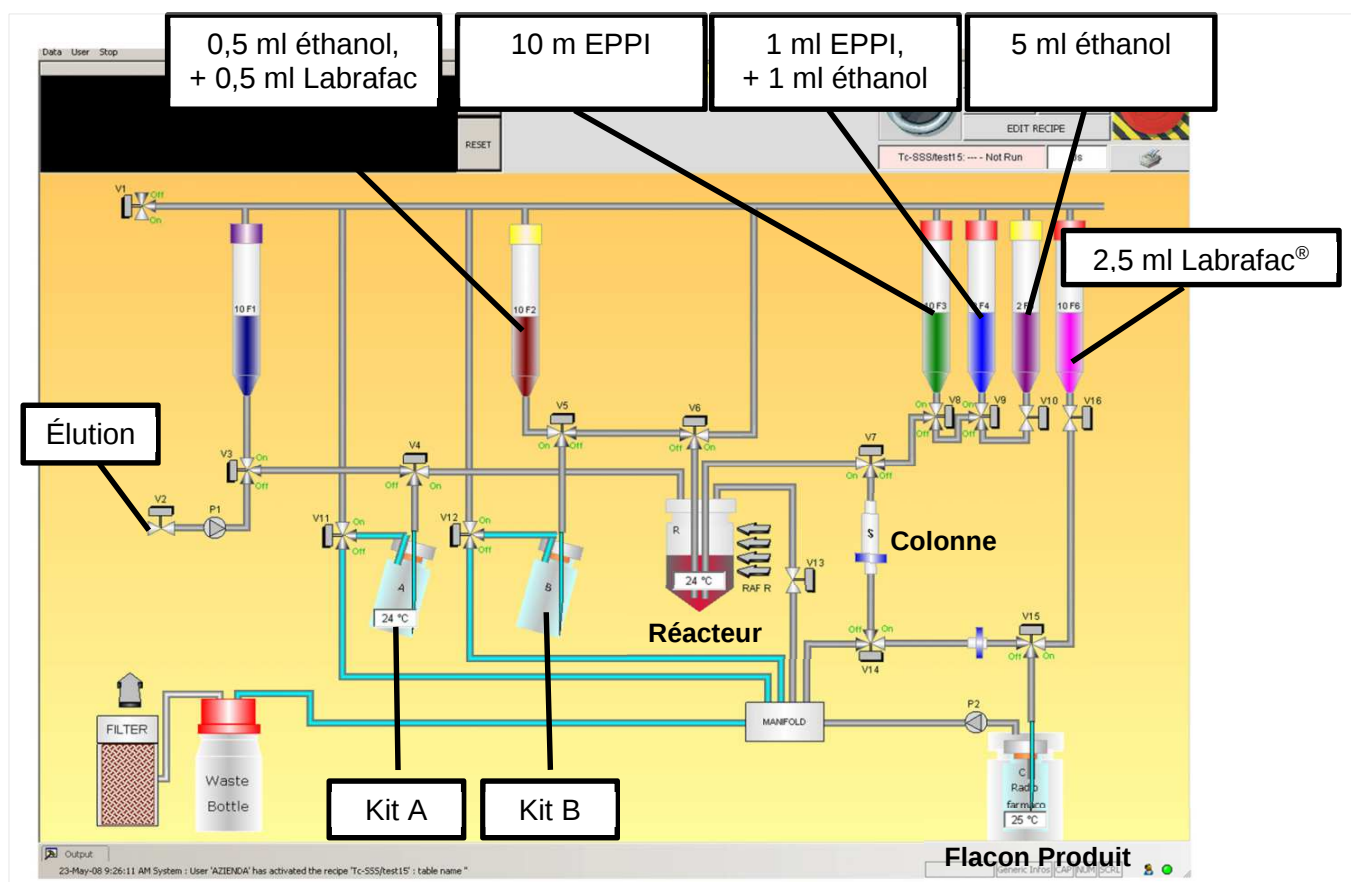


Figure IV-3 : Organigramme du module TADDEO® de préparation du ^{188}Re -SSS /Lipiodol adapté pour l'extraction de Re-SSS par Labrafac®

a. Module TADDEO®, Comecer®

Cette extraction/purification a été réalisée sur un automate TADDEO module (COMECER, Castelbolognese, Italy). Le programme utilisé (cf figure ci-dessus) a été adapté à partir de celui utilisé pour la synthèse Lipiodol® marqué au ^{188}Re -SSS développé par Lepareur *et AL.* [91].

La synthèse du complexe Re-SSS a été réalisée dans le réacteur, puis une extraction a été réalisée dans un mélange Labrafac® / éthanol (50:50). Le contenu du réacteur a été transféré au travers d'une colonne d'extraction liquide/solide de silice greffée en C8. La colonne a ensuite été rincée à deux reprises par de l'EPPI puis un mélange EPPI / éthanol en direction des déchets, puis 5 ml d'éthanol ont élué le Re-SSS. Une évaporation de l'éthanol a ensuite été réalisée avant ajout du Labrafac®.

Le rendement d'extraction/purification du complexe Re-SSS a été calculé (Activité du flacon produit / Activité de flacon d'élution).

b. Module SynChrom® R&D, Raytest®

L'objectif a été de réduire au maximum les pertes radioactives pour des conditions automatisées d'extraction en phase solide sur SynChrom® R&D, Raytest®. L'influence de la nature et du volume du solvant de solubilisation du complexe a été étudiée. Un programme et des paramètres optimaux ont été définis.

Une programmation de l'automate a été développée pour permettre spécifiquement la synthèse et la purification du complexe Tc-SSS sans formulation de NCL. Ce programme a été amélioré au cours des synthèses et également utilisé pour le procédé de production de Me-SSS-NCL. Les différents réactifs de la synthèse ont été respectivement ajoutés dans le réacteur 1 avec la séquence adaptée pour permettre la synthèse du complexe intermédiaire de gluconate suivi de la synthèse du complexe Me-SSS. Après synthèse le solvant d'extraction a été ajouté à la température adaptée. Après un temps de contact sous agitation le contenu du réacteur a été transféré sur la colonne Sep-Pak® C8⁴. Cette colonne a ensuite été rincée d'abord par 10 ml d'eau milliQ®, puis par 2 ml d'un mélange (1:1, éthanol 100 % : eau milliQ®). La colonne a été ensuite éluée dans le réacteur 2. Puis le contenu du réacteur 2 a été transféré dans le flacon « produit final ». (cf Figure IV-17).

Sept conditions expérimentales différentes ont été testées avec une activité radioactive initiale de ^{99m}Tc variant entre 150 à 570 MBq, utilisant comme solvant d'extraction, soit le Labrafac® (0,5 ; 0,75 ; 1 ml), soit le dichlorométhane (0,75 ; 3 x 0,25 ; 0,85 ; 0,9 ml) et

⁴ Pause du programme pour permettre la mesure de la radioactivité à l'activimètre de la colonne (déconnectée de l'automate).

comme solvant d'élution soit le dichlorométhane (1,5 ; 2 ml) soit l'éthanol absolu (2,5 ml).

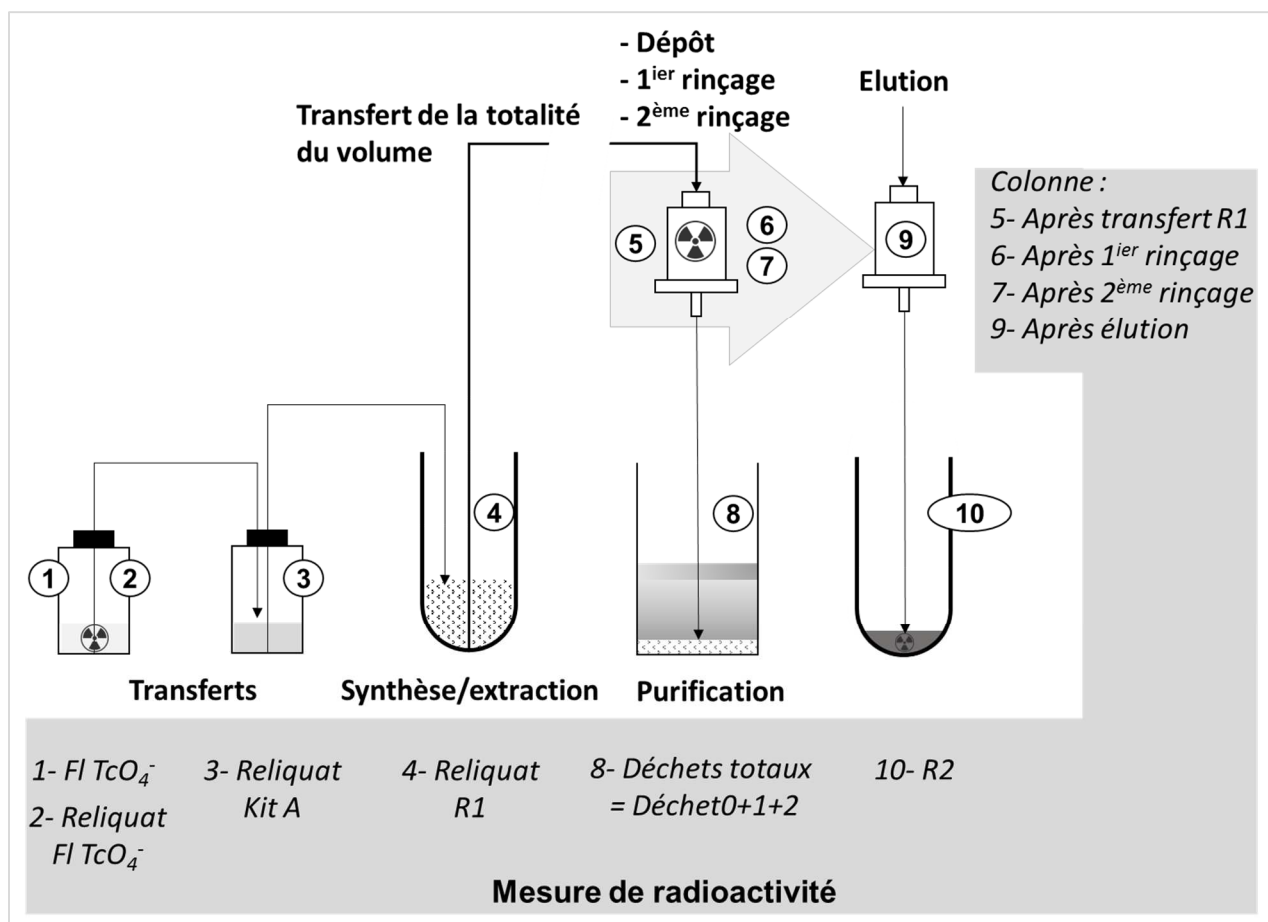


Figure IV-4 : Radioactivités mesurées en cours d'étude automatisée de purification en phase solide. Chaque échantillon qui a été analysé est identifié sur ce schéma par un numéro.

Les radioactivités suivantes ont été mesurées à l'activimètre (cf Figure IV-4) :

- radioactivité apportée à l'automate (Fl TcO_4^-)
- reliquat flacon TcO_4^- après prélèvement (Reliquat Fl TcO_4^-)
- reliquat flacon kit A après synthèse (Reliquat kit A)
- **reliquat réacteur 1** après transfert du contenu sur la colonne (Reliquat R1)
- radioactivités perdues dans les déchets lors du dépôt sur la colonne, et des rinçages (Déchets totaux)
- Colonne après dépôt (colonne après transfert R1)
- Colonne après 1^{er} rinçage
- Colonne après 2^{ème} rinçage
- **Réacteur 2** contenant l'élution (R2)
- colonne après élution (Colonne après élution).

Le rendement de récupération de l'activité mesurée totale (RT), le rendement par étape (RE), et l'efficacité d'élution (EEL) ont été suivis.

b) Production automatisée de ^{99m}Tc -SSS-NCL

Le nombre théorique d'atomes radioactifs rapporté au nombre de NCL disponibles par production a été déterminé. Des situations de production avec le technetium-99m ou le rhénium-188, en faible activité (740 MBq) ou forte activité radioactive (5 GBq), et de différentes quantités de NCL disponibles, ont été envisagées.

Une production de ^{99m}Tc -NCL a été réalisée en triplicate avec 0,85 ml de CH_2Cl_2 comme solvant d'extraction et 2 ml de CH_2Cl_2 pour l'élution de la colonne. Les programmes développés au cours des études sur la production de NCL blanches et celui développé lors de l'étude d'extraction/purification ont été fusionnés. Les matières premières nécessaires à la formulation (cf II. A. 2)) sont pesées directement dans le réacteur 2.

Le circuit de production a été divisé en quatre étapes :

N°	Etape	N° sur Figure IV-24
1	Synthèse et extraction du complexe Me-SSS	1 à 9
2	Purification	10 à 12
3	Nano-encapsulation	13 à 15
4	Dispensation et stérilisation	16 et 17

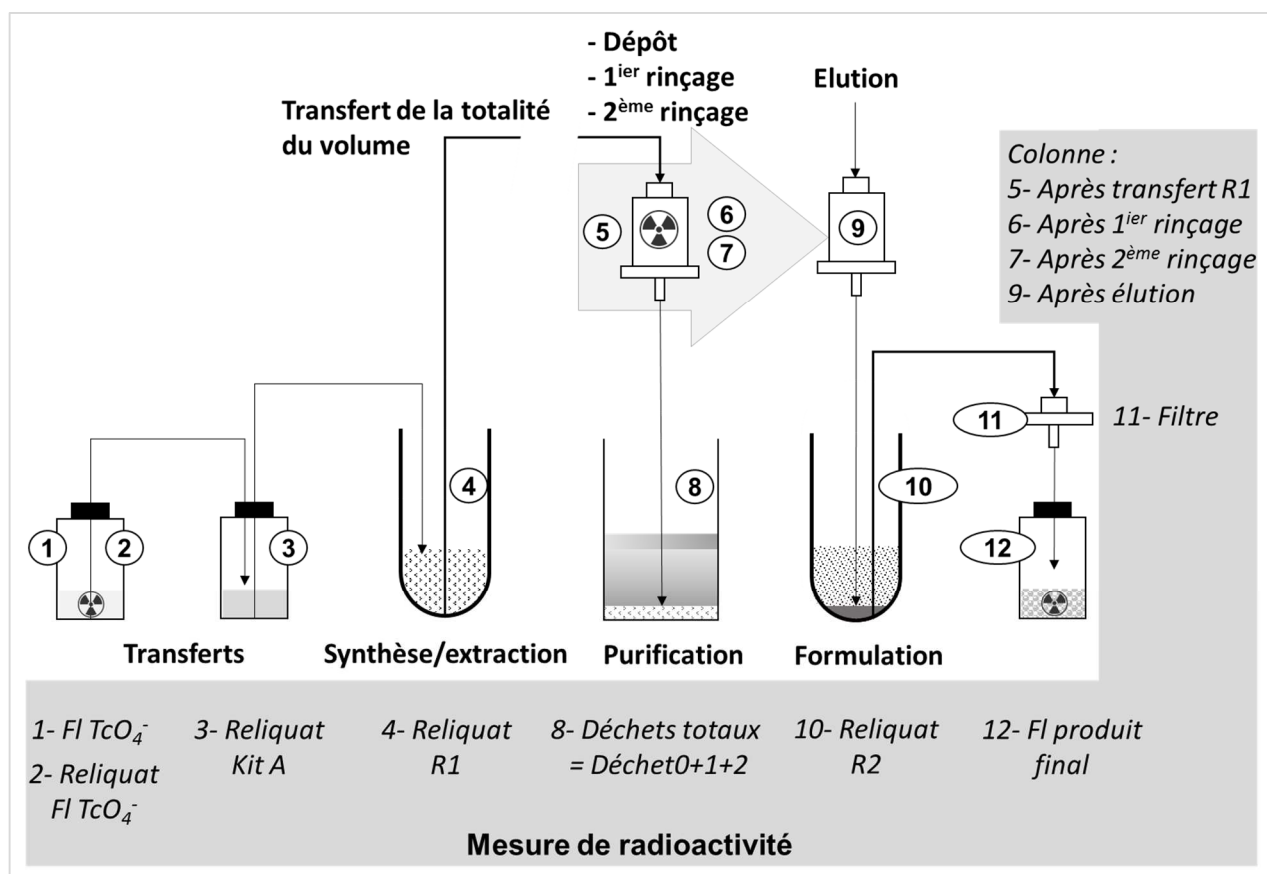


Figure IV-5 : Radioactivités mesurées en cours de production automatisée de ^{99m}Tc -SSS-NCL. Chaque échantillon qui a été analysé est identifié sur ce schéma par un numéro.

Les activités en ^{99m}Tc suivantes sont mesurées à l'activimètre en cours d'étude :

- radioactivité apportée à l'automate (Fl TcO_4^-)
- reliquat flacon TcO_4^- après prélèvement (Reliquat TcO_4^-)
- reliquat flacon kit A après synthèse (Reliquat kit A)
- **reliquat réacteur 1** après transfert du contenu sur la colonne (Reliquat R1)
- radioactivités perdues dans les déchets lors du dépôt sur la colonne, et des rinçages (Déchet totaux)
- **réacteur 2** contenant l'élution (R2)
- colonne après élution (Colonne après élution)
- reliquat flacon de dispensation
- filtre (Filtre)
- Flacon de produit final (Fl produit final)

Le rendement de récupération de l'activité initiale (R_{mesure}), et le rendement par étape ($R_{\text{« étape »}}$) ont été suivis.

La taille des particules (z-average) et le PdI sont également mesurés.

5) Caractérisations

a) Caractérisations du produit

i. Distribution en taille des NCL

La distribution en taille des NCL est analysée par spectroscopie de corrélation photonique (PCS) Malvern Zetasizer® Nano Serie DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). Les échantillons mesurés sont dilués au 1/60^{ième}. Les paramètres étudiés sont le z-average qui exprime le diamètre hydrodynamique des particules en considérant qu'elles soient sphériques, la valeur cible étant environ de 50 nm, et le PdI (Indice de PolyDispersité) qui exprime la distribution en taille des particules. L'objectif est d'obtenir une population particulière monodisperse en taille (soit $PdI < 0,1$).

ii. Pureté radiochimique des complexes ^{188}Re -SSS et ^{99m}Tc -SSS

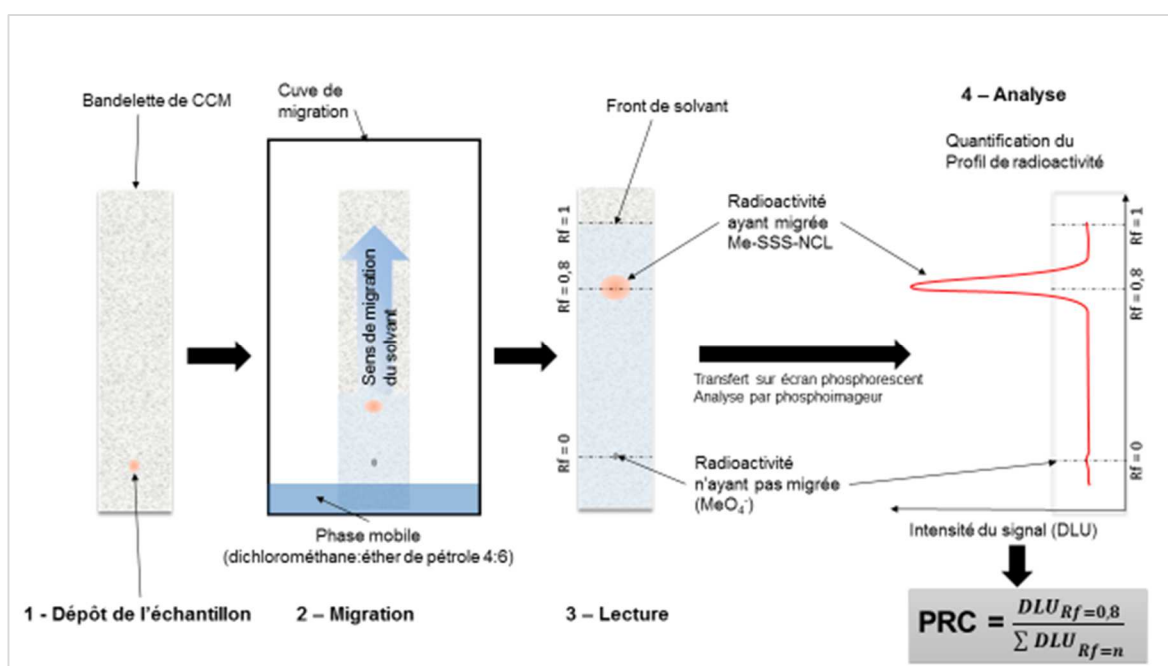


Figure IV-6 : Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des complexes ^{188}Re -SSS et ^{99m}Tc -SSS.

La pureté radiochimique (PRC) est contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM) et s'exprime comme le rapport entre la radioactivité ayant migrée rapportée à la radioactivité totale (cf **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Les CCM sont réalisées

sur des plaques d'aluminium greffées par de la silice 60 et une solution d'éther de pétrole/dichlorométhane (6/4, v/v) comme éluant ($R_f = 0,7$) [91]. La mesure de la radioactivité est évaluée par un phospho- imageur (Packard, Cyclone storage phosphore system)

iii. **Calculs théoriques par production : nombre d'atomes radioactifs rapporté au nombre de NCL**

L'objectif est de décrire les formulations en particules chargées ^{99m}Tc -SSS-NCL ou ^{188}Re -SSS-NCL en terme de nombre d'atomes disponibles par NCL et de nombre de NCL radioactives par formulation.

Le calcul du nombre de NCL disponibles par formulation est réalisé selon une méthode décrite par Lacoëuille *et Al.* [1]. Le volume occupé par chacune des matières premières (Lipoïd®, Labrafac®, Solutol®) a été calculé à partir de la densité décrite dans la fiche produit et de la quantité pesée. L'eau et le NaCl bien que nécessaires à la formulation des particules, constituant la phase dispersante, n'entrent pas dans le volume occupé par les particules. Dans l'hypothèse simplificatrice de l'absence de perte de matières premières au cours de la formulation, l'addition des volumes occupés par le Lipoïd®, le Solutol® (constituants de l'enveloppe des NCL) et le Labrafac® (constituant du cœur lipidique des NCL) a représenté le volume occupé par l'ensemble des NCL formulées. Le volume d'une NCL a été calculé à partir d'une valeur moyenne du diamètre des NCL produites en considérant celles-ci sphériques. Le nombre de NCL par formulation a été déduit du volume occupé par l'ensemble des NCL divisé par le volume d'une seule NCL. La concentration en NCL d'une formulation a été obtenue à partir du nombre de NCL par formulation divisé par le volume total d'une formulation (phase aqueuse comprise).

$$A(Bq) = \lambda \times N \quad (1)$$

A : Activité radioactive (Bq)

λ : Constante de désintégration radioactive (s^{-1})

N : Nombre d'atomes radioactifs

Selon l'équation (1), l'activité radioactive est dépendante du nombre d'atomes radioactifs présents. Connaissant la demi-vie de décroissance physique du technétium-99m (6 heures) et du rhénium-188 (17 heures), pour des formulations choisies avec 740 MBq (formulation basse activité) et 5 GBq (formulation haute activité), le nombre d'atomes radioactifs présents est calculable en considérant que toute la radioactivité provient de l'atome radioactif sous la forme Me-SSS considérée.

Le nombre d'atomes radioactifs (AR) présents est rapporté au nombre de NCL disponibles (AR/NCL).

Ce calcul est effectué pour différentes quantités de NCL produites (Q/1, Q/2, Q/3, Q/4,5) testées lors des formulations blanches.

b) Indicateurs du procédé

Selon les études réalisées, des mesures de la radioactivité à l'aide d'un activimètre ont été effectuées à différentes étapes du procédé. Ces mesures ont été corrigées de la décroissance radioactive puis utilisées pour calculer les paramètres cités ci-dessous. Ces paramètres ont permis de comparer les différentes conditions expérimentales au sein de chaque étude ou entre les différentes études réalisées.

Les paramètres suivants ont été calculés :

i. Rendement d'extraction (uniquement extraction liquide/liquide)

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{\text{Activité de la phase extractive (MBq)}}{\text{Activité totale (MBq)}}$$

L'activité de la phase extractive a été calculée en pratique à partir d'un prélèvement de volume connu de phase organique extractive du complexe Me-SSS (cf ② Figure IV-1), corrigé du volume total connu de cette phase d'extraction.

L'activité totale est l'activité initiale dans le flacon d'expérimentation (cf ① Figure IV-1).

ii. Rendement de mesure de l'activité initiale

$$R_{\text{mesure}} (\%) = \frac{\sum \text{Activités mesurées (MBq)}}{\text{Activité initiale (MBq)}} \times 100$$

Activité initiale correspond à l'activité en ^{99m}Tc ou ^{188}Re ajoutée dans le système réactionnel pour permettre la production ou l'expérimentation.

$\sum \text{Activités mesurées}$ correspond à l'addition des valeurs de mesures d'activités perdues avec celle mesurée dans le produit final.

Dans un système où toutes les pertes sont identifiées et mesurables, la valeur de cette somme doit être proche de l'activité initiale. Ainsi une valeur du R_{mesure} proche de 100 % est souhaitée pour s'assurer que chaque perte de radioactivité a été identifiée en cours de production.

iii. Rendement pour chaque étape

Pour permettre une comparaison entre les différentes conditions expérimentales, les activités de chaque mesure sont rapportées à l'activité initiale dans l'expérience.

$$R_{\text{« étape »}} (\%) = \frac{\text{Activité mesurée pour une étape (MBq)}}{\text{Activité initiale (MBq)}} \times 100$$

Le $R_{\text{« étape »}}$, selon l'étape à laquelle il correspond, peut représenter soit une perte radioactive soit une activité conservée.

a. Extraction non automatisée en phase solide

Les numéros indiqués dans cette partie font référence à la Figure IV-2, page 66.

Le $R_{\text{« étape »}}$ correspond à une activité radioactive perdue pour les mesures Fl vide ②, Déchet0 ③, Déchet1 ④, Déchet2 ⑤, et colonne ⑦. Le R_{Elution} ⑥ correspond à une activité disponible pour la suite de la production.

$R_{\text{Fl vide}}$ est un indicateur d'extraction du complexe. Un $R_{\text{Fl vide}}$ proche de 0 signifie qu'il ne reste plus de radioactivité après prélèvement du contenu du réacteur, ce qui reflète la qualité de la solubilisation du complexe.

$R_{\text{déchet0}}$ est un indicateur de la rétention du complexe sur la colonne lors du dépôt de celui. D'une faible rétention du complexe résulte un RE_{PB0} élevé et une forte rétention du complexe est mesurée par un $R_{\text{déchet0}}$ faible.

$R_{\text{déchet1}}$ et $R_{\text{déchet2}}$ indiquent les pertes radioactives générées lors respectivement du 1^{ier} et du 2^{ème} rinçage.

R_{colonne} représente la perte radioactive dans la colonne Sep-Pak® après élution.

R_{Elution} est un indicateur du rendement de l'extraction/purification du complexe $^{99m}\text{Tc-SSS}$ sur la colonne Sep-Pak®.

b. Extraction automatisée en phase solide

Les numéros indiqués dans cette partie font référence à la Figure IV-4, page 69.

Le RE correspond à une activité radioactive perdue pour les mesures Reliquat Fl TcO_4^- ②, Reliquat kit A ③, Reliquat R1 ④, Déchets totaux ⑧, Colonne après élution ⑨,

Reliquat R2 ⑩. Les RE suivants correspondent à une activité disponible : colonne -après transfert R1 ⑤, -après 1^{er} rinçage ⑥, -après 2^{ème} rinçage ⑦, et Élution ⑩.

c. Production automatisée de ^{99m}Tc-SSS-NCL

Les numéros indiqués dans cette partie font références à la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, page **Erreur ! Signet non défini.**.

Les numéros jusqu'à ⑨ sont identiques à ceux de la Figure IV-4, page 69. Les R_{Reliquat R2} ⑩ et R_{Filtre} ⑪ correspondent à des pertes radioactives. Le R_{Élution} ⑫ représente une activité disponible.

iv. L'efficacité de l'élution

$E_{\text{Élution}} = \frac{R_{\text{Élution}}}{R_{\text{Colonne}}}$, nous informe sur la capacité du solvant d'élution à entraîner le complexe radioactif piégé sur la colonne Sep-Pak®.

B. Résultats

1) Automatisation de la production de NCL blanches

La phase 1 a conduit à la transposition des étapes de formulation et a nécessité la réalisation de 52 lignes de programme (Annexe A). Pour quatre cycles d'inversions de phases, 45 mn ont été nécessaires à la production. Les étapes de productions sont représentées dans la Figure IV-7.

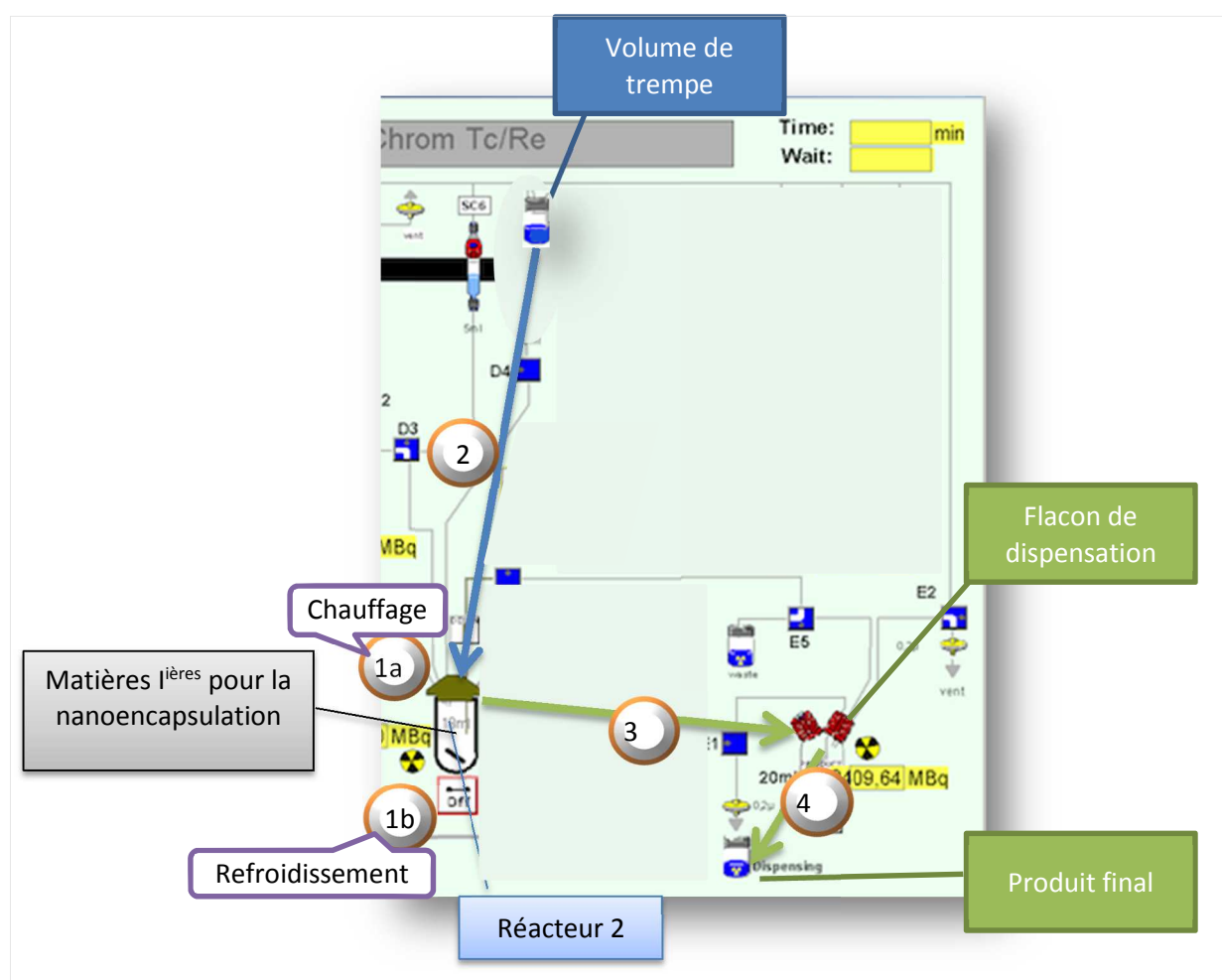


Figure IV-7 : Organigramme de l'automate préparé pour la formulation de NCL blanches. La chronologie de déroulement des étapes est présentée par les chiffres en ordre croissant : 1a, 1b, 2, 3, 4.

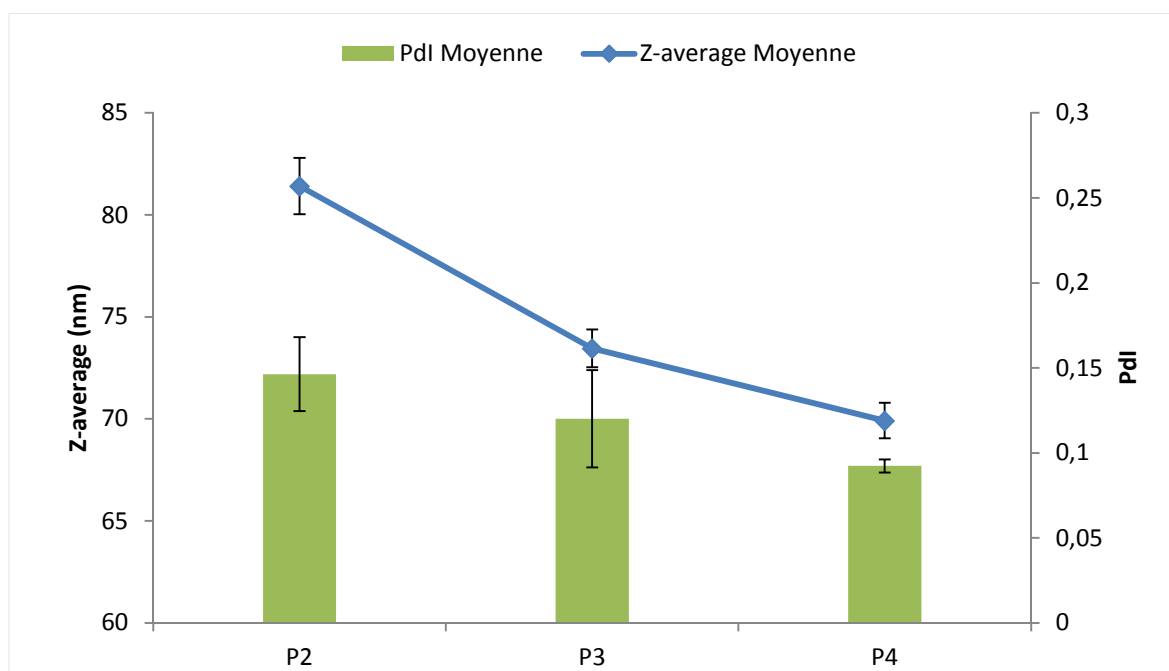


Figure IV-8 : Évolution de la taille (z-average) et de la distribution en taille (PdI) des NCL au cours des étapes (P1, P2, P3) d'optimisation de la formulation

La première production (P1) n'a pas permis la production correcte de particules. Aucune inversion de phase n'a été visualisée. La taille moyenne des particules était de $2108 \text{ nm} \pm 705 \text{ nm}$ avec un PdI de $0,406 \pm 0,322$.

Pour les productions P2, P3, et P4 (cf compte rendu de mesure de taille Annexe C), les données de taille des particules ont été regroupées dans la Figure IV-8 et un compte rendu détaillé est présenté en annexe A.

Pour la phase 2 d'optimisation, l'influence des paramètres a été présentée dans les Figure IV-9, Figure IV-10, Figure IV-11, ci-dessous.



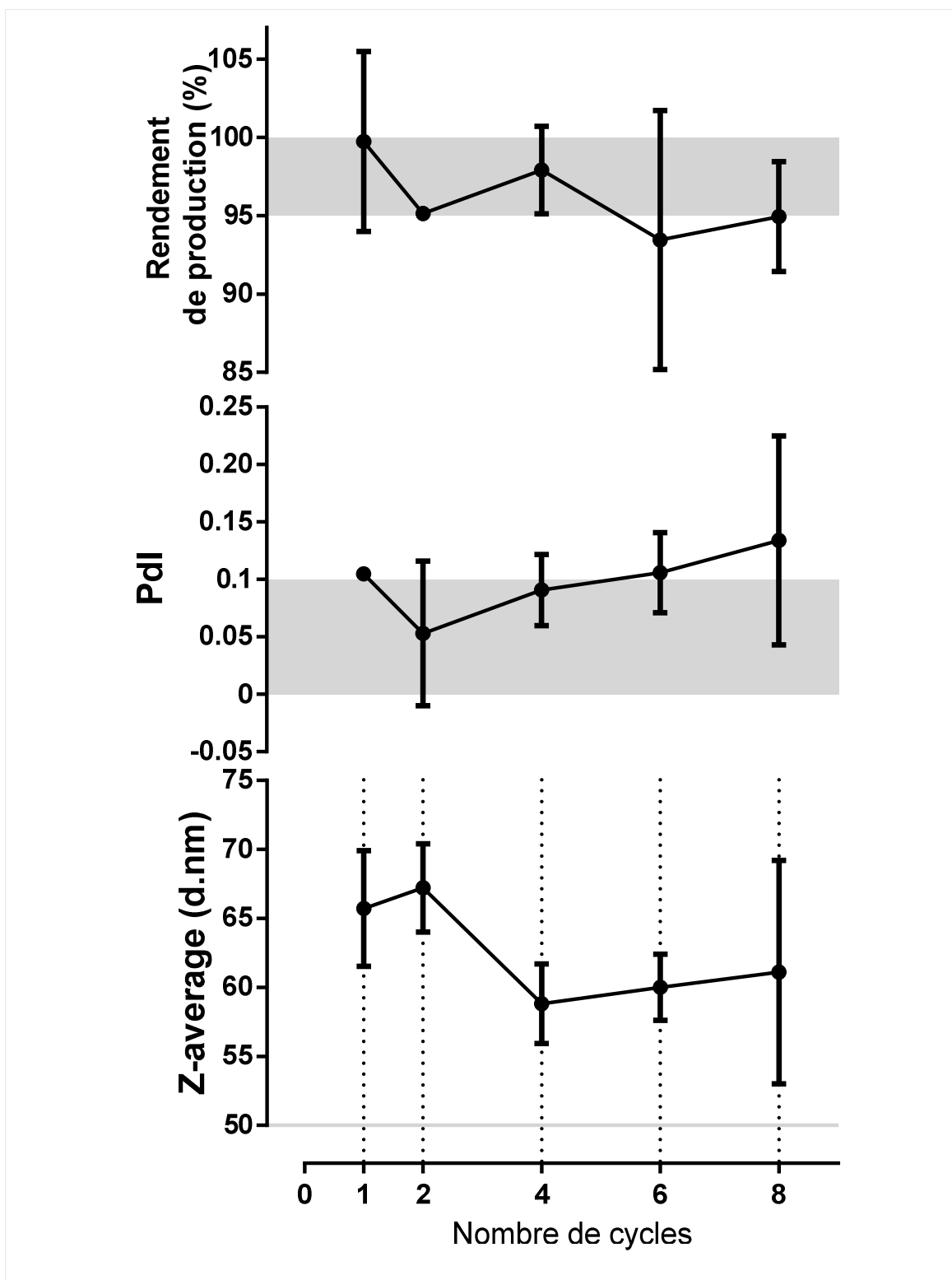


Figure IV-9 : Influence du nombre de cycle sur la distribution en taille des particules et le rendement de production
Aires et droite grisées : domaines des valeurs cibles

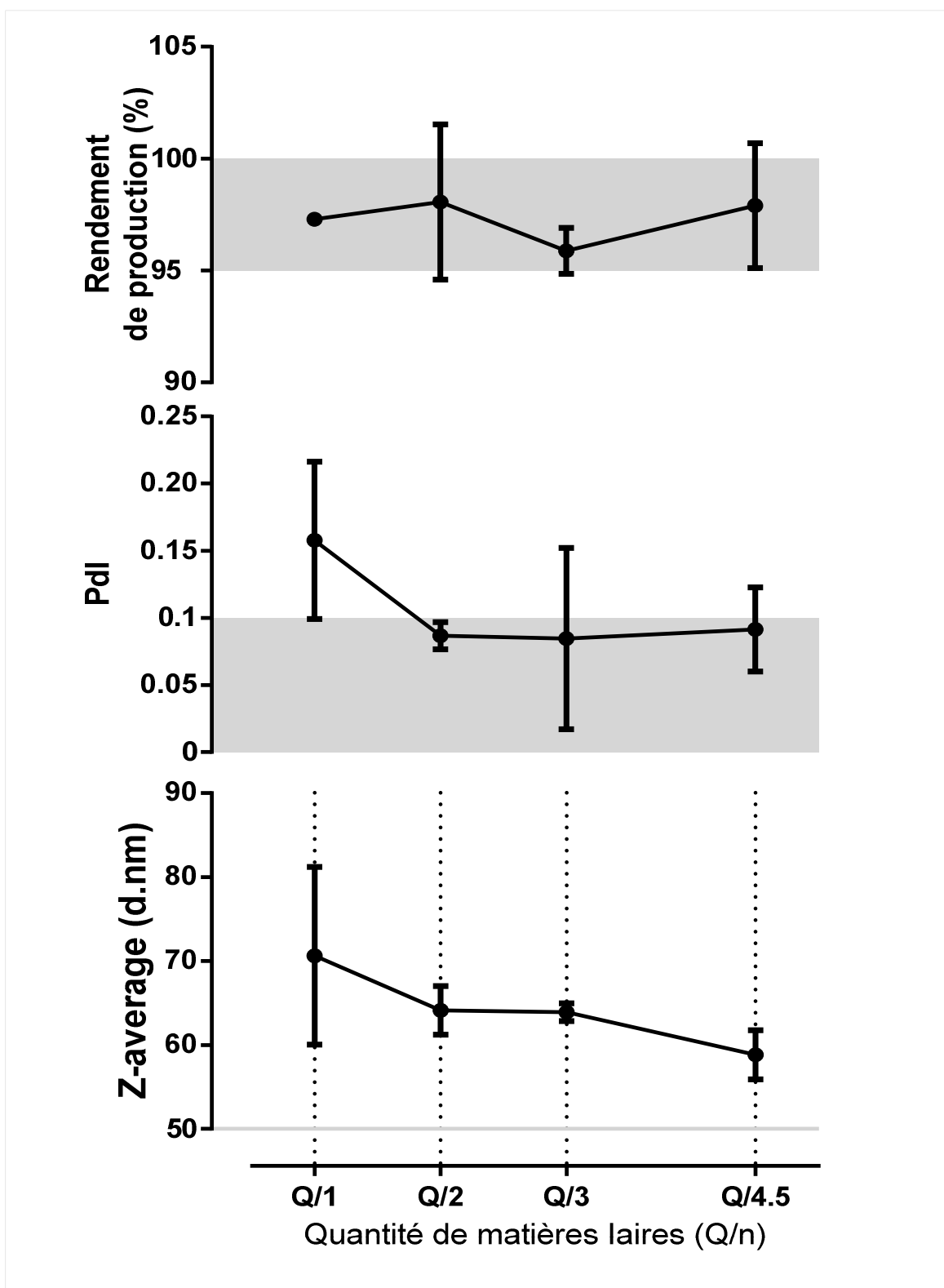


Figure IV-10 : Influence de la quantité de matières premières sur la distribution en taille des particules et le rendement de production (Q : quantité de matière 1ères disponible au maximum, n : facteur de division)

Aires et droite grisées : domaines des valeurs cibles

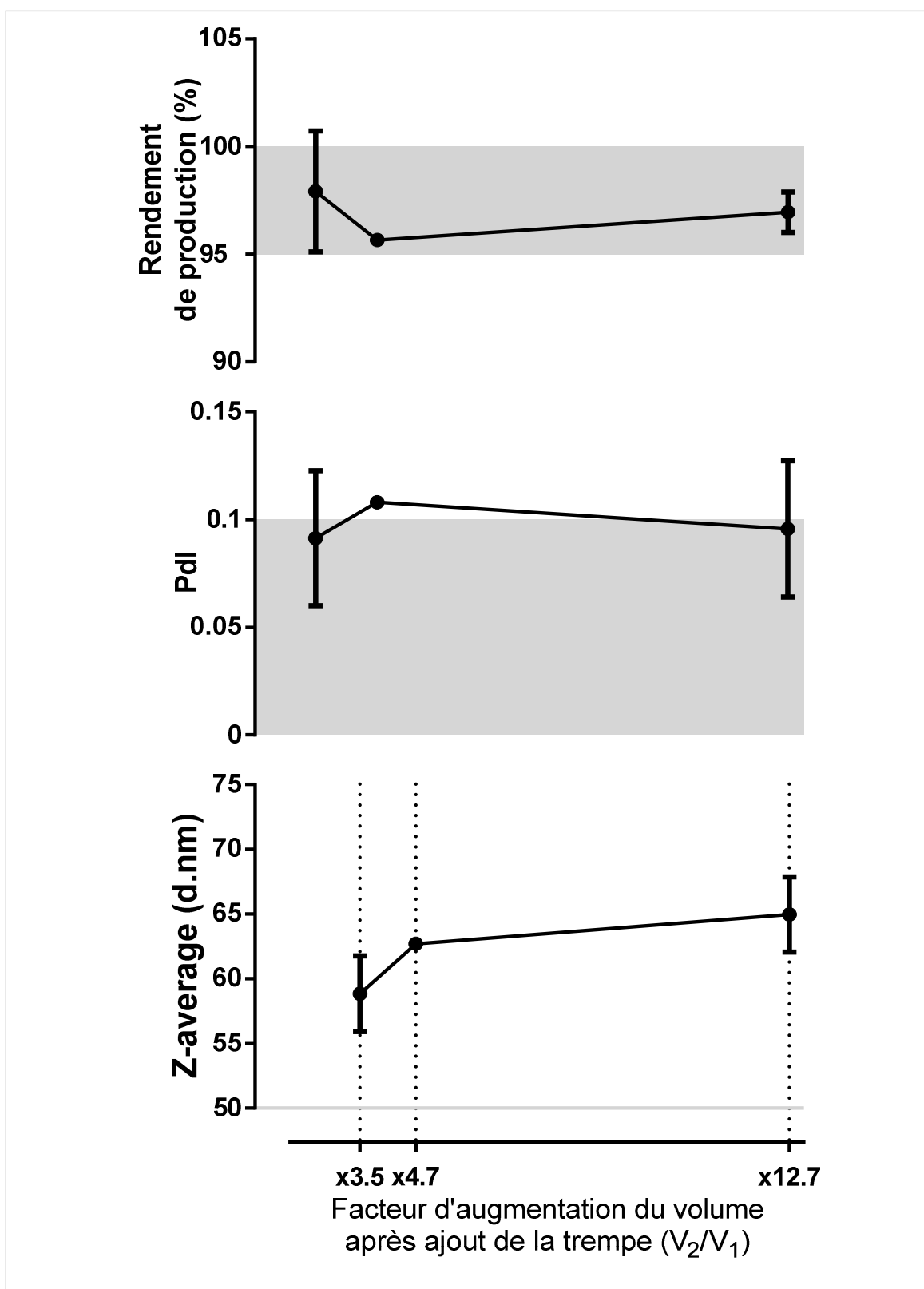


Figure IV-11 : Influence du volume sur la distribution en taille des particules et le rendement de production

Aires et droite grisées : domaines des valeurs cibles

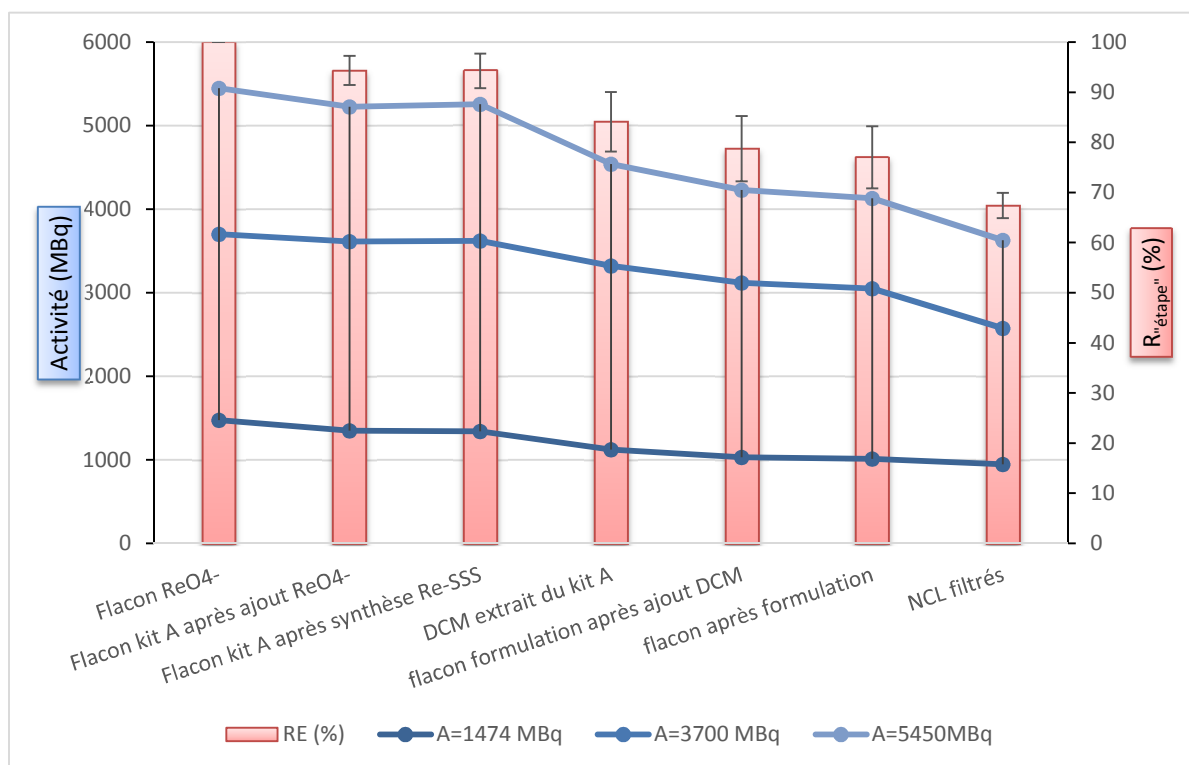
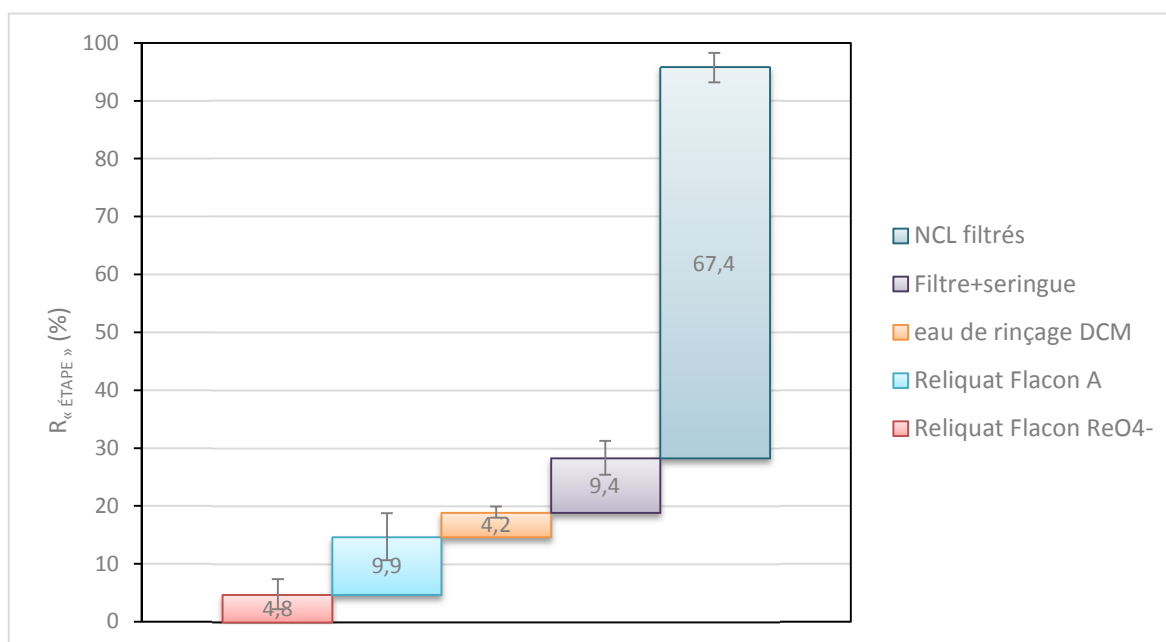
2) Production non automatisée des NCL chargées en rhénium-188

Figure IV-12 : Bilan de l'activité radioactive disponible et des $R_{\text{étape}}$ au cours de la production non automatisée de ^{188}Re -SSS-NCL

Pour une activité initiale comprise entre 1500 et 5500 MBq, le $R_{\text{étape}}$ est passé de 100 % à 78,7 % après ajout du dichlorométhane dans le flacon de formulation et à 67,4 % dans le produit final (900 à 3600 MBq).

Figure IV-13 : Bilan des R« étape » après productions non automatisées de ^{188}Re -SSS-NCL

La majorité de l'activité initiale a été retrouvée dans les mesures ($R_{\text{mesure}} = 95,7 \%$). Les pertes radioactives majeures identifiées ont été obtenues lors du transfert du flacon d'élution ($R_{\text{Reliquat Fl ReO4-}} = 4,8 \%$), de la récupération et du transfert du dichlorométhane après extraction du complexe radioactif ($R_{\text{Reliquat Fl A}} = 9,9 \%$), les étapes de rinçages ($R_{\text{eau de rinçage DCM}} = 4,2 \%$) et la filtration terminale ($R_{\text{filtre+seringue}} = 9,4 \%$).

La PRC moyenne du complexe de ^{188}Re -SSS étudié est de 65 %. Cette valeur dépasse les 95 % en comptant également l'activité présente au rapport frontal 0,6.

La taille des particules est $56 \pm 1 \text{ nm}$ (z-average) avec un PdI de $0,039 \pm 0,011$.

3) Automatisation de la production de NCL radioactives

a) Optimisation de l'extraction/purification du complexe Me-SSS

i. Optimisation de l'extraction/purification non automatisées

a. Extraction liquide / liquide : Labrafac® solvant alternatif au dichlorométhane

o *Labrafac® température ambiante*

Tableau 12 : Calcul du rendement d'extraction du complexe Re-SSS par Labrafac®

	FRACTION 1	FRACTION 2	FRACTION 3
A (MBQ) SER. LABRAFAC	3,5	10,5	15
A (MBQ) TOTALE LABRAFAC	8,75	26,25	37,5
A (MBQ) RESIDU FLACON	95	88	(non mesuré)
A (MBQ) TOTAL FLACON	103,75	114,25	102
RDT EXTRACTION (%)	8,4	23,0	37,0

Le rendement d'extraction moyen du ^{188}Re -SSS par le Labrafac était de 22,8 % avec un écart type de 14,3 %.

Dans la fraction 2, 2 ml de dichlorométhane ont été ajoutés pour visualiser l'extraction malgré la présence de Labrafac®, puis mise sous agitation orbitale, et l'activité de 0,35 ml de la phase dichlorométhane dans une seringue de 1 ml a été mesurée à l'activimètre : $A = 16,6 \text{ MBq}$ à 12h24, correspondant à une activité dans la totalité du volume de dichlorométhane de $16,6 / 0,35 \times 2 = 94,9 \text{ MBq}$. Le rendement d'extraction a été de $94,9 / 98,5 \times 100 = 96,3 \%$.

La PRC moyenne du ^{188}Re -SSS a été mesurée à $78,7 \% \pm 5,4 \%$ (cf annexe E). Le ReO_4^- (B) a une PRC de 100 %.

o *Dichlorométhane à température ambiante*Tableau 13 : Calcul du rendement d'extraction du complexe ^{188}Re -SSS par dichlorométhane

	FRACTION 5	FRACTION 6	FRACTION 7
A (MBQ) FL TOTAL	80,4 à 16h27	85,9 à 16h35	60,5 à 16h38
V DCM (ML) PRÉLEVÉ	0,2	0,18	0,2
A (MBQ) SER DCM	41,7 à 16h33	41,3 à 16h36	32,0 à 16h40
A (MBQ) TOTALE DCM	104,25 à 16h33	114,7 à 16h36	80 à 16h40
RDT EXTRACTION (%)	130	133	132

Le rendement d'extraction moyen par le dichlorométhane est supérieur à 100 % avec un écart-type de 1,5 %. Les valeurs de rendement supérieures à 100 % sont explicables par les incertitudes de mesure (volume, géométrie de comptage dans l'activimètre). La quasi-totalité, du ^{188}Re -SSS présent dans le flacon, a été extraite par le dichlorométhane.

La PRC moyenne a été mesurée à 71,0 % $\pm$ 5,1 % (Annexe F).

o *Influence de la température du Labrafac® sur l'extraction ^{99m}Tc*

Les résultats des études d'extraction à 50°C, 75°C et 100°C ont été regroupés dans la Figure IV-14.

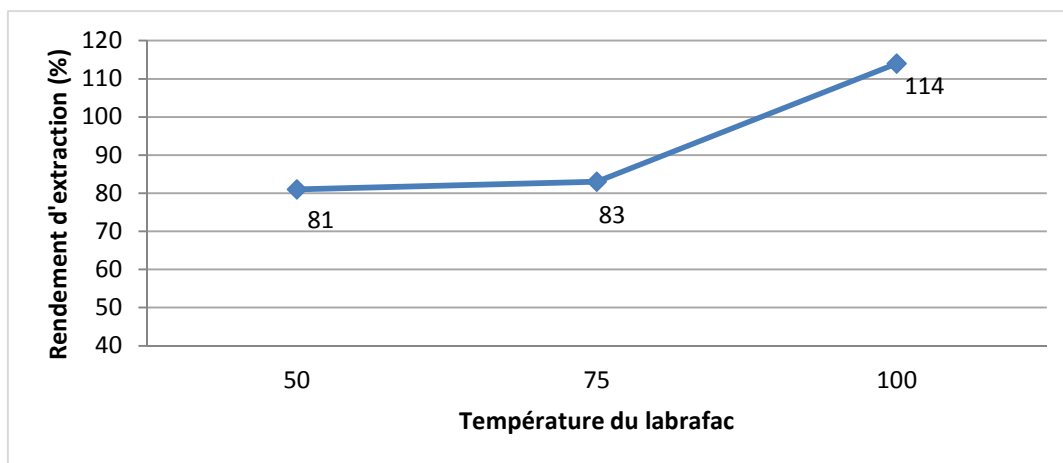


Figure IV-14 : Étude de l'influence du solvant sur le rendement d'extraction du complexe Tc-SSS par le Labrafac®

La PRC moyenne a été mesurée à 86,3 % avec un écart-type de 7,2 % (Annexe G).

o *Extraction du ^{188}Re -SSS par Labrafac® à 100°C*

Le rhénium-188 a été obtenu sous forme de perrhénate par élution d'un générateur $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (586 MBq à 10h02 dans 1,5 ml).

Tableau 14 : Calcul du rendement d'extraction du complexe ^{188}Re -SSS par Labrafac à 100°C

	FRACTION 1	FRACTION 2	FRACTION 3
A (MBQ) FL TOTAL	Flacon cassé	96 à 13h54	94
A (MBQ) SER. LABRAFAC		8 dans 0,1 ml	47,6 dans 0,2 ml
A (MBQ) TOTALE LABRAFAC		40	119
RDT EXTRACTION %		42	127

Le rendement moyen est de 84,5 % avec un écart type de 60,1 %.

b. Extraction/purification non automatisée en phase solide sur colonne Sep-Pak®

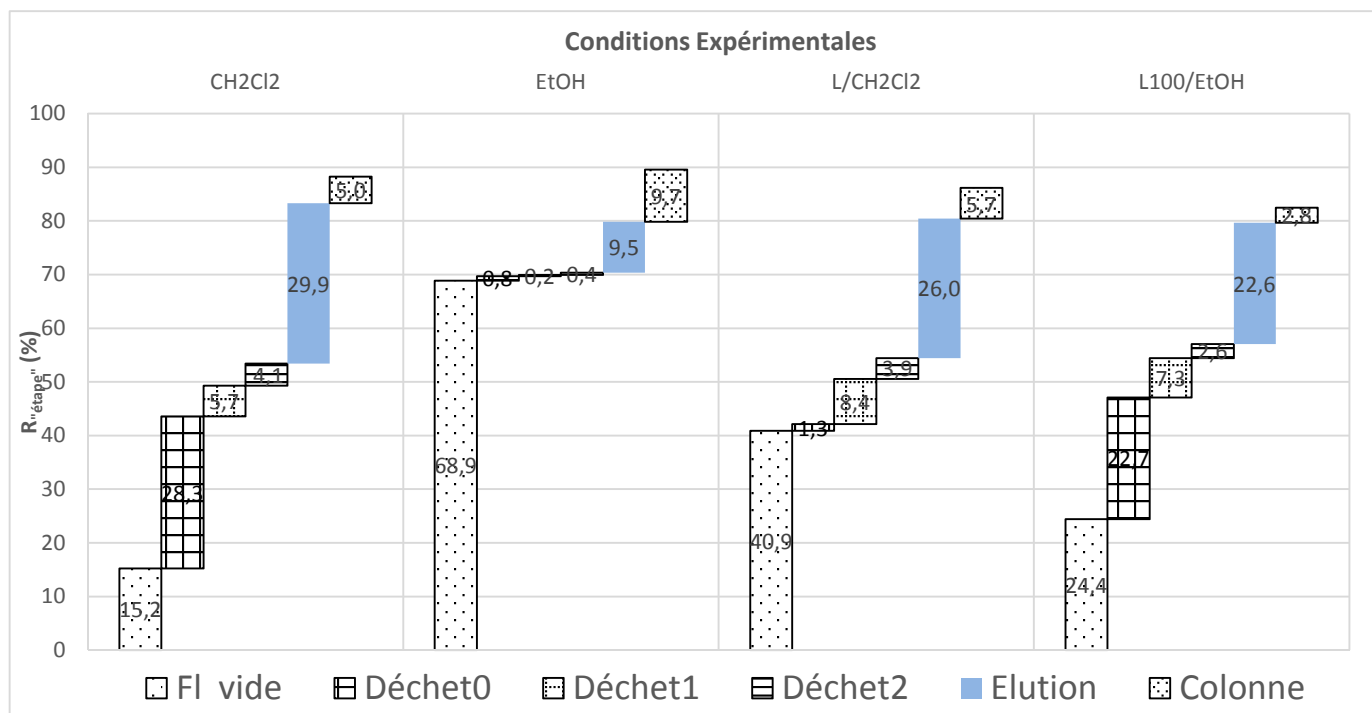


Figure IV-15 : Représentation graphique des activités radioactives disponibles et perdues, indiquées par le Rendement d'étape $R_{\text{étape}}^*$ (%), au cours de la purification du complexe $^{99m}\text{Tc-SSS}$

Les valeurs de R_{mesure} ont été comprises entre 80 et 90 %. En fin d'extraction/purification le $R_{\text{Élution}}$, témoin de l'ensemble du processus, a varié entre 9,5 % pour la condition expérimentale EtOH et 29,9 % pour CH₂Cl₂.

Le $R_{\text{Fl vide}}$, reflétant le rendement d'extraction, a été meilleur avec le dichlorométhane (15,2 % de perte) qu'avec le Labrafac® à 100°C (24,4 % de perte), et le Labrafac® à température ambiante (40,9 % de perte) mais également très supérieur qu'avec l'éthanol (68,9 % de perte). Les pertes radioactives dans les déchets par élution du complexe dès le dépôt ont été importantes avec le dichlorométhane ($R_{\text{Déchet0}} = 28,3$ %) et le Labrafac® à 100°C ($R_{\text{Déchet0}} = 22,7$ %), et faibles avec le Labrafac® à température ambiante ($R_{\text{Déchet0}} = 1,3$ %) et l'éthanol ($R_{\text{Déchet0}} = 0,8$ %). Les pertes en cours de rinçage ont été inférieures à $R_{\text{Déchet1}} + R_{\text{Déchet2}} = 15$ %.

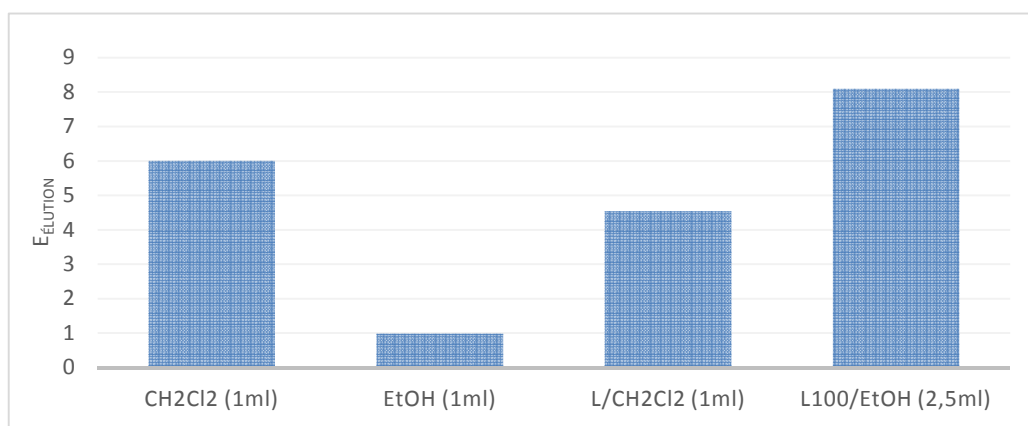


Figure IV-16 : Représentation graphique de l'influence de la nature et du volume de solvant d'élution sur la capacité d'entraînement du complexe ^{99m}Tc -SSS, indiqué par l'efficacité d'élution $E_{\text{Élution}}$, au travers d'une colonne Sep-pak® C8.

Concernant l'étape de récupération du complexe, avec 1 ml d'éluant, une perte radioactive minimale dans la colonne a été constatée après élution par le dichlorométhane ($R_{\text{colonne}} = 5$ et $5,7\%$, $E_{\text{Élution}} = 6$ et $4,5$). Cette perte est doublée lors de l'élution par 1 ml d'éthanol ($R_{\text{colonne}} = 9,7\%$, $E_{\text{Élution}} = 0,98$). L'augmentation du volume d'élution par éthanol (2,5 ml) a permis de minimiser ces pertes ($R_{\text{colonne}} = 2,8\%$, $E_{\text{Élution}} = 8,1$).

ii. Automatisation de l'extraction/purification

a. Module TADDEO®, Comecer®

Tableau 15 : Bilan des activités disponibles dans le flacon produit et présentes dans l'automate après production

	ACTIVITÉ (MBq)
ACTIVITÉ INITIALE DE ReO_4^-	169
FLACON PRODUIT	90
FLACON A	4
RÉACTEUR	27
COLONNE	13

Le rendement d'extraction/purification a été calculé à 53% .

Parmi les pertes en production (79 MBq), les 44 MBq non mesurés sont piégés soit dans les flaconnages de transfert ou réactionnels, soit dans les tubulures et valves de l'automate.

b. Module SynChrom®, Raytest®

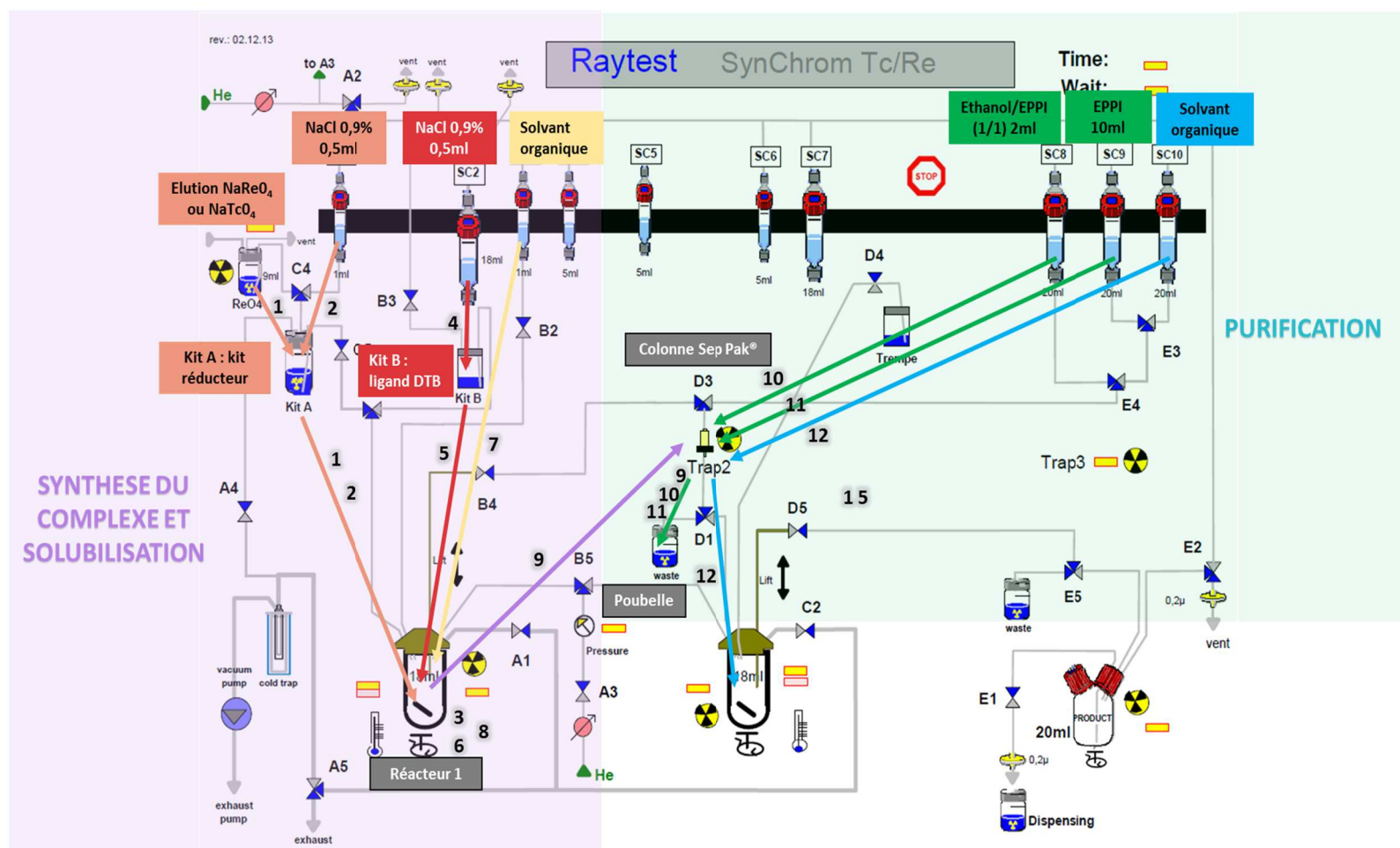


Figure IV-17 : Schéma sur organigramme de l'automate SynChrom® R&D, des étapes de synthèse, de solubilisation et de purification sur colonne du complexe $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS

Le schéma de synthèse est présenté en page précédente, cf Figure IV-17.

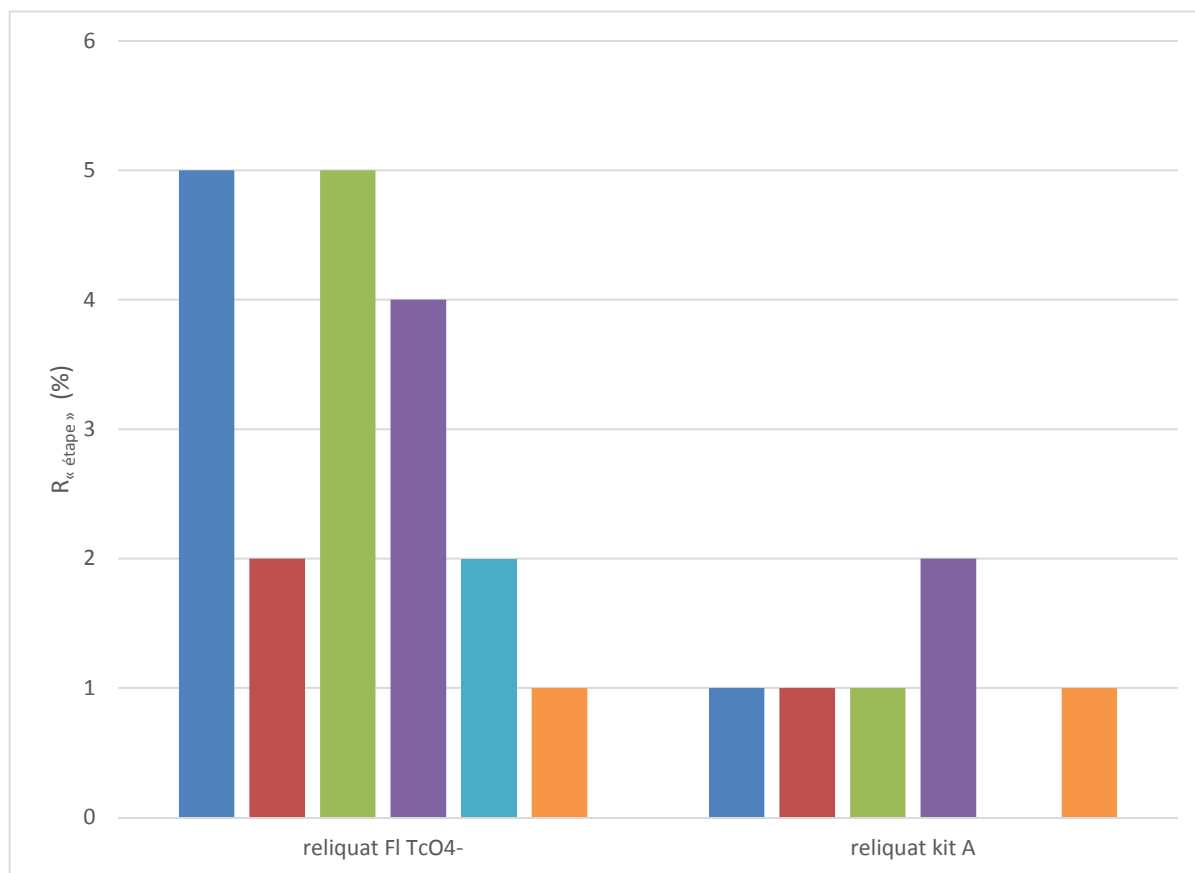


Figure IV-18 : Suivi des reliquats de radioactivité, par le $R_{\text{« étape »}}$ (%), de chaque production automatisée réalisée sur le flacon d'élution du technétium ^{99m}Tc et sur le flacon du kit A

Les pertes radioactives dans les reliquats de flacons FI TcO_4^- et kit A nécessaires à la synthèse de complexe ^{99m}Tc -SSS ont été assez faibles ($R_{\text{« étape »}}$ inférieur à 5 %). Les reliquats du flacon d'élution ont présenté une radioactivité supérieure à celle du flacon kit A.

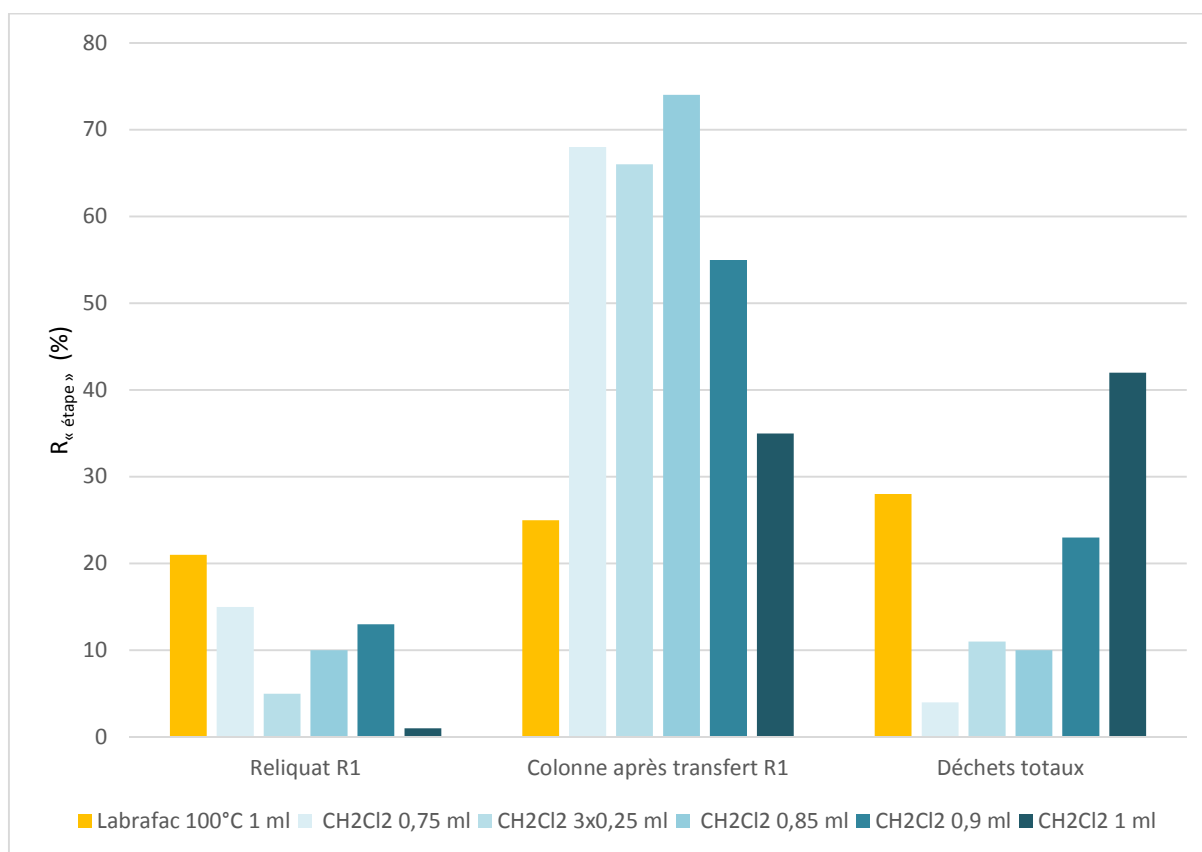


Figure IV-19 : Influence de la nature et du volume de solvant d'extraction sur la capacité de rétention du complexe ^{99m}Tc -SSS par une colonne Sep-Pak® C8 à l'aide de l'automate. $R_{\text{Reliquat R1}}$ est proportionnel aux pertes de complexe non extrait. $R_{\text{Colonne après transfert R1}}$ et $R_{\text{Déchets totaux}}$ sont respectivement proportionnel et inversement proportionnel à la rétention du complexe sur la colonne.

Les extractions avec 0,5, 0,75 ml de Labrafac® à 100°C n'ont pas permis la réalisation complète de l'étude. Ces deux conditions ont entraîné une obturation de la colonne Sep-Pak®, rendant impossible le transfert du contenu du réacteur 1 contenant le complexe vers la colonne.

L'utilisation de 1 ml de Labrafac® à 100°C comparé à 1 ml de CH₂Cl₂ a moins bien extrait le complexe ($R_{\text{Reliquat R1}} = 12\%$ vs 1%), a entraîné un niveau de perte dans la poubelle inférieur ($R_{\text{Déchets totaux}} = 28\%$ vs 42%) mais cependant assez important, et a déposé moins de radioactivité sur la colonne ($R_{\text{Colonne après transfert R1}} = 25\%$ vs 35%).

Avec le dichlorométhane la perte radioactive du complexe non extrait dans le R1 a été réduite par un volume plus grand (1ml) ou un triple rinçage (3 x 0,25 ml) ($R_{\text{Reliquat R1}} = 1$

% et 5 %). Cependant, l'augmentation du volume de CH_2Cl_2 a majoré les pertes aux déchets par élution du complexe au travers de la colonne ($R_{\text{Déchets totaux}} = 42\%$ pour 1 ml). Le meilleur compromis en termes d'activité extraite et déposée sur la colonne le plus important a été réalisé avec 0,85 ml de dichlorométhane ($R_{\text{Colonne après transfert R1}} = 74\%$, $R_{\text{Reliquat R1}} = 10\%$, $R_{\text{Déchets totaux}} = 10\%$)

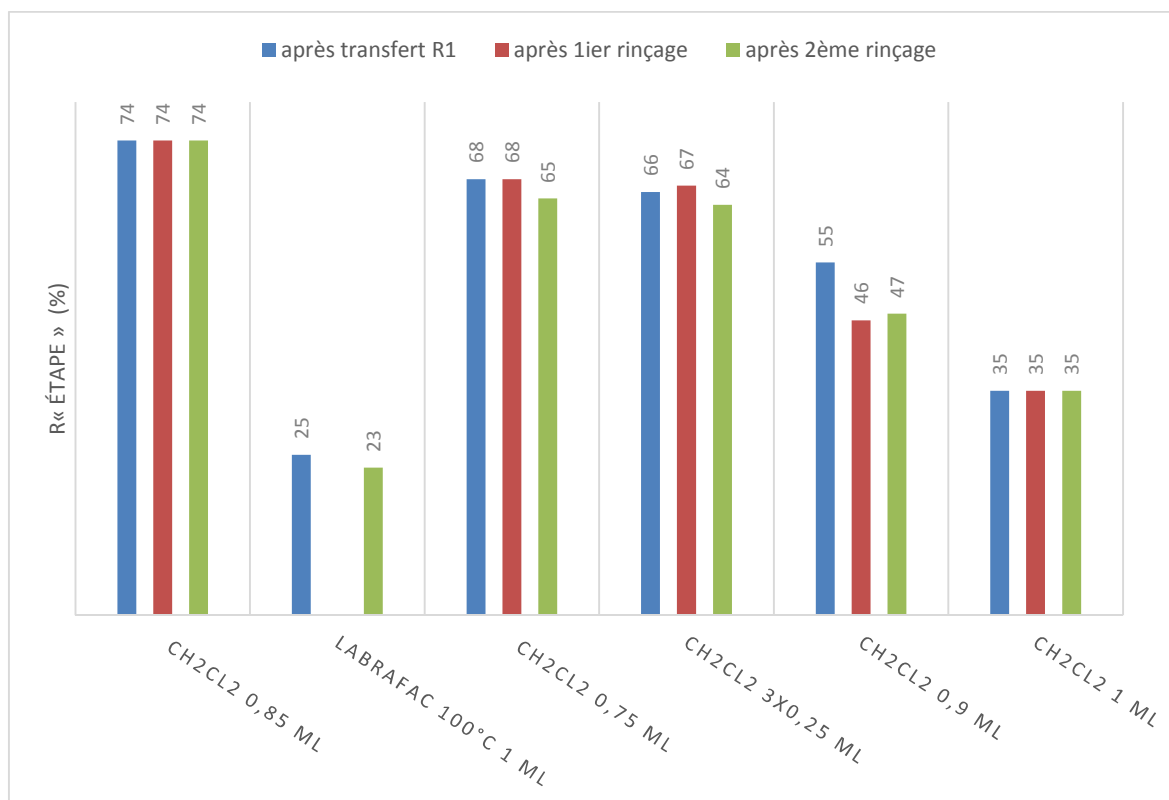


Figure IV-20 : Suivi des pertes en cours de rinçages (1^{er} et 2^{ème}) de la colonne Sep-Pak® avec l'automate. Radioactivité mesurée à l'aide d'un activimètre sur la colonne Sep-Pak® et normalisées en R« étape » (%). Mesures réalisées après dépôt ($R_{\text{Après transfert R1}}$, et après chaque rinçage) et après rinçages ($R_{\text{Après 1er rinçage}}$ et $R_{\text{Après 2ème rinçage}}$)

Sur les six conditions expérimentales, une a présenté une diminution du R "étape" (= $R_{\text{Après transfert R1}} - R_{\text{Après 2ème rinçage}}$) de 8 % lors des rinçages, trois ont présenté une diminution inférieure à 3 %, et deux n'ont présenté aucune variation.

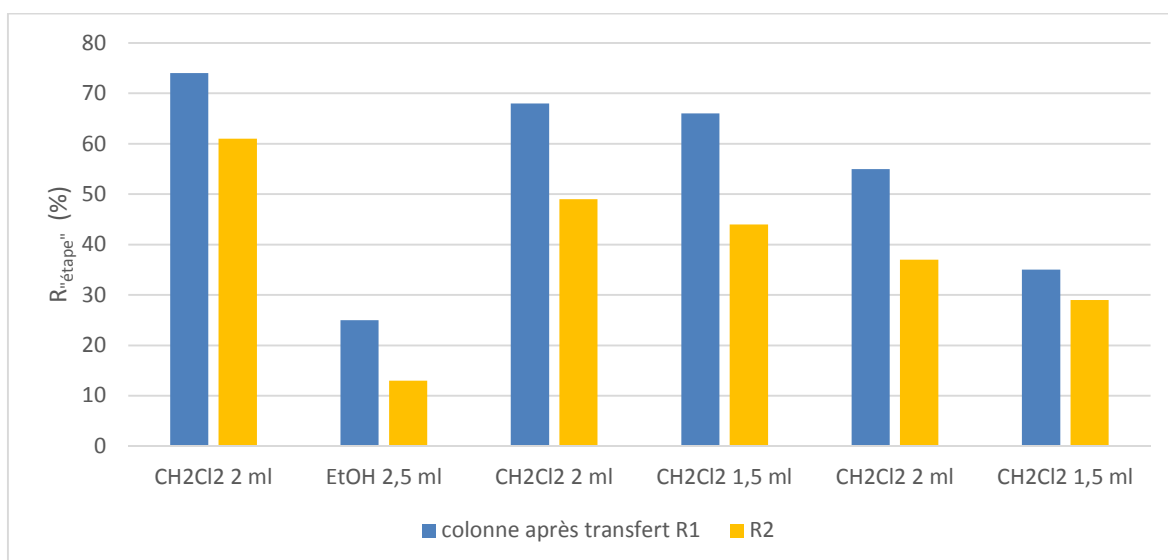


Figure IV-22 : Influence de la nature et du volume du solvant d'élution sur le transfert du complexe vers le réacteur 2. Radioactivité mesurée à l'aide d'un activimètre et normalisée en $R_{\text{étape}}$ (%). Mesures réalisées sur la colonne Sep-Pak® après dépôt du complexe ($R_{\text{colonne après transfert R1}}$) et sur le réacteur 2 après élution de la colonne (R_{R2}).

Le R_{R2} représentatif du rendement d'extraction/purification automatisée a été en moyenne de 40 %. Une diminution de $R_{\text{étape}}$ ($= R_{\text{colonne après transfert R1}} - R_{R2}$) de 26 % a été observée en moyenne avec 2 ml de dichlorométhane, et de 27,5 % avec 1,5 ml alors qu'une diminution de 48 % a été observée avec 2,5 ml d'éthanol.

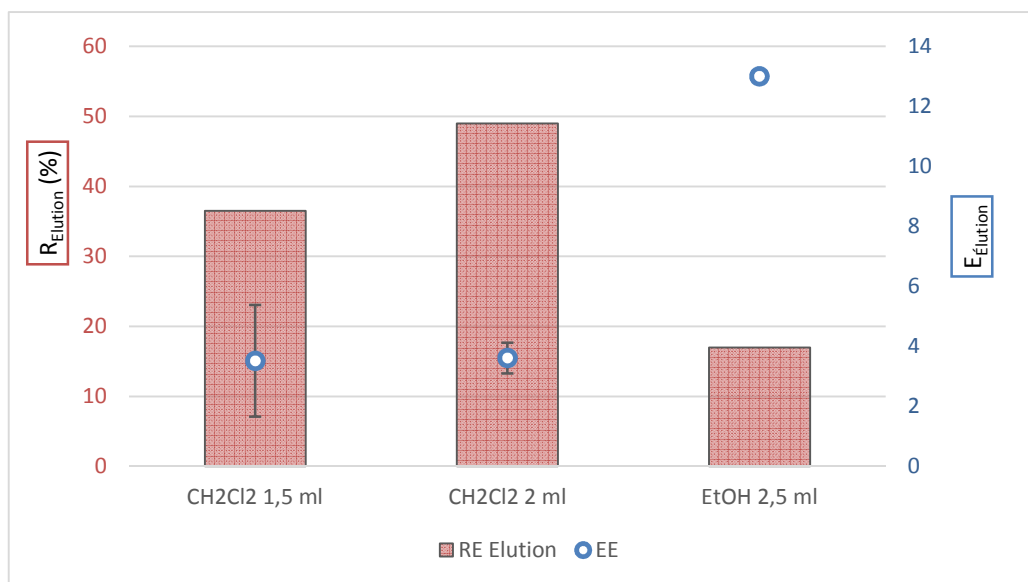


Figure IV-21 : Influence de la nature et du volume de solvant d'élution au travers d'une colonne Sep-Pak® C8 sur le RE et EEI

L'efficacité d'élution (EEI) des 2,5 ml d'éthanol a été très supérieure (multiplié par 3) aux $E_{\text{élution}}$ du dichlorométhane à volume inférieur. Les $R_{\text{élution}}$ avec le dichlorométhane sont très supérieurs (multiplié par 2 à 3) qu'avec l'éthanol.

b) Production automatisée de ^{99m}Tc -SSS-NCL

Nombre d'atome radioactif rapporté au nombre de NCL par production

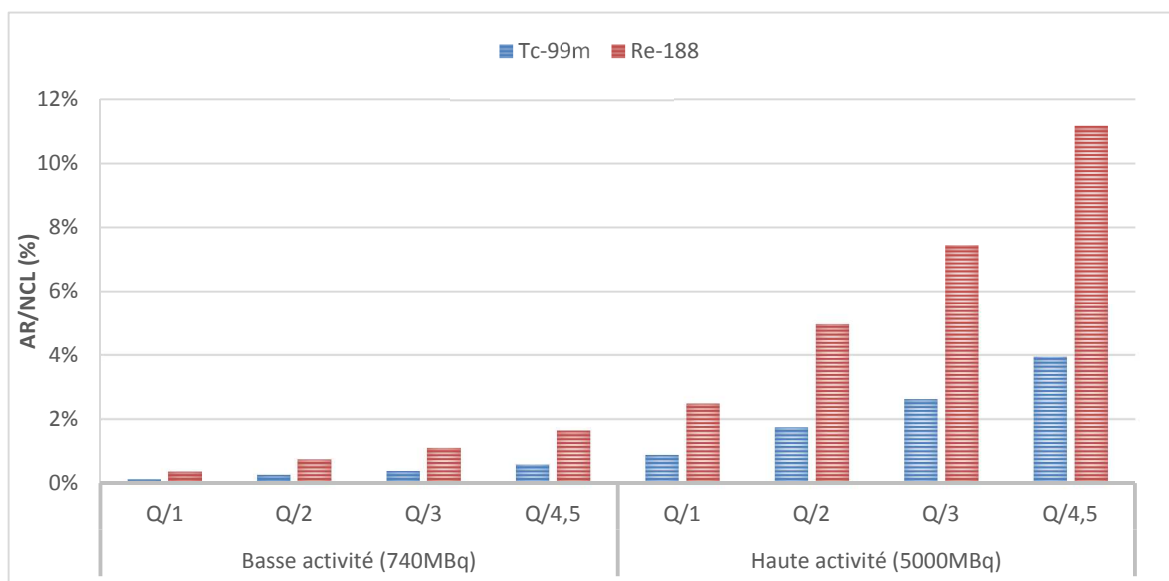


Figure IV-23 : Évolution du rapport AR/NCL nombre d'atomes radioactifs rapporté au nombre de NCL en fonction des quantités de matières premières utilisées pour la formulation et de l'activité radioactive disponible

Les détails du calcul du nombre de particules sont présentés en tableaux 16, 17 et 18, page suivante. Le rapport AR/NCL (nombre d'atome radioactif divisé par nombre de particules formulées) a été inférieur à 12 %, pour toutes les conditions testées (cf Figure IV-23). Ceci signifie que sur 100 particules, 12 radionucléides sont encapsulés. Pour les basses activités AR/NCL a varié entre 0,1 % et 1,7 %. Pour les fortes activités AR/NCL a varié entre 0,9 % et 11,2 %. La quantité de matières premières Q/4,5 ayant été choisie dans le chapitre IV. B. 1), le rapport AR/NCL a été compris entre 0,6 % et 3,9 % pour le technétium-99m, et entre 1,6 % et 11,1 % pour le rhénium-188.

IV. Développement d'une synthèse automatisée de NCL chargées en rhénium

Tableau 16 : Calcul du nombre de NCL par ml à partir du diamètre des particules mesuré par DLS

<i>Formulation NCL type</i>	<i>Diamètre moyen (z-average) [nm]</i>	<i>Rayon d'une NCL [nm]</i>	<i>Volume d'une NCL [x10³ nm³]</i>	<i>Nombre de NCL/ ml</i>
	58,8	29,4	106,45	9,39441E+15

Tableau 17 : Données de densité des différents composants des NCL

	<i>Labrafac®</i>	<i>Solutol®</i>		<i>Lipoïd®</i>		<i>NaCl</i>	<i>Eau</i>
		PEG (30 %)	PEG-HS (70 %)	PE (10 %)	PC (70 %)		
<i>Proportion relative</i>	20,6	16,9		1,5		1,8	59,2
<i>Densité [g.ml⁻¹]</i>	0,946	1	1	0,97	0,97	-	-

Tableau 18 : Calcul du nombre de NCL présentes selon les différentes formulations

	<i>Masse (g)</i>								<i>Volume (ml)</i>				
	Labrafac®	Solutol®	Lipoïd®	NaCl	Eau	Total sans trempe	Trempe	Total avec trempe	Labrafac®	Solutol®	Lipoïd®	Vol NCL Total	Nb NCL par formulation
<i>Q/1</i>	1,028	0,846	0,075	0,089	2,962	5,000	12,500	17,500	0,972	0,846	0,073	1,891	1,77671E+16
<i>Q/2</i>	0,514	0,423	0,038	0,045	1,481	2,500	6,250	8,750	0,486	0,423	0,036	0,946	8,88353E+15
<i>Q/3</i>	0,343	0,282	0,025	0,030	0,987	1,667	4,167	5,833	0,324	0,282	0,024	0,630	5,92235E+15
<i>Q/4,5</i>	0,228	0,188	0,017	0,020	0,658	1,111	2,778	3,889	0,216	0,188	0,016	0,420	3,94824E+15

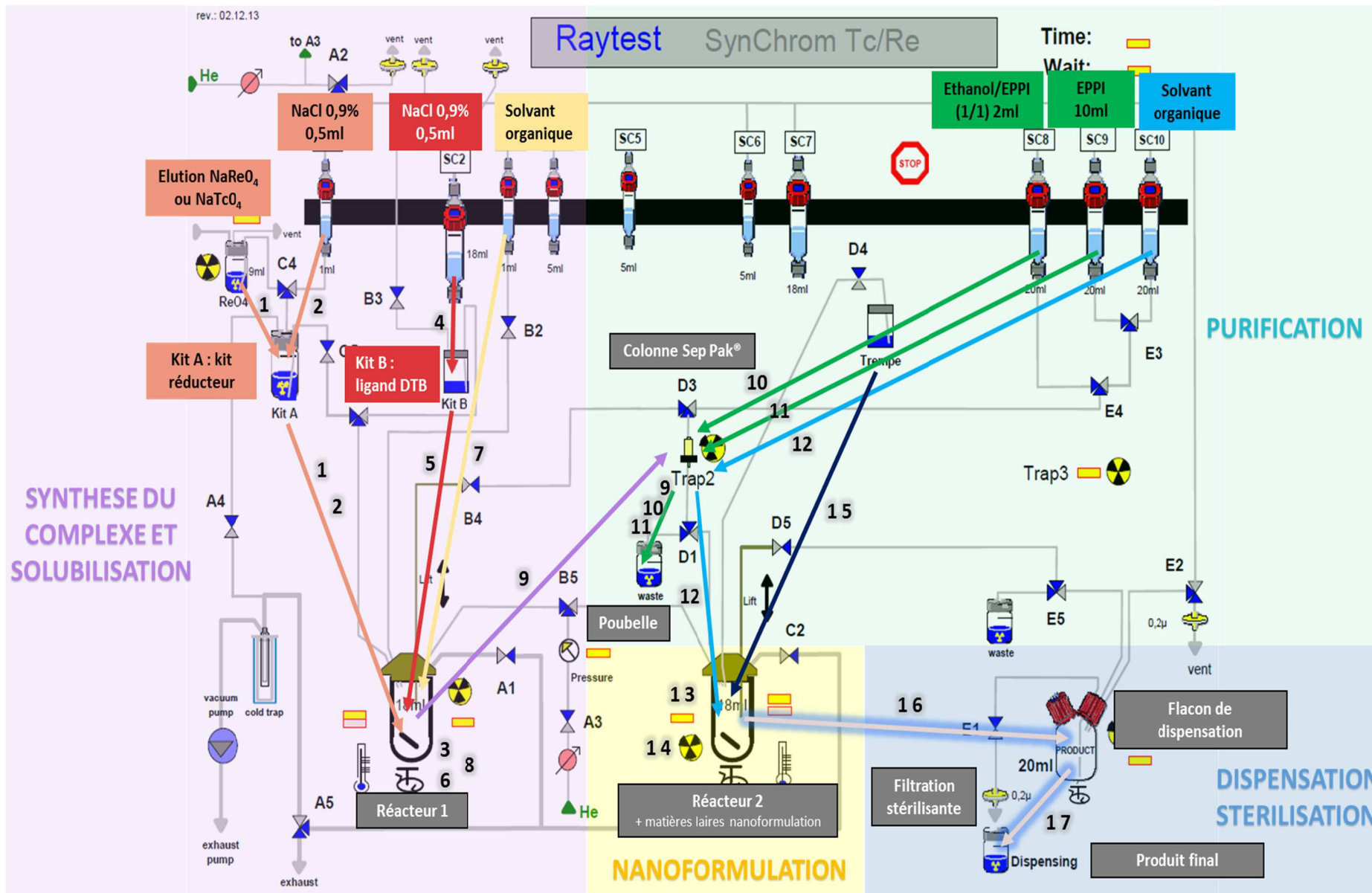


Figure IV-24 : Schéma sur organigramme de l'automate SynChrom® R&D, des étapes de production de Me-SSS-NCL ;
(la dernière version du programme représente 144 lignes de commandes cf Annexe B)

Le schéma de production utilisé est représenté en page précédente, (cf Figure IV-24).

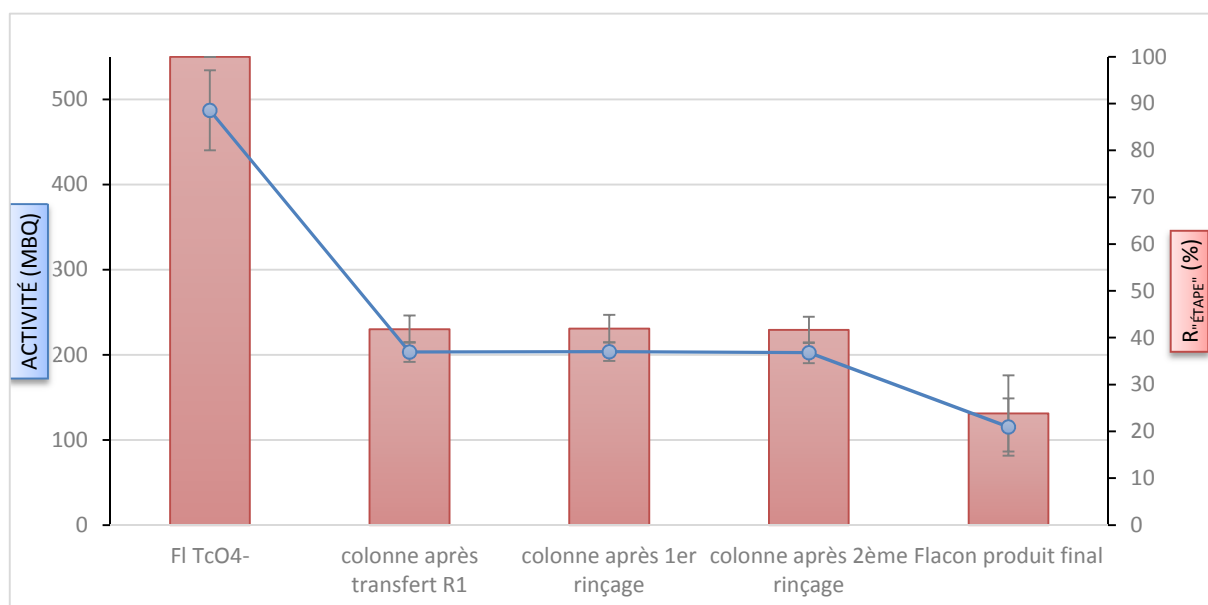


Figure IV-25 : Bilan des pertes radioactives et des R« étape » après production

Pour une activité initiale moyenne de 487 MBq, le R« étape » est passé de 100 % à 42 % $\pm$ 2,9 % après transfert sur la colonne et à 24 % $\pm$ 8,1 % dans le produit final (115 MBq).

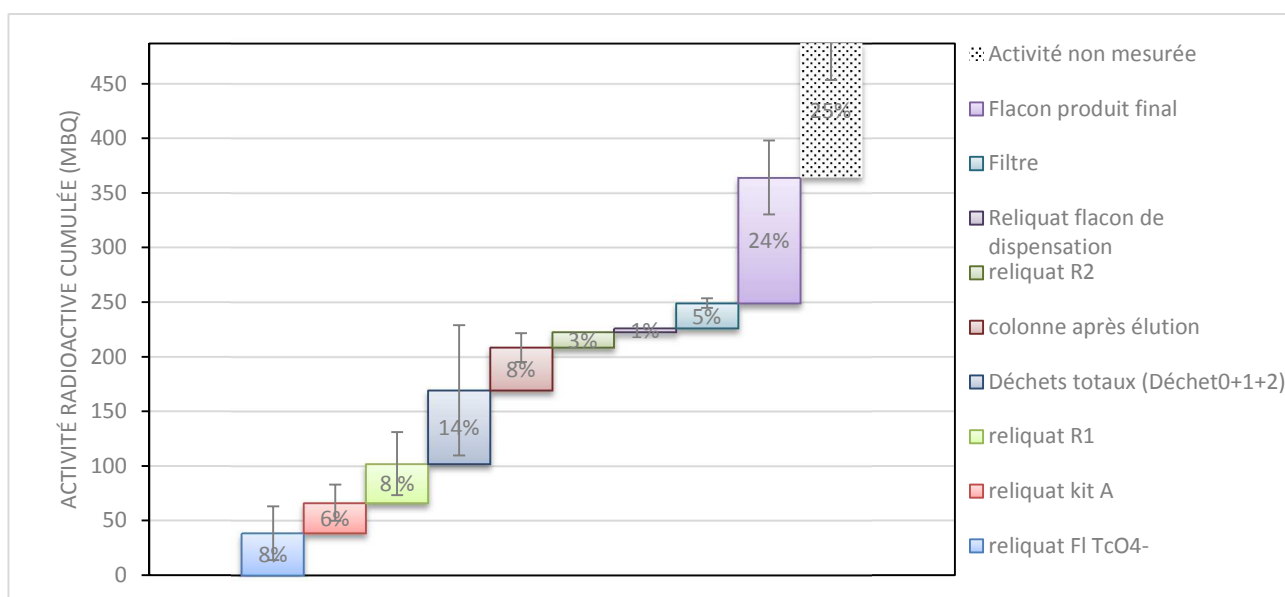


Figure IV-26 : Activités disponibles et RE de production

Le R_{mesure} a été en moyenne à 76 % $\pm$ 11 %. Le $R_{\text{flacon produit final}}$ a été de 24 % $\pm$ 8 %. La totalité des pertes radioactives mesurées ont représenté 52 % $\pm$ 11 % de l'activité initiale dont 22 % $\pm$ 11 % ont été mesurés dans les pertes associées à la purification

($R_{\text{Déchets totaux}} + R_{\text{Colonne après élution}}$), et $21 \% \pm 0 \%$ dans les reliquats de synthèse du complexe ($R_{\text{Reliquat FI TCO4-}}$, $R_{\text{Reliquat kit A}}$, $R_{\text{Reliquat R1}}$).

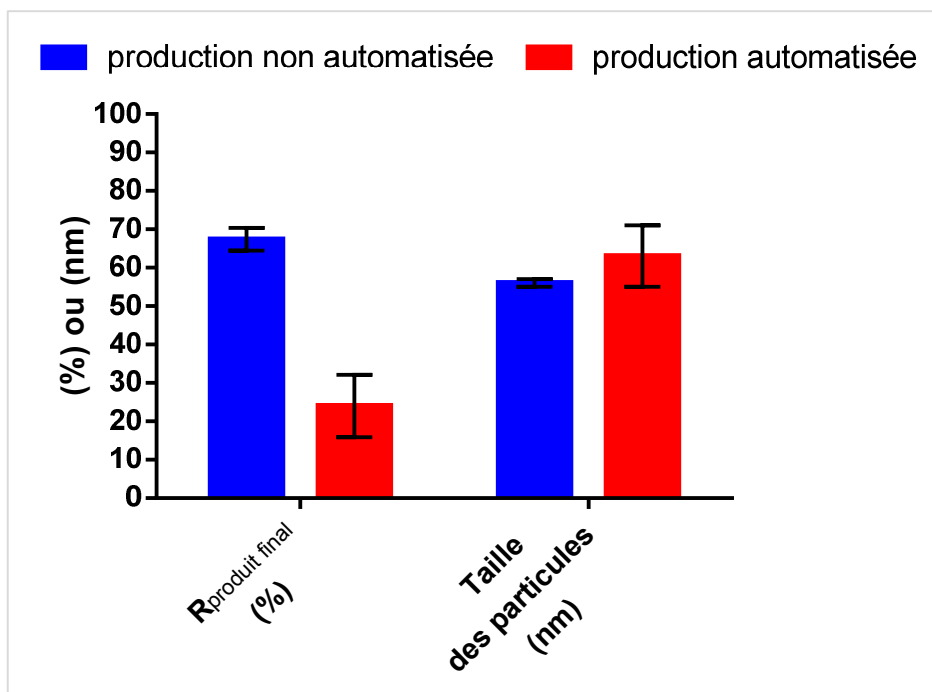


Figure IV-27 : Comparaison de la production non automatisée de ^{188}Re -SSS-NCL à la production automatisée de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS

La production non automatisée a présenté un rendement de production 67 % supérieur à la production automatisée, 24 %. La taille des particules obtenues a été comparable (56 nm vs 63 nm).



C. Discussion

1) Automatisation de la production de NCL blanches

Il a été possible de transposer les étapes de synthèses manuelles des NCL dans un processus automatisé bien que la première formulation automatisée (P1) n'ait pas produit de nanoparticules (diamètre : $2108 \text{ nm} \pm 705 \text{ nm}$ de diamètre avec une population particulière de taille hétérogène $\text{PdI} = 0,406 \pm 0,322$).

Au cours de la phase 1 d'optimisation portant sur les paramètres de température, des cycles, du nombre des cycles (passage de 2 à 5 cycles) et du mode de transfert, du volume de trempe, une amélioration considérable de la taille et de la dispersion des particules a été constatée. Ainsi, une production de nanocapsules lipidiques de diamètre proche de 50 nm et dont la distribution s'est concentrée autour de la moyenne au fur et mesure des optimisations a été constatée. Cependant la taille des particules restent toujours supérieure à celle ciblée ($69,92 \pm 0,87 \text{ nm}$ contre 50 nm de diamètre décrite par la méthode manuelle). Cela peut s'expliquer par une limitation technique de l'automate lié à la qualité de l'agitation magnétique dans le réacteur 2 pouvant entraîner une mauvaise homogénéisation du volume réactionnel. En effet, d'une part, un volume trop faible ne permet pas de récupérer correctement les matières premières fixées sur les parois; d'autre part, l'agitation magnétique à vitesse non paramétrable, ne permet pas une homogénéisation efficace pour des volumes trop élevés (17 ml). La variation des proportions entre les différentes matières premières entraîne une variation de la taille des nanocapsules, jusqu'à, dans des conditions extrêmes, l'absence de formation des nanoparticules. Enfin, une mauvaise homogénéisation ne permet pas d'atteindre la monodispersion en taille des particules. Le volume final retenu au cours de cette première phase est actuellement de 8,5 ml. De même, bien que la distribution en taille se soit améliorée au cours des productions, celle-ci est trop large autour de la valeur moyenne ($\text{PdI} > 0,1$). Au cours de ces études la filtration terminale (filtre stérilisant $0,22 \mu\text{m}$) n'a pas été appliquée. Cette opération normalement utilisée en formulation classique

des nanocapsules, permet également d'éliminer les particules de diamètre supérieur à 220 nm.

Dans la deuxième phase d'optimisation, des conditions optimales de formulation de NCL « blanches » ont été validées avec les facteurs d'influences testés. En effet sous l'influence de ces différents facteurs, des tendances ont été constatées. Concernant le nombre de cycles d'inversion de phases, le rendement de production reste acceptable quel que soit le nombre de cycles testés mais est supérieur avec 1, 2 et 4 cycles. L'augmentation du nombre de cycles augmente le nombre de chauffage/refroidissement et la durée de synthèse (8-10 min par cycle) ce qui favorise l'évaporation de l'eau (chauffage à 90°C) et réduit le rendement de production. 4 cycles représentent le meilleur compromis taille /rendement de production. La variation de la quantité de matières premières ne semble pas modifier le rendement de production. La diminution de la quantité de matières premières améliore la taille et la distribution des particules. L'efficacité supérieure de l'homogénéisation d'un petit volume constitue probablement une explication à ce phénomène. La quantité Q/4,5 est donc retenue. Enfin, l'augmentation du volume de trempe n'a pas un effet favorable ni sur la taille des particules ni sur le rendement de production. Donc le plus faible volume est retenu, à savoir 2,8 ml ($V_2/V_1=3,5$), correspondant à une proportion classiquement décrite dans les protocoles opératoires du laboratoire.

En conclusion, la formulation des particules blanches optimales a été réalisée dans les conditions suivantes :

- 4 cycles d'inversions de phases,
- une quantité de matières premières correspondant à Q/4,5,
- et 2,8 ml de volume de trempe (soit $V_2/V_1=3,5$).

Dans ces conditions optimales réalisées en triplicate, le z-average moyen des particules est de 58,8 nm +/- sd = 2,9 nm avec une distribution monocentrique (PdI=0,09 +/- sd = 0,03) et le rendement de production est de 97,9 % +/- sd = 2,8 %.

Il a été important de comparer le procédé automatisé au procédé manuel en termes de taille puisqu'il semble qu'une variation de taille d'une particule peut influencer sur le mécanisme de captation cellulaire, la toxicité, et la distribution in vivo [101]–[103]. Cependant, il est peu probable qu'une faible variation de l'ordre de la dizaine de nanomètre sur la taille de particules ait une influence notable sur ces aspects.

2) Automatisation de la production de NCL radioactives

L'exactitude de la mesure de radioactivité par l'activimètre a pu être biaisée en cas de géométrie de comptage non respectée. Ceci explique dans une certaine mesure les valeurs de rendement d'extraction supérieur à 100 % et de R_{mesure} inférieur à 100 % qui ont été retrouvées dans les études suivantes : études d'extraction liquide/liquide (L/L).

o *Labrafac® solvant alternatif au dichlorométhane pour l'extraction L/L*

Au cours de l'étape de synthèse, la formation du complexe Me-SSS très lipophile et insoluble en milieu aqueux se caractérise par une précipitation dans le milieu réactionnel. Une extraction de ce précipité, ainsi qu'une purification doivent être réalisées pour permettre son intégration dans le cœur huileux des NCL. La purification a pour but de retirer toutes autres espèces chimiques. Parmi les impuretés, peuvent être présents les réactifs de la synthèse présents en excès tels que le ligand dithiobenzoate de sodium, le chlorure de sodium, le gluconate de sodium, le chlorure d'étain, l'acide ascorbique ou l'oxalate de potassium.

Le dichlorométhane est un solvant de classe 2 [104], [105] dont la concentration doit être limitée dans le médicament radiopharmaceutique (une concentration inférieure 600 ppm ou une exposition journalière admissible inférieure à 6 mg/j).

En alternative non toxique au dichlorométhane, des études d'extraction/purification par Labrafac® à différentes températures ont été réalisées. Le Labrafac® est une huile utilisée dans la composition du cœur des NCL. Pour des raisons logistiques et de disponibilité en rhénium, certaines études sont réalisées avec le technétium-99m et d'autres avec le rhénium-188.

Concernant l'extraction/purification, aucune différence n'a été observée entre le comportement des complexes Tc-SSS et Re-SSS au cours des études non automatisées. Les valeurs de radioactivités obtenues par ce protocole expérimental peuvent être biaisées par les incertitudes sur la mesure des volumes de complexes prélevés à la seringue et sur les incertitudes de mesure de la radioactivité elles-mêmes associées à la géométrie de comptage non respectée.

L'utilisation de Labrafac® à température ambiante ne permet pas une extraction suffisante en terme quantitatif du complexe notamment comparée à l'extraction quasi-totale dans le dichlorométhane. Cependant, l'extraction par Labrafac® à des températures plus élevées permet d'augmenter le rendement d'extraction jusqu'à une extraction quasi-totale à 100°C. Finalement, le Labrafac® à 100°C semble utilisable pour l'extraction des complexes Tc-SSS et Re-SSS.

○ *Extraction/purification non automatisée en phase solide : colonne Sep-Pak®*

Concernant l'extraction du complexe Tc-SSS observée par le R_{FI} vide, le dichlorométhane en particulier et le Labrafac® à 100°C sont de bons solvants. En revanche, l'éthanol et le Labrafac® à température ambiante solubilisent mal le complexe, ce qui confirme l'étude précédente. Une agitation plus prolongée et énergique et le temps de contact supérieur

du solvant organique avec le complexe sont d'autres facteurs d'influence disponibles sur l'automate favorisant l'extraction du complexe.

Concernant le transfert du contenu du flacon réactionnel sur la colonne, dans tous les cas, il faut forcer le passage à travers la colonne. Avec le Labrafac[®], particulièrement à température ambiante, la pression à effectuer sur la colonne semble difficilement atteignable dans l'automate. L'activité déposée sur la colonne, observée par le $R_{\text{Déchet0}}$, est optimale avec l'éthanol et le Labrafac[®] à température en ambiante. Cependant, avec ces deux solvants, l'activité solubilisée est si faible que l'activité perdue par passage à travers la colonne vers les déchets est forcément faible. Les pertes radioactives sont beaucoup plus importantes avec le CH_2Cl_2 et le Labrafac[®] à 100°C. Il est logique qu'un mauvais solvant du complexe n'entraîne pas celui-ci au travers de la colonne et qu'un bon solvant l'entraîne beaucoup plus. Il est nécessaire de trouver un solvant solubilisant bien le complexe mais ne l'entraînant pas au travers de la colonne, c'est-à-dire que l'interaction du complexe avec les chaînes en C8 de la colonne soit plus forte qu'avec le solvant.

Un autre paramètre déterminant est le volume de solvant utilisé. Un compromis doit être défini entre un volume suffisant pour permettre l'extraction et un volume limité évitant la perte du complexe durant le dépôt sur la colonne.

En moyenne 11 % de l'activité initiale est perdue lors des étapes de lavage. La condition EtOH n'est pas interprétée du fait d'une solubilisation insuffisante responsable du reliquat important dans le flacon réactionnel après prélèvement du contenu.

Les conditions expérimentales les plus intéressantes sont CH_2Cl_2 ($R_{\text{Élution}} = 29,9 \%$), L/ CH_2Cl_2 ($R_{\text{Élution}} = 26,0 \%$), et L100/EtOH ($R_{\text{Élution}} = 22,6 \%$). Le dichlorométhane est le solvant qui offre les meilleurs $R_{\text{« étape »}}$ pour la solubilisation, l'élution. L'éthanol et le Labrafac[®] ne solubilisent pas suffisamment le complexe.

Concernant l'influence du solvant sur l'élution, le volume est un facteur important. En effet, l'efficacité d'élution ($E_{\text{élution}}$) a été notablement supérieure pour 2,5 ml d'éthanol en comparaison à 1 ml. De plus, l'éthanol a montré une faible affinité pour le complexe durant le suivi de l'extraction. En effet, pour un volume constant de 1 ml, le dichlorométhane reste le meilleur solvant. Le Labrafac® n'a pas été testé pour l'élution du complexe. En effet il perturberait la nanoformulation rendant impossible la maîtrise des volumes de Labrafac® dans la formulation pour obtenir des particules de 50 nm de diamètre.

Le volume élué doit être transféré dans le flacon de formulation. La formulation est sensible aux proportions de chaque élément. Un équilibre sur le volume d'élution de la colonne doit être trouvé. D'une part, un volume important de solvant d'élution devra être évaporé en conditions plus drastiques, augmentant le risque d'entraîner des matières premières de la formulation. Et si l'évaporation est insuffisante le volume de solvant résiduel perturberait la formulation et augmenterait le risque de dépasser les concentrations limites acceptables des solvants dans la préparation finale. D'autre part, un volume trop faible de solvant d'élution risque de ne pas permettre de décrocher de la colonne une quantité suffisante de complexe.

L'évaporation du dichlorométhane est plus aisée que celle de l'éthanol puisque leur température d'ébullition respective est de 39,8°C [106] et 78°C [107].

Le dichlorométhane reste donc le solvant d'élution le plus intéressant bien que celui-ci soit toxique sachant que cette toxicité est tout à fait acceptable pour une utilisation chez l'homme, solvant de classe 2 dont la limite de concentration dans le produit final est de 600 ppm [104], [105].

Le contrôle sur chromatographie couche mince a mis en évidence une PRC de complexe technétii lipophile toujours supérieure à 90 % ce qui est compatible avec une production pharmaceutique. La condition CH_2Cl_2 n'a pas pu être testée.

o *Extraction/purification automatisée sur module TADDEO®*

Le caractère lipophile prononcé du complexe Re-SSS favorise une adhésion aux différentes surfaces rencontrées (tubulures, électrovannes, flaconnages), ce qui explique la part importante de l'activité perdue non mesurée et le rendement d'extraction.

Le rendement d'extraction automatisée par Labrafac® indique un rendement d'extraction/purification inférieur à celui de la méthode manuelle. Cependant, ce résultat n'est pas incompatible avec la production automatisée puisqu'il est comparable au rendement de production obtenu lors du marquage du lipiodol décrit par Lepareur et Al (53,7 % $\pm$ 9,6 %) [91].

o *Extraction/purification automatisée sur automate SynChrom®*

Suivi des reliquats

Des pertes radioactives ont été générées par le système de transfert de liquide depuis le flacon d'élution et depuis le kit A. Les flacons d'élution (Fl TcO_4^-) et le kit A doivent être prélevés de leur contenu lors d'étapes de synthèse du complexe. Le système de prélèvement a été composé d'un cathéter court passant au travers du septum du flacon et poussé jusqu'au fond du flacon. Ce cathéter est relié par l'automate au flacon kit A. Le kit A a été connecté de la même façon au Fl TcO_4^- , à un réservoir contenant 0,5 ml d'EPPI et au réacteur 1. Ces flacons à fond plat ont dû être maintenus inclinés pour permettre un prélèvement optimal. Dans ces conditions, la grande majorité du contenu radioactif a été prélevé, et donc un minimum de pertes radioactives a été constaté dans les reliquats, Fl TcO_4^- et kit A.

Lors de ces études d'extraction/purification, les systèmes de prélèvement du flacon d'élution et du flacon kit A ont été efficaces. L'intérêt de l'étape de rinçage du kit A a été observé par des pertes radioactives dans reliquat du flacon kit A inférieures à celle du flacon d'élution.

Influence de la nature et du volume de solvant d'extraction

Malgré sa toxicité, le dichlorométhane a été beaucoup plus performant comme solvant d'extraction pour le dépôt sur la colonne. La variation de volume de CH_2Cl_2 n'a pas eu beaucoup d'influence sur l'activité du reliquat dans le R1, mais a montré une influence majeure sur l'activité déposée sur la colonne. En effet l'augmentation du volume de CH_2Cl_2 augmente l'élution du complexe au travers de la colonne et donc les pertes aux déchets.

Les conditions optimales pour l'extraction et le dépôt sur la colonne du complexe ont été réalisées avec 0,85 ml de CH_2Cl_2 .

Suivi des pertes en cours de rinçage de la colonne

Lors de la purification, le rinçage de la colonne Sep-Pak® afin d'éliminer les impuretés hydrophiles a généré de faible perte radioactive. Cela peut être expliqué par différentes hypothèses :

- Soit la grande majorité de la radioactivité est présente sous la forme chimique d'intérêt.
- Soit une partie des impuretés est éliminée vers les déchets au moment du dépôt du complexe sur la colonne avant le début des rinçages, ce qui expliquerait une partie de la diminution du R« étape » juste après dépôt sur la colonne.
- Soit les impuretés présentent un coefficient de partage proche du complexe Tc-SSS. Dans ce cas, la radioactivité sera retrouvée dans le cœur huileux des NCL ce qui n'impactera pas sur notre formulation et probablement pas sur les propriétés

in-vivo des ^{99m}Tc -SSS-NCL. Le problème pourrait être alors la maîtrise de la toxicité.

Influence de la nature et du volume du solvant d'élution

En comparaison au Labrafac® et à l'éthanol, le dichlorométhane a été le solvant le plus performant. Un volume de 2 ml de dichlorométhane a été retenu pour la production de particules chargées en ^{99m}Tc .

O Production automatisée de ^{99m}Tc -SSS-NCL

Nombre théorique de radionucléides rapporté au nombre de NCL

La faible concentration en radionucléides ($\text{AR/NCL} < 12\%$) est fortement favorable à la solubilisation du complexe Re-SSS au sein du cœur huileux (Labrafac®) des NCL. Dans le cadre d'un traitement associant plusieurs principes actifs (radiothérapie(s), chimiothérapie(s)), il est probablement possible d'ajouter d'autres molécules thérapeutiques lipophiles dans le cœur lipidique.

Concernant le calcul théorique du nombre de NCL, l'hypothèse que l'intégralité des quantités apportées de Labrafac®, Lipoïd®, Solutol®, soit intégré dans la composition des NCL est probablement exagérée. Une part de ces quantités est possiblement inutilisée. Ainsi le volume total de NCL et le nombre de NCL par production ont probablement été surestimés. En conséquence, le nombre de radionucléides rapportés au nombre de NCL (AR/NCL) a probablement été sous-estimé.

Activités disponibles et $R_{\text{étape}}$ de production

Sur une moyenne de 485 MBq apportés pour la production, 115 MBq sont disponibles dans le produit final (soit $\frac{1}{4}$ de l'activité de départ), ce qui correspond, après décroissance du technétium-99m, à une activité disponible en fin de production (durée de production : environ 2H20) de 88 MBq. Les 2 rinçages de la colonne Sep-Pak® réalisés successivement

par 10 ml d'EPPI et 2 ml d'un mélange 1/1 éthanol absolu/eau n'entraînent pas de réductions significatives du RE.

Les 2 étapes critiques identifiées dans les études précédentes sont confirmées par cette étude :

La première étape critique entre l'ajout du flacon de ^{99m}Tc libre et le transfert sur la colonne du complexe Tc-SSS. Le rendement de production passe de 100 % à 42 %, il ne reste alors plus que 203 MBq disponibles pour la synthèse. Cette diminution peut être expliquée par les reliquats de prélèvements, l'évaporation du complexe Tc-SSS, l'adhésion du complexe lipophile au circuit (tubulures, électrovannes), ou la rétention insuffisante du complexe par la colonne provoquant la fuite de celui-ci dans les déchets.

La deuxième étape critique, entre la colonne avant élution et le produit final montre une diminution du rendement par étape de 42 % à 24 %. Les hypothèses de pertes radioactives sont une élution non complète de la radioactivité présente sur la colonne, une évaporation lors de l'étape de formulation (hypothèse réfutée aux vues des données de production manuelle), l'adhésion du Tc-SSS le long du circuit de production.

Bilan des pertes radioactives et des RE après production

76 % (dont 51 %, 249 MBq mesurés) de l'activité initiale sont perdus en cours de synthèse.

Parmi la multitude de petites pertes engendrées par le nombre d'étapes du procédé, les plus importantes concernent l'étape de purification sur la colonne Sep-Pak®. En effet, 8 % de l'activité totale (39 MBq) restent dans la colonne et 14 % (67 MBq) partent dans les déchets. Une autre perte majeure (22 %) est retrouvée dans les reliquats associés à la synthèse du complexe ^{99m}Tc -SSS pour les flacons (élution et kit A)

25 % (123 MBq) de l'activité totale n'ont pas été retrouvés dans les différentes mesures effectuées. Différentes hypothèses permettent d'expliquer ces pertes non mesurées. L'adsorption du complexe lipophile Tc-SSS aux différents éléments du circuit, notamment les tubulures et électrovannes, entraîne une perte d'activité. L'évaporation du CH_2Cl_2 lors de l'étape d'extraction du Tc-SSS pourrait également entraîner une partie du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ complexé. Cette évaporation n'est pas souhaitée lors de l'étape d'extraction du Tc-SSS, et est même empêchée par un refroidissement actif avant l'ajout de CH_2Cl_2 dans un réacteur qui a été chauffé à 100°C . Cependant, les pertes lors de cette étape en synthèse sur paillasse sont minimales. La maîtrise de l'évaporation en conditions automatisées peut être un point important et plus délicat à maîtriser qu'en méthode sur paillasse. Enfin, une partie de cette activité non mesurée peut également être la conséquence des incertitudes des mesures associées à la géométrie de comptage. En effet, ces comptages concernent des contenants de formes différentes : colonne, réacteurs, tubes Falcon®, et flacons, de composition variable, polymères, verre, d'épaisseur variable et le volume contenu peut varier de quelques microlitres à plusieurs dizaines de millilitres.

La taille moyenne des particules produites est de 63 ± 8 nm (z-average, cf exemple de rapport de mesure en Annexe D), avec un PDI de $0,102 \pm 0,06$ ce qui est compatible avec la taille de la particule souhaitée. La différence de taille constatée par rapport à la taille des particules obtenues par synthèse manuelle peut être expliquée par une agitation de moins bonne qualité dans l'automate. En effet une amélioration de la taille des particules produite par l'automate (59 nm) a été constatée par ajout d'une méthode d'agitation supplémentaire : un reflux d'hélium. Généré à intervalle régulier dans la préparation, cette action a permis de solutionner les difficultés de formulation observées par un aspect inhomogène (couleur rouille foncée) de l'émulsion.

Le rendement de production automatisée très inférieur à celui de la production non automatisée, reste toutefois compatible avec une production de lot clinique. En effet le

rendement inférieur impose l'apport d'une quantité supérieure de radionucléide et d'activité. L'apport maximal en radionucléide est limité par le coût de production, et la capacité de production de ce radionucléide. Dans le cas du rhénium-188, produit par un générateur $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, son coût est relativement réduit et ne varie pas pour une élution quelque soit l'activité (dans la limite de l'activité maximale éluable). De plus, la décroissance physique du rhénium-188 (demi-vie =17h) n'oblige pas à préparer des activités trop importantes pour mettre à disposition aux utilisateurs une activité suffisante après production, contrôle, libération et transport du radiopharmaceutique.

L'automatisation de la production a permis la production de nanocapsules lipidiques chargées en technétium-99m. Les particules sont de taille conforme à la taille théorique et à la taille obtenue en production manuelle. Le rendement de production permet une production à visée thérapeutique.

Le travail doit être poursuivi notamment pour les points suivants. Un contrôle du rendement d'encapsulation des NCL chargées en technétium-99m ou rhénium-188 devra être développé et validé. L'optimisation de l'étape de purification doit être poursuivie pour limiter les pertes radioactives importantes. Enfin, le procédé devra être validé avec le rhénium-188.

CONCLUSION

Les ^{188}Re -SSS-NCL représentent un axe de recherche prometteur pour la radiothérapie interne vectorisée. Des études précliniques ont montré l'efficacité de ces nanomédecines pour le traitement des glioblastomes et du carcinome hépatocellulaire. Deux programmes de recherches portés par l'unité Inserm UMR_S 1066 MINT, les projets IRAD (Cancéropôle Grand Ouest) et Radiohead (ANR Emergence 2012), ont pour objectif le transfert à la clinique de cette technologie dans le traitement du glioblastome. L'automatisation de la production des ^{188}Re -SSS-NCL est une des étapes clefs de ces deux projets pour permettre le transfert à la clinique en limitant l'irradiation de l'opérateur, en garantissant une synthèse conforme aux exigences réglementaires et aux référentiels de bonnes pratiques.

Ce travail a étudié l'automatisation de la production de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS-NCL comme modèle au ^{188}Re -SSS-NCL au moyen d'un automate SynChrom R&D. Les résultats obtenus permettent la transposition des étapes de production non automatisée vers l'automate. Après modification de différents paramètres de production et recherche des conditions idéales, il a été possible de formuler de manière automatisée des NCL blanches. L'utilisation du Labrafac® comme solvant non toxique de solubilisation et purification a été possible en synthèse non automatisée mais s'est révélé difficile à maîtriser avec une colonne Sep-Pak® sur paillasse et avec l'automate. L'optimisation de la purification sur colonne réalisée en deux temps, d'abord sur paillasse puis transposée sur l'automate, a révélé les difficultés de remplacer le dichlorométhane par le Labrafac® et à conserver un rendement de purification optimale. Enfin, des nanocapsules lipidiques chargées en technétium-99m ont été produites au moyen de l'automate avec une taille compatible avec l'application désirée. Le travail effectué a permis l'automatisation de la production de nanoparticules radioactives.

Il est important pour valider ce travail de mettre en place une méthode de caractérisation du produit final, c'est-à-dire des nanocapsules lipidiques chargées en complexe radioactif. En ce sens, une méthode d'analyse HPLC non destructrice pour les particules est en cours de développement et permettra de mesurer le rendement d'encapsulation du technétium-99m ou du rhénium-188.

Dans l'objectif d'une production de lots cliniques expérimentaux, une organisation qualité, conforme aux exigences juridiques et inspirée des référentiels de bonnes pratiques, devra verrouiller la sûreté du procédé. L'automate que nous avons utilisé permet une grande flexibilité en termes de paramétrage pour optimiser la production. Son utilisation en clinique peut néanmoins poser quelques difficultés (réutilisation du circuit créant un risque de contaminations croisées et microbiologiques). L'utilisation d'un automate à circuit fermé (cassette) pourrait alors être envisageable.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] F. Lacoeyille, E. Garcion, J. Benoit, et A. Lamprecht, « Lipid Nanocapsules for Intracellular Drug Delivery of Anticancer Drugs », *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 7, n° 11, p. 1-6, 2007.
- [2] J. Hureauux, F. Lagarce, F. Gagnadoux, M. Rousselet, V. Moal, T. Urban, et J. Benoit, « Toxicological Study and Efficacy of Blank and Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules After i. v. Administration in Mice », *Pharm. Res.*, vol. 27, n° 3, p. 421-430, 2010.
- [3] N. T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, et J. P. Benoit, « Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. », *Int. J. Pharm.*, vol. 379, n° 2, p. 201-209, 2010.
- [4] A. Paillard, F. Hindré, C. Vignes-colombeix, J. Benoit, et E. Garcion, « The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability », *Biomaterials*, vol. 31, n° 29, p. 7542-7554, 2010.
- [5] S. Vinchon-Petit, D. Jarret, A. Paillard, J. Benoit, E. Garcion, et P. Menei, « In vivo evaluation of intracellular drug-nanocarriers infused into intracranial tumours by convection-enhanced delivery : distribution and radiosensitisation efficacy », *J. Neurooncol.*, vol. 97, p. 195-205, 2010.
- [6] E. Garcion, A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-pouessel, B. Denizot, P. Menei, et J. Benoit, « A new generation of anticancer , drug-loaded , colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats », *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, n° 7, p. 1710-1722, 2006.
- [7] C. Vanpouille-Box, F. Lacoeyille, C. Belloche, N. Lepareur, L. Lemaire, J.-J. Lejeune, J. Benoît, P. Menei, O. F. Couturier, E. Garcion, et F. Hindré, « Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with (188)Re-lipid nanocapsules. », *Biomaterials*, vol. 32, n° 28, p. 6781-90, oct. 2011.
- [8] C. Vanpouille-Box, F. Lacoeyille, J. Roux, C. Aubé, E. Garcion, N. Lepareur, F. Oberti, F. Bouchet, N. Noiret, E. Garin, J.-P. Benoît, O. Couturier, et F. Hindré, « Lipid nanocapsules loaded with rhenium-188 reduce tumor progression in a rat hepatocellular carcinoma model. », *PLoS One*, vol. 6, n° 3, p. e16926, janv. 2011.
- [9] E. Allard, F. Hindré, C. Passirani, L. Lemaire, N. Lepareur, N. Noiret, P. Menei, et J.-P. Benoît, « 188Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas. », *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 35, n° 10, p. 1838-46, oct. 2008.
- [10] G. Ferro-flores, C. Arteaga, et D. Murphy, « Pharmacokinetics and dosimetry of 188Re-pharmaceuticals », vol. 60, p. 1389-1401, 2008.

- [11] Y. Li, Z.-Y. Tang, et J.-X. Hou, « Hepatocellular carcinoma: insight from animal models. », *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 9, n° 1, p. 32-43, janv. 2012.
- [12] P. J. Magistretti et B. R. Ransom, « Astrocytes », in *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress: An Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 1^{re} éd., L. W. & Wilkins, Éd. 2002, p. 133-145.
- [13] L. Bauchet, V. Rigau, H. Mathieu-Daudé, D. Figarella-Branger, D. Hugues, L. Palusseau, F. Bauchet, M. Fabbro, C. Campello, L. Capelle, A. Durand, B. Trétarre, D. Frappaz, D. Henin, P. Menei, J. Honnorat, et F. Segnarbieux, « French brain tumor data bank: methodology and first results on 10,000 cases. », *J. Neurooncol.*, vol. 84, n° 2, p. 189-99, sept. 2007.
- [14] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, et P. Kleihues, « The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. », *Acta Neuropathol.*, vol. 114, n° 2, p. 97-109, août 2007.
- [15] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, et P. Kleihues, « ERRATUM The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system », *Acta Neuropathol.*, vol. 114, n° 5, p. 547-547, sept. 2007.
- [16] C. Adam et K. Mokhtari, « Tumeurs du système nerveux central. Classifications histologiques et topographiques , épidémiologie », *EMC (Elsevier Masson), Neurol.*, n° 17-205-A-10, 2011.
- [17] M. A. Mittler, B. C. Walters, et E. G. Stopa, « Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. », *J. Neurosurg.*, vol. 85, n° 6, p. 1091-4, déc. 1996.
- [18] S. W. Coons, P. C. Johnson, B. W. Scheithauer, A. J. Yates, et D. K. Pearl, « Improving Diagnostic Accuracy and Interobserver Primary Gliomas », *Am. C.*, vol. 79, n° 7, p. 1381-1393, avr. 1997.
- [19] D. Figarella-Branger, C. Colin, B. Coulibaly, B. Quilichini, A. Maues De Paula, C. Fernandez, et C. Bouvier, « Histological and molecular classification of gliomas. », *Rev. Neurol. (Paris).*, vol. 164, n° 6-7, p. 505-15, 2013.
- [20] P. Y. Wen et S. Kesari, « Malignant gliomas in adults. », *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, n° 5, p. 492-507, juill. 2008.
- [21] Haute Autorité de Santé, « Guide ALD n°30 - Tumeur maligne , affection maligne du tissu. Cancer primitif du système nerveux central de l'adulte », 2010.
- [22] P. Paquis et P. Menei, « Conclusions - Les glioblastomas. standards, options, recommandations. », *Neurochirurgie.*, vol. 56, n° 6, p. 503-7, déc. 2010.

- [23] Q. T. Ostrom, H. Gittleman, P. Farah, A. Ondracek, Y. Chen, Y. Wolinsky, N. E. Stroup, C. Kruchko, et J. S. Barnholtz-Sloan, « CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. », *Neuro. Oncol.*, vol. 15 Suppl 2, p. 1-56, nov. 2013.
- [24] I. Baldi, A. Huchet, L. Bauchet, et H. Loiseau, « Epidemiology of glioblastoma », *Neurochirurgie.*, vol. 56, n° 6, p. 433-40, déc. 2010.
- [25] M. Chatel, M. Frenay, C. Lebrun, V. Bourg, et F. Fauchon, « Gliomes de haut grade : astrocytomes anaplasiques et glioblastomes », 2005.
- [26] R. Stupp, M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. B. Taphoorn, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A. A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C. J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J. G. Cairncross, et R.-O. Mirimanoff, « Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. », *Lancet Oncol.*, vol. 10, n° 5, p. 459-66, mai 2009.
- [27] W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O. D. Wiestler, F. Zanella, et H.-J. Reulen, « Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. », *Lancet Oncol.*, vol. 7, n° 5, p. 392-401, mai 2006.
- [28] M. Lacroix, D. Abi-Said, D. R. Fournay, Z. L. Gokaslan, W. Shi, F. DeMonte, F. F. Lang, I. E. McCutcheon, S. J. Hassenbusch, E. Holland, K. Hess, C. Michael, D. Miller, et R. Sawaya, « A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. », *J. Neurosurg.*, vol. 95, n° 2, p. 190-8, août 2001.
- [29] M. D. Walker, E. Alexander, W. E. Hunt, C. S. MacCarty, M. S. Mahaley, J. Mealey, H. A. Norrell, G. Owens, J. Ransohoff, C. B. Wilson, E. A. Gehan, et T. A. Strike, « Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. », *J. Neurosurg.*, vol. 49, n° 3, p. 333-43, sept. 1978.
- [30] M. E. Hegi, A.-C. Diserens, T. Gorlia, M.-F. Hamou, N. De Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. C. Bromberg, P. Hau, R. Stupp, M. E. Hegi, N. de Tribolet, R. O. Mirimanoff, J. G. Cairncross, et R. C. Janzer, « MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. », *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, n° 10, p. 997-1003, mars 2005.
- [31] N. Laperriere, L. Zuraw, G. Cairncross, T. Cancer, et C. Ontario, « Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. », *Radiother. Oncol.*, vol. 64, n° 3, p. 259-73, sept. 2002.
- [32] F. Keime-Guibert, O. Chinot, L. Taillandier, S. Cartalat-Carel, M. Frenay, G. Kantor, J.-S. Guillemo, E. Jadaud, P. Colin, P.-Y. Bondiau, P. Meneï, H. Loiseau, V. Bernier, J. Honnorat, M. Barrié, K. Mokhtari, J.-J. Mazon, A. Bissery, et J.-Y. Delattre,

- « Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. », *N. Engl. J. Med.*, vol. 356, n° 15, p. 1527-35, avr. 2007.
- [33] W. Roa, P. M. A. Brasher, G. Bauman, M. Anthes, E. Bruera, A. Chan, B. Fisher, D. Fulton, S. Gulavita, C. Hao, S. Husain, A. Murtha, K. Petruk, D. Stewart, P. Tai, R. Urtasun, J. G. Cairncross, et P. Forsyth, « Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. », *J. Clin. Oncol.*, vol. 22, n° 9, p. 1583-8, mai 2004.
- [34] L. A. Stewart, « Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. », *Lancet*, vol. 359, n° 9311, p. 1011-8, mars 2002.
- [35] M. Westphal, D. C. Hilt, E. Bortey, P. Delavault, R. Olivares, P. C. Warnke, I. R. Whittle, J. Jääskeläinen, et Z. Ram, « A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. », *Neuro. Oncol.*, vol. 5, n° 2, p. 79-88, avr. 2003.
- [36] G. Huberfeld et J. Pallud, « L'épilepsie associée aux tumeurs cérébrales », *Prat. Neurol. - FMC*, vol. 6, n° 1, p. 19-33, 2015.
- [37] M. S. M. van Breemen, E. B. Wilms, et C. J. Vecht, « Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management. », *Lancet Neurol.*, vol. 6, n° 5, p. 421-430, 2007.
- [38] Institut National du Cancer, « Traitement curatif de la maladie thromboembolique veineuse chez les patients atteints de cancer - Prévention et traitement de thromboses veineuses sur catheter chez les patients atteints de cancer », 2008.
- [39] J. J. Vredenburgh, A. Desjardins, J. E. Herndon, J. M. Dowell, D. a Reardon, J. a Quinn, J. N. Rich, S. Sathornsumetee, S. Gururangan, M. Wagner, D. D. Bigner, A. H. Friedman, et H. S. Friedman, « Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. », *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, n° 4, p. 1253-9, févr. 2007.
- [40] F. Ducray et a. Idbah, « Thérapies moléculaires ciblées et antiangiogéniques dans le traitement des glioblastomes », *EMC - Neurol.*, vol. 9, n° 2, p. 1-13, avr. 2012.
- [41] F. Ducray et Al, « Advances in adults gliomas biology , imaging and treatment », *Bull. Cancer*, vol. 97, n° 1, p. 17-36, 2010.
- [42] A. Boiardi, M. Bartolomei, A. Silvani, M. Eoli, A. Salmaggi, E. Lamperti, I. Milanesi, A. Botturi, P. Rocca, L. Bodei, G. Broggi, et G. Paganelli, « Intratumoral delivery of mitoxantrone in association with 90-Y radioimmunotherapy (RIT) in recurrent glioblastoma. », *J. Neurooncol.*, vol. 72, n° 2, p. 125-31, avr. 2005.
- [43] P. Ferroli, M. Broggi, A. Franzini, E. Maccagnano, M. Lamperti, A. Boiardi, et G. Broggi, « Surgifoam and mitoxantrone in the glioblastoma multiforme postresection cavity: the first step of locoregional chemotherapy through an ad hoc-placed catheter:

technical note. », *Neurosurgery*, vol. 59, n° 2, p. E433-4; discussion E433-4, août 2006.

- [44] S. Kunwar, S. Chang, M. Westphal, M. Vogelbaum, J. Sampson, G. Barnett, M. Shaffrey, Z. Ram, J. Piepmeier, M. Prados, D. Croteau, C. Pedain, P. Leland, S. R. Husain, B. H. Joshi, et R. K. Puri, « Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. », *Neuro. Oncol.*, vol. 12, n° 8, p. 871-81, août 2010.
- [45] Z. Lidar, Y. Mardor, T. Jonas, R. Pfeffer, M. Faibel, D. Nass, M. Hadani, et Z. Ram, « Convection-enhanced delivery of paclitaxel for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase I/II clinical study. », *J. Neurosurg.*, vol. 100, n° 3, p. 472-9, mars 2004.
- [46] A. Merlo, O. Hausmann, M. Wasner, P. Steiner, A. Otte, E. Jermann, P. Freitag, J. C. Reubi, J. Müller-Brand, O. Gratzl, et H. R. Mäcke, « Locoregional regulatory peptide receptor targeting with the diffusible somatostatin analogue 90Y-labeled DOTA0-D-Phe1-Tyr3-octreotide (DOTATOC): a pilot study in human gliomas. », *Clin. Cancer Res.*, vol. 5, n° 5, p. 1025-33, mai 1999.
- [47] N. G. Rainov, « A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. », *Hum. Gene Ther.*, vol. 11, n° 17, p. 2389-401, nov. 2000.
- [48] H. Brem, S. Piantadosi, P. C. Burger, M. Walker, R. Selker, N. A. Vick, K. Black, M. Sisti, S. Brem, et G. Mohr, « Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. », *Lancet*, vol. 345, n° 8956, p. 1008-12, avr. 1995.
- [49] R. H. Bobo, D. W. Laske, A. Akbasak, P. F. Morrison, R. L. Dedrick, et E. H. Oldfield, « Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, n° 6, p. 2076-80, mars 1994.
- [50] J. Rousseau, « Chimiothérapie des tumeurs cérébrales : intérêt de l'injection intratumorale de drogues antinéoplasiques », Ph D : Physique pour l'instrumentation. Université Joseph Fourier. Grenoble 1. 262p, 2007.
- [51] E. Allard, C. Passirani, et J. Benoit, « Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors Infusion pump », *Biomaterials*, vol. 30, n° 12, p. 2302-2318, 2009.
- [52] Y. Mardor, O. Rahav, Y. Zauberman, Z. Lidar, A. Ocherashvilli, D. Daniels, Y. Roth, S. E. Maier, A. Orenstein, et Z. Ram, « Convection-enhanced drug delivery: increased efficacy and magnetic resonance image monitoring. », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 15, p. 6858-63, août 2005.

- [53] P. F. Morrison, D. W. Laske, F. Bob, E. H. Oldfield, et R. L. Dedrick, « High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics », *Am. J. Physiol.*, vol. 266, n° 1, p. R292-R305, 1994.
- [54] J. A. MacKay, D. F. Deen, et F. C. Szoka, « Distribution in brain of liposomes after convection enhanced delivery; modulation by particle charge, particle diameter, and presence of steric coating. », *Brain Res.*, vol. 1035, n° 2, p. 139-53, févr. 2005.
- [55] D. W. Laske, R. J. Youle, et E. H. Oldfield, « Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. », *Nat. Med.*, vol. 3, n° 12, p. 1362-8, déc. 1997.
- [56] S. J. Patel, W. R. Shapiro, D. W. Laske, R. L. Jensen, A. L. Asher, B. W. Wessels, S. P. Carpenter, et J. S. Shan, « Safety and feasibility of convection-enhanced delivery of Cotara for the treatment of malignant glioma: initial experience in 51 patients. », *Neurosurgery*, vol. 56, n° 6, p. 1243-52; discussion 1252-3, juin 2005.
- [57] E. Garin et J. Vuillez, « Radiopharmaceutiques à visée thérapeutique : indications , précautions d ' emploi et principaux résultats », vol. 8, n° 13, p. 1-15, 2015.
- [58] Autorité de Sûreté Nucléaire, « Radiothérapie interne vectorisée », 2015. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.asn.fr/Lexique/R/Radiotherapie-interne-vectorisee>. [Consulté le: 23-avr-2015].
- [59] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust, et J.-P. Benoit, « A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers », *Pharm. Res.*, vol. 19, n° 6, p. 875-880, juin 2002.
- [60] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, M.-C. Venier-Julienne, J.-E. Proust, R. Phan-Tan-Luu, et J.-P. Benoît, « The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 18, n° 1, p. 55-61, janv. 2003.
- [61] Malvern Instruments Worldwide, « Livre Blanc - A basic guide to particle characterization », 2014.
- [62] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, P. Simard, J. C. Leroux, et J. P. Benoit, « Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake », 2006.
- [63] F. A. Cotton et G. Wilkinson, « Technetium and Rhenium », in *Advanced Inorganic Chemistry*, Fourth., John Wiley & Sons, Éd. 1980, p. 883-900.
- [64] J. R. Dilworth, S. J. Parrott, J. Dilworth, et S. Parrott, « The biomedical chemistry of technetium and rhenium », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 27, n° 1, p. 43-55, 1998.
- [65] E. Deutsch, K. Libson, J. L. Vanderheyden, A. R. Ketrin, et H. R. Maxon, « The chemistry of rhenium and technetium as related to the use of isotopes of these

- elements in therapeutic and diagnostic nuclear medicine. », *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B.*, vol. 13, n° 4, p. 465-77, janv. 1986.
- [66] C. M. Kennedy et T. C. Pinkerton, « Technetium carboxylate complexes--III. A new synthetic route to hexakis-(isonitrile) technetium(I) salts. », *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A.*, vol. 39, n° 11, p. 1179-86, janv. 1988.
- [67] F. F. Knapp, A. L. Beets, S. Gohlke, P. O. Zamora, H. Bender, H. Palmedo, et H. J. Biersack, « Availability of rhenium-188 from the alumina-based tungsten-188/rhenium-188 generator for preparation of rhenium-188-labeled radiopharmaceuticals for cancer treatment. », *Anticancer Res.*, vol. 17, n° 3B, p. 1783-1795, 1997.
- [68] A. Leonidova et G. Gasser, « Underestimated Potential of Organometallic Rhenium Complexes as Anticancer Agents. », *ACS Chem. Biol.*, août 2014.
- [69] A. Kermagoret, G. Morgant, J. d'Angelo, A. Tomas, P. Roussel, G. Bastian, P. Collery, et D. Desmaële, « Synthesis, structural characterization and biological activity against several human tumor cell lines of four rhenium(I) diseleno-ethers complexes: $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{PhSe}(\text{CH}_2)_2\text{SePh})$, $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{PhSe}(\text{CH}_2)_3\text{SePh})$, $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2\text{Se}(\text{CH}_2)_2\text{SeCH}_2-\text{CO}_2\text{H})$ and $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{H})$ », *Polyhedron*, vol. 30, n° 2, p. 347-353, févr. 2011.
- [70] P. Collery, G. Bastian, F. Santoni, A. Mohsen, M. Wei, T. Collery, A. Tomas, D. Desmaele, et J. D'Angelo, « Uptake and efflux of rhenium in cells exposed to rhenium diseleno-ether and tissue distribution of rhenium and selenium after rhenium diseleno-ether treatment in mice. », *Anticancer Res.*, vol. 34, n° 4, p. 1679-89, avr. 2014.
- [71] Laboratoire National Henri Becquerel et Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, « 188 75 Rhenium 113 », in *Tables de Radionucléides*, 2002, p. 10.
- [72] Laboratoire National Henri Becquerel et Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, « PÉRIODES RADIOACTIVES Table de valeurs recommandées », 2014.
- [73] F. F. R. Knapp, A. L. Beets, J. Pinkert, J. Kropp, W.-Y. LIN, et S.-J. WANG, « Rhenium radioisotopes for therapeutic radiopharmaceutical development », in *International Seminar on therapeutic Applications of Radiopharmaceuticals*, 1999.
- [74] National Isotope Development center, « Radio-Isotope of Rhenium-186. » [En ligne]. Disponible sur: http://www.isotopes.gov/catalog/product.php?element=Rhenium&type=rad&rad_product_index=39. [Consulté le: 14-janv-2014].
- [75] National Isotope Development center, « Radio-Isotope of Tungsten-188/Rhenium-188 Generator. » [En ligne]. Disponible sur:

http://www.isotopes.gov/catalog/product.php?element=Tungsten&type=rad&rad_product_index=63. [Consulté le: 16-janv-2014].

- [76] International Atomic Energy Agency, « Production of Long Lived Parent Radionuclides for Generators : ^{68}Ge , ^{82}Sr , ^{90}Sr and ^{188}W », 2010.
- [77] Institut des Radioéléments, « Manuel d'utilisation du système de reconcentration pour générateur $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$. » p. 47, 2007.
- [78] H. Palmedo, S. Guhlke, H. Bender, J. Sartor, G. Schoeneich, J. Risse, F. Grünwald, F. F. Knapp, et H. J. Biersack, « Dose escalation study with rhenium-188 hydroxyethylidene diphosphonate in prostate cancer patients with osseous metastases. », *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 27, n° 2, p. 123-130, 2000.
- [79] H. Palmedo, A. Manka-Waluch, P. Albers, I. G. H. Schmidt-Wolf, M. Reinhardt, S. Ezziddin, A. Joe, R. Roedel, R. Fimmers, F. F. Knapp, S. Guhlke, et H.-J. Biersack, « Repeated bone-targeted therapy for hormone-refractory prostate carcinoma: randomized phase II trial with the new, high-energy radiopharmaceutical rhenium-188 hydroxyethylidenediphosphonate. », *J. Clin. Oncol.*, vol. 21, n° 15, p. 2869-75, août 2003.
- [80] K. Liepe, J. Kropp, R. Runge, et J. Kotzerke, « Therapeutic efficiency of rhenium-188-HEDP in human prostate cancer skeletal metastases. », *Br. J. Cancer*, vol. 89, n° 4, p. 625-9, août 2003.
- [81] T. Zenz, G. Glatting, R. F. Schenlk, I. Buchmann, H. Döhner, S. N. Reske, et D. Bunjes, « Targeted marrow irradiation with radioactively labeled anti-CD66 monoclonal antibody prior to allogeneic stem cell transplantation for patients with leukemia: results of a phase I-II study We », *Stem Cell Transplant.*, vol. 91, n° 2, p. 285-286, 2006.
- [82] P. Bernal, J.-L. Raoul, J. Stare, E. Sereegotov, F. X. Sundram, A. Kumar, J.-M. Jeong, P. Pusuwan, C. Divgi, P. Zanzonico, G. Vidmar, J. Buscombe, T. T. M. Chau, M. M. Saw, S. Chen, R. Ogbac, M. Dondi, et A. K. Padhy, « International Atomic Energy Agency-sponsored multinational study of intra-arterial rhenium-188-labeled lipiodol in the treatment of inoperable hepatocellular carcinoma: results with special emphasis on prognostic value of dosimetric study. », *Semin. Nucl. Med.*, vol. 38, n° 2, p. S40-5, mars 2008.
- [83] A. Boschi, L. Uccelli, A. Duatti, P. Colamussi, C. Cittanti, A. Filice, A. H. Rose, A. A. Martindale, P. G. Claringbold, P. G. Claringbold, D. Kearney, R. Galeotti, J. H. Turner, H. J. Turner, et M. Giganti, « A kit formulation for the preparation of ^{188}Re -lipiodol: preclinical studies and preliminary therapeutic evaluation in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. », *Nucl. Med. Commun.*, vol. 25, n° 7, p. 691-9, juill. 2004.

- [84] N. Lepareur, N. Noiret, et E. Garin, « Re-SSS / Lipiodol : development of a potential treatment for HCC from bench to bedside », in *European journal of nuclear medicine*, 2011, vol. 188, p. 1-26.
- [85] K. Liepe, C. Brogsitter, J. Leonhard, G. Wunderlich, R. Hliscs, J. Pinkert, G. Folprecht, et J. Kotzerke, « Feasibility of high activity rhenium-188-microsphere in hepatic radioembolization. », *Jpn. J. Clin. Oncol.*, vol. 37, n° 12, p. 942-50, déc. 2007.
- [86] R. Al-Mufti, R. Pedley, D. Marshall, R. Begent, A. Hilson, M. Winslet, et K. Hobbs, « In vitro assessment of Lipiodol-targeted radiotherapy for liver and colorectal cancer cell lines. », *Br. J. Cancer*, vol. 79, n° 11-12, p. 1665-71, avr. 1999.
- [87] J. Wöhrle, T. Nusser, B. J. Krause, M. Kochs, T. Habig, F. M. Mottaghy, H. A. Kestler, V. Hombach, et S. N. Reske, « Patients with in-stent restenoses: comparison of intracoronary beta-brachytherapy using a rhenium-188 filled balloon catheter with the polymer-based paclitaxel-eluting taxus-express stent. », *Nuklearmedizin.*, vol. 46, n° 5, p. 185-91, janv. 2007.
- [88] S.-W. Lee, S.-W. Park, M.-K. Hong, Y.-H. Kim, K. H. Han, J. Kim, J.-H. Park, S.-J. Oh, D. H. Moon, S. J. Oh, C. W. Lee, J.-J. Kim, et S.-J. Park, « Incidence and predictors of late recurrence after beta-radiation therapy with a 188Re-MAG3-filled balloon for diffuse in-stent restenosis. », *Am. Heart J.*, vol. 151, n° 1, p. 158-63, janv. 2006.
- [89] F. Mévellec, F. Tisato, F. Refosco, A. Roucoux, N. Noiret, H. Patin, et G. Bandoli, « Synthesis and characterization of the “sulfur-rich” bis(perthiobenzoato)(dithiobenzoato)technetium(III) heterocomplex. », *Inorg. Chem.*, vol. 41, n° 3, p. 598-601, févr. 2002.
- [90] F. Mévellec, A. Roucoux, N. Noiret, H. Patin, F. Tisato, et G. Bandoli, « Synthesis and characterization of the bis(trithioperoxybenzoate)(dithiobenzoate)rhenium(III) hetero complex », *Inorg. Chem. Commun.*, vol. 2, n° 6, p. 230-233, juin 1999.
- [91] N. Lepareur, V. Ardisson, N. Noiret, E. Boucher, J.-L. Raoul, B. Clément, et E. Garin, « Automation of labelling of Lipiodol with high-activity generator-produced 188Re », *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 69, n° 2, p. 426-430, 2011.
- [92] N. Lepareur, E. Garin, N. Noiret, et J. Y. Herry, « A kit formulation for the labelling of lipiodol with generator-produced 188Re », *J. Label. Compd. Radiopharm.*, vol. 47, n° January, p. 857-867, 2004.
- [93] N. Lepareur, « Vectorisations active et passive de radiopharmaceutiques du technétium-99m et du rhénium-188 pour l'imagerie médicale et la thérapie », Ph D : Chimie .Université de Rennes 1. Rennes. 2918. 239 p, 2003.
- [94] G. El-Deeb, B. Nguon, A. Tibi, et N. Rizzo-Padoin, « Mise en œuvre d'une recherche biomédicale utilisant un médicament expérimental : quel radiopharmaceutique expe cadre juridique ? Quels autorisations et avis préalables ? », *Le Pharm. Hosp.*, n° 44, p. 138-144, 2009.

- [95] Direction de l'hospitalisation et de l'organisation des soins, « Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière », 2001.
- [96] Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, « Bonnes pratiques de préparation », 2007.
- [97] Pharmaceutical inspection Convention Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme, « PIC/S guide to good practices for the preparation of medicinal productions », PE 010-3, 2008.
- [98] P. Elsinga, S. Todde, I. Penuelas, G. Meyer, B. Farstad, A. Faivre-Chauvet, R. Mikolajczak, G. Westera, T. Gmeiner-Stopar, et C. Decristoforo, « Guidance on current good radiopharmacy practice (cGRPP) for the small-scale preparation of radiopharmaceuticals. », *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 37, n° 5, p. 1049-62, mai 2010.
- [99] A. Verbruggen, H. H. Coenen, J.-R. Deverre, D. Guilloteau, B. Langstrom, P. a Salvadori, et C. Halldin, « Guideline to regulations for radiopharmaceuticals in early phase clinical trials in the EU. », *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 35, n° 11, p. 2144-51, nov. 2008.
- [100] T. Roberie, a. E. Hoberman, et J. Selbin, « Complexes of Dithiobenzoic Acids. I. Preparation and Properties of a Series of Molybdenum(IV) Compounds », *J. Coord. Chem.*, vol. 9, n° August 2014, p. 79-87, 1979.
- [101] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, et C. Yin, « Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. », *Biomaterials*, vol. 31, n° 13, p. 3657-3666, 2010.
- [102] I.-Y. Kim, E. Joachim, H. Choi, et K. Kim, « Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type », *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, p. 1-10, 2015.
- [103] S. T. Stern et S. E. McNeil, « Nanotechnology safety concerns revisited », *Toxicol. Sci.*, vol. 101, n° 1, p. 4-21, 2008.
- [104] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticales For Human Use, « Impurities : Guideline for residual solvents Q3C(R5) », 2011.
- [105] « Limitation des taux de solvants résiduels dans les substances actives, les excipients et les médicaments », in *Pharmacopée Européenne*, 8.0 éd., vol. 1, 2008, p. 687-694.
- [106] N. Bonnard, M. T. Brondeau, M. Falcy, D. Jargot, M. Frenay, S. Miraval, F. Pillière, S. Robert, et O. Schneider, « Fiche toxicologique - Dichlorométhane », 2014.
- [107] N. Bonnard, M. Falcy, D. Jargot, et E. Pasquier, « Fiche toxicologique - Éthanol », 2011.

- [108] C. Vanpouille-Box, « Les nanocapsules lipidiques chargées en Rhénium-188 : nouvel outil pour la radiothérapie interne du carcinome hépatocellulaire et du gliome », Ph D : Pharmacologie Expérimentale et Clinique. Université d'Angers. Angers. 1097. 262 p, 2011.

TABLE DES FIGURES

FIGURE I-1 : RÉPARTITION DES GLIOMES PAR SOUS TYPES HISTOLOGIQUES (N=92504); [23]	11
FIGURE II-1 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UNE NANOCAPSULE LIPIDIQUE	24
FIGURE II-2, [108] : A- REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES ÉTAPES DE LA FORMULATION DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES B- MESURE DE LA CONDUCTIVITÉ EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE AU COURS D'UNE NANO-FORMULATION.....	26
FIGURE II-3 : PRINCIPALES ÉMISSIONS CARACTÉRISTIQUES DU SCHÉMA DE DÉSINTÉGRATION DU TUNGSTÈNE ^{188}W VERS L'OSMIUM ^{188}Os . SCHÉMA INSPIRÉ DE [76]	30
FIGURE II-4 : GÉNÉRATEUR DE RHÉNIUM (SOURCE : IRE)	32
FIGURE II-5 : SCHÉMA DE LA RÉACTION NUCLÉAIRE DE PRODUCTION DU ^{188}W	33
FIGURE II-6 : PHOTOGRAPHIE ET SCHÉMA DU KIT DE CONCENTRATION DE L'ÉLUTION DE ReO_4^- DU CENTRE EUGÈNE MARQUIS, RENNES	34
FIGURE II-7 : FORMULE TOPOGRAPHIQUE DU ^{188}Re -SSS.....	37
FIGURE II-8 : SCHÉMA DE SYNTHÈSE DU COMPLEXE LIPOPHILE DE RHÉNIUM-188, ^{188}Re -SSS	38
FIGURE III-1 : DISTRIBUTION DES NCL CHARGÉES EN RHÉNIUM-188 A: MESURE PAR COMPTAGE GAMMA DE L'ÉLIMINATION URINAIRE ET FÉCALE DU ^{188}Re DURANT 96 H SUIVANT L'INJECTION SI OU CED DE $^{188}\text{ReO}_4^-$ ET DE ^{188}Re -SSS-NCL, DANS DES RATS PORTEURS DE MODELE DE GLIOME A CELLULES 9L, 6 JOURS APRES IMPLANTATION DES CELLULES 9L. REPARTITION ENTRE URINE ET SELLES DU $^{188}\text{ReO}_4^-$. (c) AND ^{188}Re -SSS-NCL (d). B: BIODISTRIBUTION PAR ORGANE DE SOLUTION DE $^{188}\text{ReO}_4^-$ (N = 8) ET DE ^{188}Re -SSS-NCL (N = 8) 24 AND 96 H APRES INJECTION; LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGE DE LA DOSE INJECTEE PAR GRAMME D'ORGANE, MOYENNE $\pm$ SD. E: VUES AUTORADIOGRAPHIQUES DE ^{188}Re -SSS-NCL INJECTE PAR SI AND CED, 24 H APRES INJECTION. F: AIRE DE DISTRIBUTION TOTALE DES ^{188}Re -SSS-NCL SUR COUPE DE CERVEAU. G: ACTIVITE SURFACIQUE MOYENNE (DLU/MM ²) DE L'AIRE DE DISTRIBUTION EN ^{188}Re -SSS-NCL APRES INJECTION EN BOLUS ET PAR CED. (EXTRAIT DE C. VANPOUILLE-BOX ET AL. 2011 [7])	42
FIGURE III-2 : MODULE DE SYNTHÈSE AUTOMATISÉE SYNCHROM R&D® RAYTEST®	54
FIGURE III-3 : COPIE D'ÉCRAN DE LA FENÊTRE DE CONTRÔLE PARAMÉTRÉE DES INSTRUMENTS (LOGICIEL GINA® SYNCHROM®)... ..	55
FIGURE IV-1 : RADIOACTIVITÉS MESURÉES POUR LE CALCUL DU RENDEMENT D'EXTRACTION DU COMPLEXE Me-SSS APRÈS SYNTHÈSE, EXTRACTION AVEC UN SOLVANT ORGANIQUE (DICHLOROMÉTHANE ET LABRAFAC®), PUIS DÉCANTATION.	64
FIGURE IV-2 : RADIOACTIVITÉS MESURÉES EN COURS DE PURIFICATION EN PHASE SOLIDE. CHAQUE ÉCHANTILLON ANALYSÉ EST IDENTIFIÉ AVEC UN NUMÉRO. FL VIDE : FLACON RÉACTIONNEL APRÈS PRÉLÈVEMENT. DÉCHET0 : VOLUME ÉLUÉ DANS LES DÉCHETS APRÈS DÉPÔT DU CONTENU DU FLACON RÉACTIONNEL SUR LA COLONNE. DÉCHET1 ET DÉCHET2 : VOLUMES ÉLUÉS DANS LES DÉCHETS APRÈS RESPECTIVEMENT 1 ^{IER} ET 2 ^{ÈME} RINÇAGE DE LA COLONNE. COLONNE : COLONNE SEP-PAK® APRÈS ÉLUTION DU COMPLEXE Tc-SSS	66
FIGURE IV-3 : ORGANIGRAMME DU MODULE TADDEO® DE PRÉPARATION DU ^{188}Re -SSS /LIPIODOL ADAPTÉ POUR L'EXTRACTION DE Re-SSS PAR LABRAFAC®	67
FIGURE IV-4 : RADIOACTIVITÉS MESURÉES EN COURS D'ÉTUDE AUTOMATISÉE DE PURIFICATION EN PHASE SOLIDE. CHAQUE ÉCHANTILLON QUI A ÉTÉ ANALYSÉ EST IDENTIFIÉ SUR CE SCHÉMA PAR UN NUMÉRO.	69

FIGURE IV-5 : RADIOACTIVITÉS MESURÉES EN COURS DE PRODUCTION AUTOMATISÉE DE ^{99m}Tc -SSS-NCL. CHAQUE ÉCHANTILLON QUI A ÉTÉ ANALYSÉ EST IDENTIFIÉ SUR CE SCHÉMA PAR UN NUMÉRO.	71
FIGURE IV-6 : ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM) DES COMPLEXES ^{188}Re -SSS ET ^{99m}Tc -SSS.....	72
FIGURE IV-7 : ORGANIGRAMME DU L'AUTOMATE PRÉPARÉ POUR LA FORMULATION DE NCL BLANCHES. LA CHRONOLOGIE DE DÉROULEMENT DES ÉTAPES EST PRÉSENTÉE PAR LES CHIFFRES EN ORDRE CROISSANT : 1A, 1B, 2, 3, 4.	78
FIGURE IV-8 : ÉVOLUTION DE LA TAILLE (Z-AVERAGE) ET DE LA DISTRIBUTION EN TAILLE (PDI) DES NCL AU COURS DES ÉTAPES (P1, P2, P3) D'OPTIMISATION DE LA FORMULATION.....	79
FIGURE IV-9 : INFLUENCE DU NOMBRE DE CYCLE SUR LA DISTRIBUTION EN TAILLE DES PARTICULES ET LE RENDEMENT DE PRODUCTION.....	80
FIGURE IV-10 : INFLUENCE DE LA QUANTITÉ DE MATIÈRES PREMIÈRES SUR LA DISTRIBUTION EN TAILLE DES PARTICULES ET LE RENDEMENT DE PRODUCTION (Q : QUANTITÉ DE MATIÈRE 1ÈRES DISPONIBLE AU MAXIMUM, N : FACTEUR DE DIVISION) .	81
FIGURE IV-11 : INFLUENCE DU VOLUME SUR LA DISTRIBUTION EN TAILLE DES PARTICULES ET LE RENDEMENT DE PRODUCTION ...	82
FIGURE IV-12 : BILAN DE L'ACTIVITÉ RADIOACTIVE DISPONIBLE ET DES R« ÉTAPE » AU COURS DE LA PRODUCTION NON AUTOMATISÉE DE ^{188}Re -SSS-NCL	83
FIGURE IV-13 : BILAN DES R« ÉTAPE » APRÈS PRODUCTIONS NON AUTOMATISÉES DE ^{188}Re -SSS-NCL	84
FIGURE IV-14 : ÉTUDE DE L'INFLUENCE DU SOLVANT SUR LE RENDEMENT D'EXTRACTION DU COMPLEXE Tc-SSS PAR LE LABRAFAC®	86
FIGURE IV-15 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DES ACTIVITÉS RADIOACTIVES DISPONIBLES ET PERDUES, INDIQUÉES PAR LE RENDEMENT D'ÉTAPE R« ÉTAPE » (%), AU COURS DE LA PURIFICATION DU COMPLEXE ^{99m}Tc -SSS.....	88
FIGURE IV-16 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE L'INFLUENCE DE LA NATURE ET DU VOLUME DE SOLVANT D'ÉLUTION SUR LA CAPACITÉ D'ENTRAÎNEMENT DU COMPLEXE ^{99m}Tc -SSS, INDIQUÉ PAR L'EFFICACITÉ D'ÉLUTION E _{ÉLUTION} , AU TRAVERS D'UNE COLONNE SEP-PAK® C8.	89
FIGURE IV-17 : SCHÉMA SUR ORGANIGRAMME DE L'AUTOMATE SYNCHROM® R&D, DES ÉTAPES DE SYNTHÈSE, DE SOLUBILISATION ET DE PURIFICATION SUR COLONNE DU COMPLEXE ^{99m}Tc -SSS	90
FIGURE IV-18 : SUIVI DES RELIQUATS DE RADIOACTIVITÉ, PAR LE R« ÉTAPE » (%), DE CHAQUE PRODUCTION AUTOMATISÉE RÉALISÉE SUR LE FLACON D'ÉLUTION DU TECHNÉTIUM ^{99m}Tc ET SUR LE FLACON DU KIT A.....	91
FIGURE IV-19 : INFLUENCE DE LA NATURE ET DU VOLUME DE SOLVANT D'EXTRACTION SUR LA CAPACITÉ DE RÉTENTION DU COMPLEXE ^{99m}Tc -SSS PAR UNE COLONNE SEP-PAK® C8 À L'AIDE DE L'AUTOMATE. R _{RELIQUAT R1} EST PROPORTIONNEL AUX PERTES DE COMPLEXE NON EXTRAIT. R _{COLONNE APRÈS TRANSFERT R1} ET R _{DÉCHETS TOTAUX} SONT RESPECTIVEMENT PROPORTIONNEL ET INVERSEMENT PROPORTIONNEL À LA RÉTENTION DU COMPLEXE SUR LA COLONNE.	92
FIGURE IV-20 : SUIVI DES PERTES EN COURS DE RINÇAGES (1 ^{ER} ET 2 ^{ÈME}) DE LA COLONNE SEP-PAK® » AVEC L'AUTOMATE. RADIOACTIVITÉ MESURÉE À L'AIDE D'UN ACTIVIMÈTRE SUR LA COLONNE SEP-PAK® ET NORMALISÉES EN R« ÉTAPE » (%). MESURES RÉALISÉES APRÈS DÉPÔT (R _{APRÈS TRANSFERT R1} , ET APRÈS CHAQUE RINÇAGE) ET APRÈS RINÇAGES (R _{APRÈS 1ER RINÇAGE} ET R _{APRÈS 2ÈME RINÇAGE})	93
FIGURE IV-21 : INFLUENCE DE LA NATURE ET DU VOLUME DE SOLVANT D'ÉLUTION AU TRAVERS D'UNE COLONNE SEP-PAK® C8 SUR LE RE ET EEL.....	94
FIGURE IV-22 : INFLUENCE DE LA NATURE ET DU VOLUME DU SOLVANT D'ÉLUTION SUR LE TRANSFERT DU COMPLEXE VERS LE RÉACTEUR 2. RADIOACTIVITÉ MESURÉE À L'AIDE D'UN ACTIVIMÈTRE ET NORMALISÉE EN R« ÉTAPE » (%). MESURES RÉALISÉES	

SUR LA COLONNE SEP-PAK® APRÈS DÉPÔT DU COMPLEXE ($R_{\text{COLONNE APRÈS TRANSFERT R1}}$) ET SUR LE RÉACTEUR 2 APRÈS ÉLUTION DE LA COLONNE (R_{R2}).	94
FIGURE IV-23 : ÉVOLUTION DU RAPPORT AR/NCL NOMBRE D'ATOMES RADIOACTIFS RAPPORTÉ AU NOMBRE DE NCL EN FONCTION DES QUANTITÉS DE MATIÈRES PREMIÈRES UTILISÉES POUR LA FORMULATION ET DE L'ACTIVITÉ RADIOACTIVE DISPONIBLE.....	95
FIGURE IV-24 : SCHÉMA SUR ORGANIGRAMME DE L'AUTOMATE SYNCHROM® R&D, DES ÉTAPES DE PRODUCTION DE ME-SSS-NCL ; (LA DERNIÈRE VERSION DU PROGRAMME REPRÉSENTE 144 LIGNES DE COMMANDES CF ANNEXE B)	97
FIGURE IV-25 : BILAN DES PERTES RADIOACTIVES ET DES $R_{\text{« ÉTAPE »}}$ APRÈS PRODUCTION	98
FIGURE IV-26 : ACTIVITÉS DISPONIBLES ET RE DE PRODUCTION	98
FIGURE IV-27 : COMPARAISON DE LA PRODUCTION NON AUTOMATISÉE DE $^{188}\text{Re-SSS-NCL}$ À LA PRODUCTION AUTOMATISÉE DE $^{99m}\text{Tc-SSS}$	99

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : FRÉQUENCES DES DIFFÉRENTS GRADES DE GLIOMES [21]	12
TABLEAU 2 : PRINCIPAUX FACTEURS MODIFIANT LE RISQUE DE SURVENUE D'UN GLIOBLASTOME, EXTRAIT DE « ÉPIDÉMIOLOGIE DES GLIOBLASTOMES » [24], [25]	13
TABLEAU 3 : TABLEAU DES PRINCIPALES CHIMIOTHÉRAPIES UTILISÉES DANS LE TRAITEMENT DES GLIOMES [21]	16
TABLEAU 4 : CIBLES MOLÉCULAIRES THÉRAPEUTIQUES TESTÉES CLINIQUEMENT DANS LE TRAITEMENT DU GLIOBLASTOME [40], [41].....	19
TABLEAU 5 : INFLUENCE DE LA TAILLE DES NCL SUR LE PHÉNOMÈNE DE PHAGOCYTOSE PAR LES MACROPHAGES	28
TABLEAU 6 : QUELQUES CARACTÉRISTIQUES COMPARÉES DU TECHNETIUM ET DU RHÉNIUM	29
TABLEAU 7 : CALCUL DES RATIOS MOLAIRES DE MATIÈRES PREMIÈRES SUR MOLES D'ATOMES RADIOACTIF	39
TABLEAU 8 : UNITÉS DE RECHERCHE AFFILIÉES AU LABEX IRON	48
TABLEAU 9 : RÉCAPITULATIF DES ÉTAPES DE LA 1 ^{ÈRE} PHASE D'OPTIMISATION DE LA FORMULATION DE NCL BLANCHES.....	62
TABLEAU 10 : RÉCAPITULATIF DES ÉTAPES DE LA 2 ND PHASE D'OPTIMISATION DE LA FORMULATION DE NCL BLANCHES. VO : VERSION ORIGINALE DE LA QUANTITÉ DE MATIÈRES PREMIÈRES NÉCESSAIRES POUR LA FORMULATION DE NCL DE 50 NM DE DIAMÈTRE. V TREMPÉ = 4,15 ML DANS LE PROCÉDÉ ORIGINALE	62
TABLEAU 11 : CONDITIONS EXPÉRIMENTALES APPLIQUÉES DANS L'ÉTUDE DE SOLUBILISATION ET PURIFICATION DU COMPLEXE Tc- SSS SUR COLONNE SEP-PAK®	65
TABLEAU 12 : CALCUL DU RENDEMENT D'EXTRACTION DU COMPLEXE RE-SSS PAR LABRAFAC®	85
TABLEAU 13 : CALCUL DU RENDEMENT D'EXTRACTION DU COMPLEXE ¹⁸⁸ Re-SSS PAR DICHLOROMÉTHANE	85
TABLEAU 14 : CALCUL DU RENDEMENT D'EXTRACTION DU COMPLEXE ¹⁸⁸ Re-SSS PAR LABRAFAC À 100°C.....	87
TABLEAU 15 : BILAN DES ACTIVITÉS DISPONIBLES DANS LE FLACON PRODUIT ET PRÉSENTES DANS L'AUTOMATE APRÈS PRODUCTION	89
TABLEAU 16 : CALCUL DU NOMBRE DE NCL PAR ML À PARTIR DU DIAMÈTRE DES PARTICULES MESURÉ PAR DLS.....	96
TABLEAU 17 : DONNÉES DE DENSITÉ DES DIFFÉRENTS COMPOSANTS DES NCL	96
TABLEAU 18 : CALCUL DU NOMBRE DE NCL PRÉSENTES SELON LES DIFFÉRENTES FORMULATIONS	96

ANNEXES

Annexe A : Programme de formulation des NCL blanches (GINA® SynChrom®), dernière version

Annexe B : Programme de formulation des Re-SSS-NCL (GINA® SynChrom®), dernière version

Annexe C : Rapport de mesure de la distribution en taille des NCL blanches

Annexe D : Rapport de mesure de la distribution en taille des Tc-SSS-NCL

Annexe E : Contrôle de la PRC des complexes de Re-SSS dans le Labrafac®

Annexe F : Contrôle de la PRC des complexes de Re-SSS dans le dichlorométhane

Annexe G : Contrôle de la PRC des complexes de Re-SSS dans le Labrafac® sous l'effet de différentes températures

**Annexe A : Programme de formulation des NCL blanches (GINA®
SynChrom®), dernière version**

Timetable

Ste	Time, s	Duratio	Event type	Value	Unit	Comment
1	00"00	00"00	NCL formulation			
2	00"00	00"00	b5 Stirrer Rea2	on		
3	00"00	00"00	A2 He SC	He		
4	00"00	00"00	B5 He Rea1/2	Rea2		
5	00"00	00"00	b3 Lift Rea2	up		
6	00"00	00"00	Reactor 2 SB	90	°C	
7	00"00	W1+ 30"	Wait for event	Rea T 2		Heat 1
8	T1+ 30"	00"00	Reactor 2 SB	50	°C	
9	+ 30"00	W2+ 00"	Wait for event	Rea T 2		
10	T2+ 00"	00"00	b3 Lift Rea2	down		
11	+ 00"00	00"00	C2 Rea2exh	open		
12	+ 00"00	10"00	E5 Trap3 out	Pro		
13	+ 10"00	00"00	E5 Trap3 out	waste		
14	+ 10"00	00"00	C2 Rea2exh	close		
15	+ 10"00	00"00	b3 Lift Rea2	up		
16	+ 10"00	00"00	Reactor 2 SB	90	°C	
17	+ 10"00	W3+ 30"	Wait for event	Rea T 2		Heat 2
18	T3+ 30"	00"00	Reactor 2 SB	50	°C	
19	+ 30"00	W4+ 00"	Wait for event	Rea T 2		
20	T4+ 00"	00"00	b3 Lift Rea2	down		
21	+ 00"00	00"00	C2 Rea2exh	open		
22	+ 00"00	10"00	E5 Trap3 out	Pro		
23	+ 10"00	00"00	E5 Trap3 out	waste		
24	+ 10"00	00"00	C2 Rea2exh	close		
25	+ 10"00	00"00	b3 Lift Rea2	up		
26	+ 10"00	00"00	A2 He SC	vent		
27	+ 10"00	00"00	Reactor 2 SB	90	°C	
28	+ 10"00	W5+ 30"	Wait for event	Rea T 2		Heat 3
29	T5+ 30"	00"00	Reactor 2 SB	50	°C	
30	+ 30"00	W6+ 00"	Wait for event	Rea T 2		
31	T6+ 00"	00"00	b3 Lift Rea2	down		
32	+ 00"00	00"00	C2 Rea2exh	open		
33	+ 00"00	10"00	E5 Trap3 out	Pro		
34	+ 10"00	00"00	E5 Trap3 out	waste		
35	+ 10"00	00"00	C2 Rea2exh	close		
36	+ 10"00	00"00	b3 Lift Rea2	up		
37	+ 10"00	00"00	A2 He SC	vent		
38	+ 10"00	00"00	Reactor 2 SB	90	°C	
39	+ 10"00	W7+ 30"	Wait for event	Rea T 2		Heat 4
40	T7+ 30"	00"00	Reactor 2 SB	74	°C	
41	+ 30"00	00"00	C2 Rea2exh	open		
42	+ 30"00	W8+ 00"	Wait for event	Rea T 2		
43	T8+ 00"	00"00	Reactor 2 SB	-	°C	
44	+ 00"00	00"00	A5 Rea Exh/Vac	Vacu		
45	+ 00"00	00"00	@3 Vacuum pump	on		
46	+ 00"00	15"00	D2 Trap2 out	Re2		
47	+ 15"00	00"00	A2 He SC	vent		
48	+ 15"00	00"00	@3 Vacuum pump	off		
49	+ 15"00	00"00	A5 Rea Exh/Vac	exhau		
50	+ 15"00	00"00	D2 Trap2 out	waste		
51	+ 15"00	00"00	C2 Rea2exh	close		
52	+ 15"00		Manual stop	Stp		

**Annexe B : Programme de formulation des ¹⁸⁸Re-SSS-NCL (GINA®
SynChrom®), dernière version (page 1/3)**

Timetable

Ste	Time, s	Duratio	Event type	Value	Unit	Comment
1	00"00	00"00	Kit A reaction and transfer to re			
2	00"00	00"00	a3 Lift Rea 1	up		
3	00"00	00"00	A2 He SC	He		
4	00"00	00"00	B3 SC4	open		
5	00"00	00"00	A1 Rea1exh	open		Solubilisation
6	00"00	30"00	C5 Trap1 out	Rea1		Solubilisation
7	30"00	00"00	C5 Trap1 out	H218O		
8	30"00	00"00	B3 SC4	close		reduction
9	30"00	30"00	A4 Vac Target	on		reduction
10	01"00	20"00	C5 Trap1 out	Rea1		
11	01"20	00"00	C5 Trap1 out	H218O		
12	01"20	00"00	A1 Rea1exh	close		first complexation
13	01"20	00"00	A2 He SC	vent		first complexation
14	01"20	00"00	A4 Vac Target	off		first complexation
15	01"20	15"00	a5 Stirrer Rea1	on		first complexation
16	16"20	00"00	Kit B addition and complexatio			
17	16"20	00"00	A2 He SC	He		
18	16"20	00"00	C4 ReO4/saline	salin		
19	16"20	00"00	b5 Stirrer Rea2	on		
20	16"20	00"00	Reactor 1 SB	100	°C	
21	16"20	15"00	C3 SC4/5	SC5		
22	16"35	00"00	C3 SC4/5	SC4		
23	16"35	00"00	A3 He Rea	on		
24	16"35	15"00	B1 SC2	SC2		
25	16"50	00"00	A3 He Rea	off		
26	16"50	00"00	A1 Rea1exh	open		
27	16"50	15"00	B3 SC4	open		
28	17"05	00"00	B3 SC4	close		
29	17"05	00"00	B1 SC2	Trap1		
30	17"05	00"00	A2 He SC	vent		
31	17"05	00"00	C4 ReO4/saline	ReO4		
32	17"05	15"00	A1 Rea1exh	close		
33	32"05	00"00	C8 purification			
34	32"05	00"00	Reactor 1 SB	30	°C	
35	32"05	W1+ 00	Wait for event	Rea T 1		
36	T1+ 00"	00"00	Reactor 1 SB	20	°C	
37	+ 00"00	00"00	A2 He SC	He		
38	+ 00"00	00"00	A1 Rea1exh	open		
39	+ 00"00	15"00	B4 Rea1 out	open		
40	+ 15"00	00"00	B4 Rea1 out	close		
41	+ 15"00	07"00	A1 Rea1exh	close		
42	+ 07"15	00"00	a3 Lift Rea 1	down		

Annexe B : (page2/3)

Timetable

Ste	Time, s	Duratio	Event type	Value	Unit	Comment
43	+ 07'15	00'00	a5 Stirrer Rea1	off		
44	+ 07'15	00'00	B2 SC3	open		
45	+ 07'15	01'00	A3 He Rea	on		
46	+ 08'15	00'00	A3 He Rea	off		
47	+ 08'15	00'00	B2 SC3	close		
48	+ 08'15	00'00	b3 Lift Rea2	up		
49	+ 08'15	00'00	Reactor 1 SB	-	°C	
50	+ 08'15	30'00	D5 Rea2 out	open		
51	+ 08'45	02'00	D4 SC7	open		
52	+ 10'45	00'00	D1 Trap3 in	elute		
53	+ 10'45	00'00	C2 Rea2exh	open		
54	+ 10'45	05'00	A2 He SC	vent		
55	+ 10'50	00'00	A2 He SC	He		
56	+ 10'50	00'00	b5 Stirrer Rea2	on		Elution
57	+ 10'50	10'00	D3 Trap2 in	elute		Elution
58	+ 11'00	02'00	A2 He SC	vent		
59	+ 11'02	10'00	A2 He SC	He		
60	+ 11'12	02'00	A2 He SC	vent		
61	+ 11'14	10'00	A2 He SC	He		
62	+ 11'24	02'00	A2 He SC	vent		
63	+ 11'26	10'00	A2 He SC	He		
64	+ 11'36	02'00	A2 He SC	vent		
65	+ 11'38	20'00	A2 He SC	He		
66	+ 11'58	00'00	D3 Trap2 in	load		
67	+ 11'58	00'00	D4 SC7	close		
68	+ 11'58	00'00	D5 Rea2 out	close		
69	+ 11'58	00'00	D1 Trap3 in	load		
70	+ 11'58	00'00	C2 Rea2exh	close		
71	+ 11'58	00'00	A2 He SC	vent		
72	+ 11'58	00'00	DCM evaporation			
73	+ 11'58	00'00	B5 He Rea1/2	Rea2		
74	+ 11'58	00'00	Reactor 2 SB	40	°C	
75	+ 11'58	00'00	A3 He Rea	on		
76	+ 11'58	00'00	A2 He SC	He		
77	+ 11'58	00'00	E5 Trap3 out	Pro		
78	+ 11'58	00'00	C2 Rea2exh	open		
79	+ 11'58	00'00	A5 Rea Exh/Vac	Vacu		
80	+ 11'58	01'00	@3 Vacuum pump	on		
81	+ 12'58	W2+ 00	Wait for event	Rea T 2		
82	T2+ 00"	01'00	A3 He Rea	off		
83	+ 01'00	00'00	@3 Vacuum pump	off		
84	+ 01'00	00'00	C2 Rea2exh	close		
85	+ 01'00	00'00	A5 Rea Exh/Vac	exhau		
86	+ 01'00	00'00	A3 He Rea	on		
87	+ 01'00	W3+ 00	Wait for event	pres1500mb		
88	T3+ 00"	00'00	E5 Trap3 out	waste		
89	+ 00'00	00'00	A3 He Rea	off		
90	+ 00'00	05'00	C2 Rea2exh	open		
91	+ 05'00	00'00	C2 Rea2exh	close		
92	+ 05'00	00'00	NCL formulation			
93	+ 05'00	00'00	b3 Lift Rea2	up		
94	+ 05'00	00'00	A2 He SC	vent		
95	+ 05'00	00'00	Reactor 2 SB	90	°C	
96	+ 05'00	W4+ 30	Wait for event	Rea T 2		Heat 1
97	T4+ 30"	00'00	Reactor 2 SB	50	°C	
98	+ 30'00	W5+ 00	Wait for event	Rea T 2		
99	T5+ 00"	00'00	A2 He SC	He		
100	+ 00'00	00'00	b3 Lift Rea2	down		
101	+ 00'00	00'00	C2 Rea2exh	open		
102	+ 00'00	10'00	E5 Trap3 out	Pro		
103	+ 10'00	00'00	E5 Trap3 out	waste		
104	+ 10'00	00'00	C2 Rea2exh	close		
105	+ 10'00	00'00	b3 Lift Rea2	up		
106	+ 10'00	00'00	A2 He SC	vent		

Annexe B : (page3/3)

Timetable

Ste	Time, s	Duratio	Event type	Value	Unit	Comment
107	+ 10"00	00"00	Reactor 2 SB	90	°C	
108	+ 10"00	W6+ 30"	Wait for event	Rea T 2		Heat 2
109	T6+ 30"	00"00	Reactor 2 SB	50	°C	
110	+ 30"00	W7+ 00"	Wait for event	Rea T 2		
111	T7+ 00"	00"00	A2 He SC	He		
112	+ 00"00	00"00	b3 Lift Rea2	down		
113	+ 00"00	00"00	C2 Rea2exh	open		
114	+ 00"00	10"00	E5 Trap3 out	Pro		
115	+ 10"00	00"00	E5 Trap3 out	waste		
116	+ 10"00	00"00	C2 Rea2exh	close		
117	+ 10"00	00"00	b3 Lift Rea2	up		
118	+ 10"00	00"00	A2 He SC	vent		
119	+ 10"00	00"00	Reactor 2 SB	90	°C	
120	+ 10"00	W8+ 30"	Wait for event	Rea T 2		Heat 3
121	T8+ 30"	00"00	Reactor 2 SB	50	°C	
122	+ 30"00	W9+ 00"	Wait for event	Rea T 2		
123	T9+ 00"	00"00	A2 He SC	He		
124	+ 00"00	00"00	b3 Lift Rea2	down		
125	+ 00"00	00"00	C2 Rea2exh	open		
126	+ 00"00	10"00	E5 Trap3 out	Pro		
127	+ 10"00	00"00	E5 Trap3 out	waste		
128	+ 10"00	00"00	C2 Rea2exh	close		
129	+ 10"00	00"00	b3 Lift Rea2	up		
130	+ 10"00	00"00	A2 He SC	vent		
131	+ 10"00	00"00	Reactor 2 SB	90	°C	
132	+ 10"00	Wa+ 30"	Wait for event	Rea T 2		Heat 4
133	Ta+ 30"	00"00	Reactor 2 SB	74	°C	
134	+ 30"00	00"00	C2 Rea2exh	open		
135	+ 30"00	Wb+ 00"	Wait for event	Rea T 2		
136	Tb+ 00"	00"00	Reactor 2 SB	-	°C	
137	+ 00"00	00"00	A5 Rea Exh/Vac	Vacu		
138	+ 00"00	00"00	@3 Vacuum pump	on		
139	+ 00"00	15"00	D2 Trap2 out	Re2		
140	+ 15"00	00"00	@3 Vacuum pump	off		
141	+ 15"00	00"00	A5 Rea Exh/Vac	exhau		
142	+ 15"00	00"00	D2 Trap2 out	waste		
143	+ 15"00	00"00	C2 Rea2exh	close		
144	+ 15"00		Manual stop	Stp		

Annexe C : Rapport de mesure de la distribution en taille des NCL blanches

Size Distribution Report by Volume

v2.0



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Sample Name: LNC blanche du 4/6/13 2 3

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: LNC blanches automatis... Dispersant Name: Water

Record Number: 15

Dispersant RI: 1,330

Material RI: 1,59

Viscosity (cP): 0,8872

Material Absorbion: 0,01

Measurement Date and Time: mardi 4 juin 2013 18:59:49

System

Temperature (°C): 25,0

Duration Used (s): 20

Count Rate (kcps): 319,9

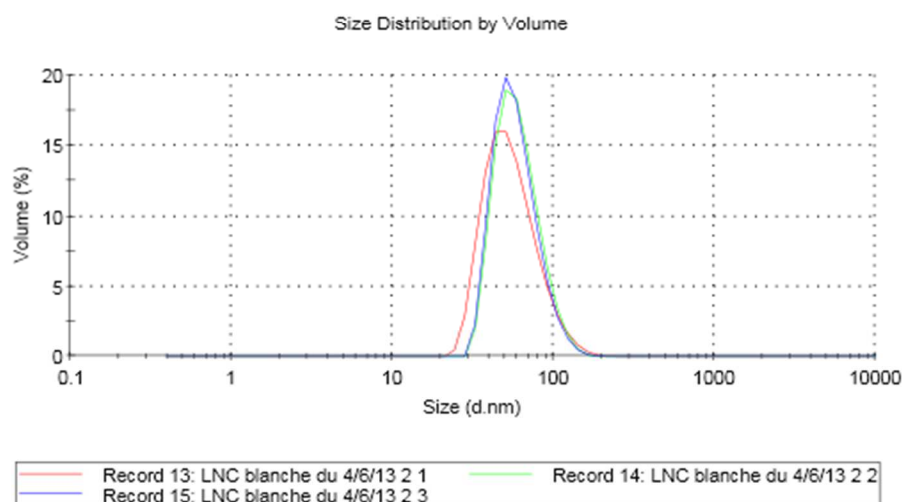
Measurement Position (mm): 4,65

Cell Description: Disposable sizing cuvette

Attenuator: 5

Results

		Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 69,44	Peak 1:	59,84	100,0	19,54
Pdl: 0,112	Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,940	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality Good				



Annexe D : Rapport de mesure la distribution en taille des Tc-SSS-NCL

Size Distribution Report by Volume

v2.0



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Sample Name: Tc-SSS LNC 3

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: LNC blanches automatis...

Dispersant Name: Water

Record Number: 21

Dispersant RI: 1,330

Material RI: 1,59

Viscosity (cP): 0,8872

Material Absorbance: 0,01

Measurement Date and Time: lundi 17 juin 2013 10:55:43

System

Temperature (°C): 25,0

Duration Used (s): 100

Count Rate (kcps): 102,1

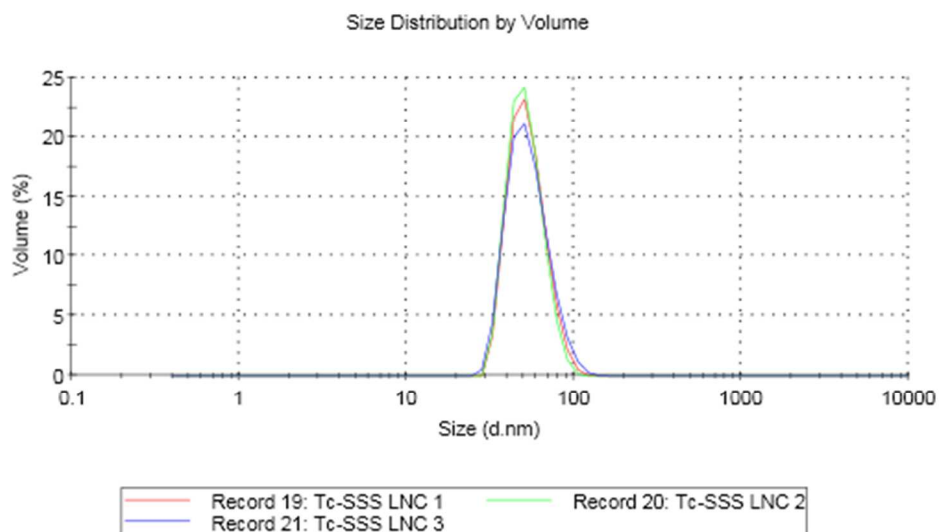
Measurement Position (mm): 4,65

Cell Description: Disposable sizing cuvette

Attenuator: 4

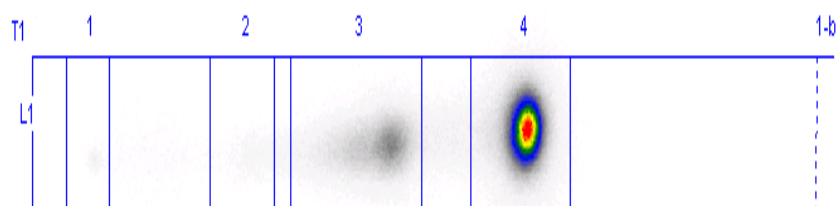
Results

	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 62,19	Peak 1: 54,36	100,0	15,65
Pdl: 0,111	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,966	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Annexe E : Contrôle de la PRC des complexes de Re-SSS dans le Labrafac®

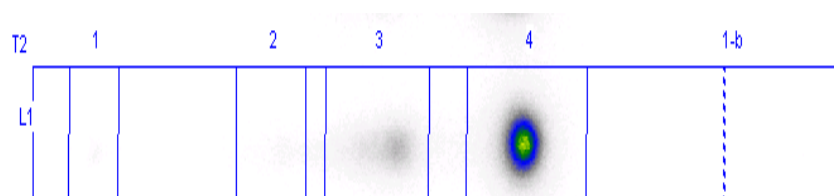
1



Lane #1
Background Subtraction: Baseline

ID	Net % Sum	Gross DLU ()	Net DLU ()
1 - Prof	0,7	103 193,3	59 095,1
2 - Prof	1,8	212 945,1	149 098,2
3 - Prof	24,7	2 230 316,2	2 098 084,6
4 - Prof	72,8	6 278 390,5	6 179 788,4
1-b - Prof		834,9	

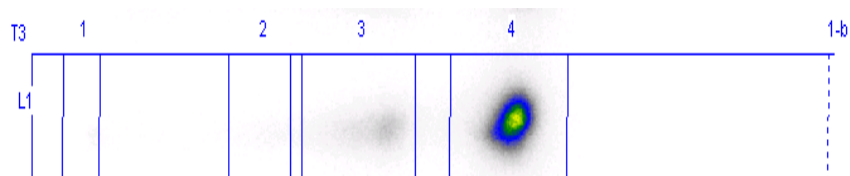
2



Lane #1
Background Subtraction: Baseline

ID	Net % Sum	Gross DLU ()	Net DLU ()
1 - Prof	0,4	79 689,3	23 745,6
2 - Prof	1,7	171 838,9	95 463,7
3 - Prof	17,9	1 135 564,8	1 018 975,0
4 - Prof	80,0	4 677 376,0	4 542 753,0
1-b - Prof		927,2	

3



Lane #1
Background Subtraction: Baseline

ID	Net % Sum	Gross DLU ()	Net DLU ()
1 - Prof	0,4	65 576,3	28 295,4
2 - Prof	1,4	152 817,5	93 213,9
3 - Prof	14,8	1 087 906,2	976 017,4
4 - Prof	83,4	5 622 506,9	5 507 406,0
1-b - Prof		815,0	

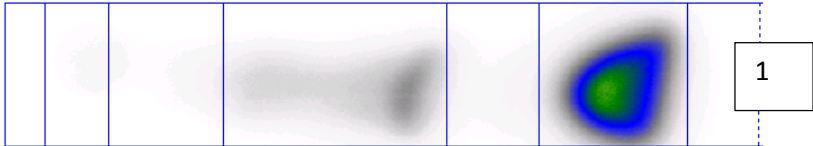
B



Lane #1
Background Subtraction: Baseline

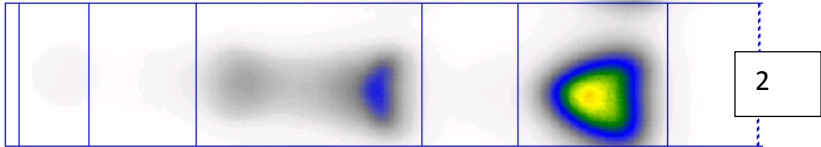
ID	Net % Sum	Gross DLU ()	Net DLU ()
1 - Prof	100,0	44 731 443,6	44 617 826,7
2 - Prof	0,0	144 634,6	-4 066,7
1-b - Prof		1 063,8	

Annexe F : Contrôle de la PRC des complexes de Re-SSS dans le dichlorométhane



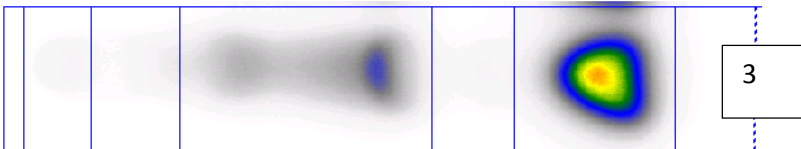
Lane #1
Background Subtraction: Baseline

ID	Net % Sum	Gross DLU 0	Net DLU 0
1 - Prof	0,7	3 829 353,7	3 145 536,9
2 - Prof	22,5	102 760 559,0	100 316 227,3
3 - Prof	76,8	344 221 056,0	342 603 253,8
1-b - Prof		12 173,9	



Lane #1
Background Subtraction: Baseline

ID	Net % Sum	Gross DLU 0	Net DLU 0
1 - Prof	0,9	5 768 694,3	5 007 765,7
2 - Prof	31,8	179 009 564,2	176 542 909,3
3 - Prof	67,2	374 406 706,7	372 769 280,3
1-b - Prof		12 190,4	

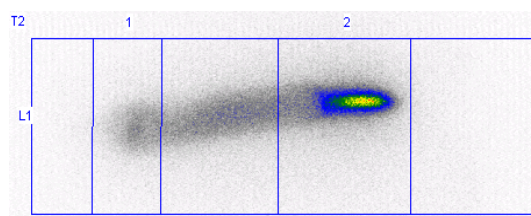


Lane #1
Background Subtraction: Baseline

ID	Net % Sum	Gross DLU 0	Net DLU 0
1 - Prof	0,9	5 149 428,6	4 515 059,0
2 - Prof	30,1	158 398 603,5	155 993 938,4
3 - Prof	69,0	359 596 546,6	358 061 395,8
1-b - Prof		10 643,7	

- Annexe G : Contrôle de la PRC des complexes de Re-SSS dans le Labrafac® sous l'effet de températures croissantes

T = 50°C

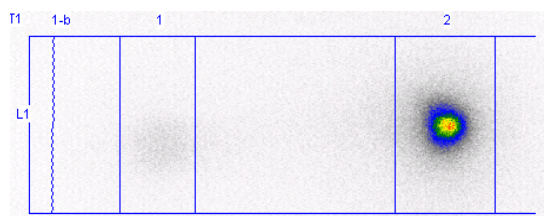


Lane #1

Background Subtraction: Baseline

ID	Net % Sum	Gross DLU ()	Net DLU ()
1 - Prof	22,0	909 613,8	909 613,8
2 - Prof	78,0	3 233 702,4	3 233 702,4

T = 75°C

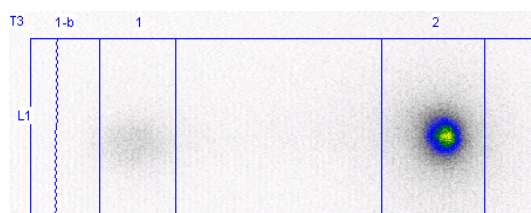


Lane #1

Background Subtraction: Baseline

ID	Net % Sum	Gross DLU ()	Net DLU ()
1 - Prof	9,5	522 421,4	176 682,1
2 - Prof	90,5	2 150 132,8	1 683 774,0
1-b - Prof		3 895,8	

T = 100°C



Lane #1

Background Subtraction: Baseline

ID	Net % Sum	Gross DLU ()	Net DLU ()
1 - Prof	9,7	462 023,8	218 833,9
2 - Prof	90,3	2 361 824,6	2 039 983,1
1-b - Prof		2 807,6	

RÉSUMÉ

L'utilisation de nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188 (^{188}Re -SSS-NCL) pour la radiothérapie interne vectorisée du glioblastome constitue une alternative thérapeutique innovante qui a présenté des résultats précliniques prometteurs. Le système nanocapsulaire lipidique développé par l'UMR_S 1066 (MINT) a montré une capacité à encapsuler le rhénium-188 sous forme d'un complexe, le bis(trithioperoxybenzoate)(dithiobenzoate) de rhénium.

Deux programmes de recherche ont été soutenus dans l'objectif du transfert à la clinique de cette nouvelle technologie. Afin de répondre aux exigences pharmaceutiques, il est important d'améliorer la production de ce potentiel radiopharmaceutique expérimental. Dans cet objectif, l'automatisation de la production des ^{188}Re -SSS-NCL est une étape clef. L'automatisation permet une production conforme à l'usage humain, reproductible et de répondre à des enjeux de radioprotection.

Au cours de ce travail, le technétium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) a été utilisé comme radionucléide modèle car moins irradiant que le ^{188}Re . Le développement de la production automatisée de NCL radioactives a été réalisé sur le Synchron® R&D (Raytest®). Dans un premier temps, la production automatisée de particules blanches, sans radioactivité, a été optimisée. Puis les étapes de synthèse, extraction et purification du complexe radioactif métal-SSS (métal= ^{188}Re ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$) ont été étudiées et transposées sur l'automate. L'extraction/purification a été réalisée en milieu liquide ou avec une phase solide et le Labrafac® a été étudié comme solvant alternatif au dichlorométhane. En parallèle des valeurs de rendement de production ont été définies par le suivi de préparations non automatisées de ^{188}Re -SSS-NCL. Par ailleurs, la proportion entre le nombre de radionucléides ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ ou ^{188}Re) et le nombre de particules disponibles dans le produit final a été calculée pour caractériser ce produit. Enfin la production automatisée de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS-NCL a été étudiée sur trois lots.

La transposition sur l'automate et l'optimisation des paramètres de nano formulation a permis la production de NCL blanches de taille 56 ± 1 nm et de PDI de $0,039 \pm 0,011$. Le Labrafac® comme solvant non toxique d'extraction du complexe Me-SSS, a présenté, à chaud, un rendement d'extraction convenable de $84,5 \pm 60$ %, mais s'est révélé d'usage problématique sur l'automate (obstruction de la colonne de chromatographie). Lors de l'étude d'extraction/purification automatisée sur colonne Sep-Pak® C8, le dichlorométhane a été le meilleur solvant d'extraction et d'élution (rendement d'extraction 40 %). Au final Les productions de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS-NCL ont présenté un rendement de 24 ± 8 % et une taille de NCL radioactive de 63 ± 8 nm. Cette étude a donc permis la production automatisée de nanoparticules radioactives dans l'objectif d'un transfert vers la clinique de cette technologie prometteuse, et doit être poursuivi dans l'objectif d'une meilleure caractérisation du produit final.

mots-clés : glioblastome, radiothérapie interne vectorisée, nanocapsule lipidique, formulation, rhénium-188, complexation, Automate de production, automatisation, chromatographie, extraction, purification, radiopharmaceutique

ABSTRACT

The use of rhenium-188 loaded lipid nanocapsules (^{188}Re -SSS-NCL) for the selective internal radiotherapy of glioblastoma is an innovative therapeutic alternative, which presents promising preclinical results. The lipid nanocapsule system developed by UMR_S 1066 (MINT) has shown an ability to encapsulate rhenium-188 in a complex form, the rhenium bis(trithioperoxybenzoate)(dithiobenzoate).

Two research programs have been approved in order to help the clinical transfer of this new technology. Production optimisation according to pharmaceuticals requirements is an important step for this potential experimental radiopharmaceutical. With this aim, the ^{188}Re -SSS-NCL automatized production is a key step. Automation of the production complies with human use, is repeatable, and deals with radioprotections issues.

During this work, technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) has been used as a less irradiating radionuclide model than ^{188}Re . The automated production development of radioactive NCL has been performed on the Synchron® R&D (Raytest®). Initially, automated production of blank particles, without any radioactivity, has been optimized. Then, synthesis steps, extraction and purification of the radioactive metal-SSS complex (metal = ^{188}Re or $^{99\text{m}}\text{Tc}$) have been studied and implemented on automated synthesis module. Extraction/purification has been conducted in liquid medium or in solid phase and Labrafac® has been studied as an alternative solvent to dichloromethane. At the same time, production output values have been determined with ^{188}Re -SSS-NCL non-automated preparation monitoring. Furthermore, the proportion between radionuclides number ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ or ^{188}Re) and particles number into the final product has been calculated for product characterization. Finally, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS-NCL automated production has been studied on 3 batches.

Transposition on automated synthesis module and optimization of nanoformulation parameters have allowed production of true Blank-NCL: size = 56 ± 1 nm and PDI = $0,039 \pm 0,011$. Labrafac® as a non-toxic extraction solvent of Me-SSS complex has presented, in warm conditions, good extraction efficiency ($84.5 \pm 60\%$), but has also presented a problematic use during automated synthesis (chromatography column obstruction). Concerning C8 Sep-Pak® column automated extraction/purification study, dichloromethane has been the best solvent for extraction and elution (extraction yield 40%). Finally, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS-NCL productions have been characterized with a yield of $24 \pm 8\%$ and a radioactive NCL size of 63 ± 8 nm. This study has allowed automated production of radioactive nanoparticles integrating the goal of a clinical transfer of this promising technology. It should be pursued with the aim of a better characterization of the final product

keywords : glioblastoma, selective internal radiotherapy, lipid nanocapsule, formulation, rhenium-188, complexation, automatized production, automation, chromatography, extraction, purification, radiopharmaceutical

Rapport gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU RAPPORT

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

