

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	5
Liste des abréviations	7
Figures	11
Tableaux	14
Introduction générale.....	15
A. Revue de la bibliographie	20
1. Le cancer du poumon non à petites cellules.....	20
1.1. Histologie	20
1.2. Étiologie	23
1.3. Biologie du cancer CPNPC	24
1.4. Épidémiologie	27
2. Diagnostic.....	30
3. Traitements du cancer du poumon	33
3.1. Principes généraux de la réponse immunitaire.....	34
3.2. Traitement du cancer à base d'immunothérapie.....	38
3.2.1. Les anticorps monoclonaux (ACM)	40
3.2.2. Principes pharmacologiques des ACM	42
3.3. Phénomènes de résistances à l'immunothérapie et microenvironnement tumoral.....	43
4. Immuno-TEP & Compagnon diagnostic	48
4.1. Immuno-TEP	49
4.2. Principaux radioisotope de l'immuno-TEP	53
4.3. Dosimétrie	54
5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux	58
5.1. Pharmacocinétique par approche non compartimentale et compartimentale	61

Table des matières

5.2. Modélisation par approche de population	63
5.3. Estimations des paramètres pharmacocinétiques	71
5.3.1. Estimation des paramètres pharmacocinétiques de population	71
5.3.2. Estimation des paramètres pharmacocinétiques individuels	72
5.4. Évaluation du modèle	73
5.5. Modélisation pharmacocinétique appliquée aux anticorps monoclonaux	78
<i>B.</i> Travaux personnels	82
1. Objectif de la thèse	82
2. Matériels et méthodes	85
2.1. Modèle murin syngénique de CPNPC	86
2.2. Mise en place d'une méthode de radiomarquage d'un anti-PDL1 murin et imagerie TEP-CT	91
3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model	97
4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium 89 in a syngenic lung cancer mice model: Can we estimate the best imaging time?	129
<i>C.</i> Discussion générale	155
<i>D.</i> Conclusion et perspectives	164
Références bibliographiques	165
Summary:	0
Résumé :	0

Liste des abréviations

Acide désoxyribonucléique	ADN
Activité Spécifique	AS
Aire Sous la Courbe / Area Under the Curve	ASC/AUC
Anaplastic lymphoma kinase	ALK
Antibody-dependent cellular cytotoxicity	ADCC
Anticorps monoclonaux	ACM
Anti-Drug Antibody	ADA
Stochastic Approximation Expectation-Maximization	SAEM
Bayesian Information criteria corrected	BICc
B-cell lymphoma	BCL
Bruit-de-fond	BDF
Cancer Pulmonaire à Petites Cellules	CPPC
Cancers Pulmonaires Non à Petites Cellules	CPNPC
Checkpoints Inhibiteurs	CI
Clairance	CL
Cluster de Différenciation	CD
Coefficient de Variation	CV
Commission Internationale de Protection Radiologique	CIPR
Compagnon Diagnostic	CDx
Compartiment	CMT
Compartmental Analysis	CA
Complement-Dependent Cytotoxicity	CDC
Complexe Majeur d'Histocompatibilité	CMH
Constant fragment	Fc
Constante d'affinité	KD
Cumputed Tomohraphy	CT
Cytochrome	CYP
Cytotoxique-T-Lymphocyte-Antigen 4 protein	CTLA-4
Déferoxamine	DFO
Degré de liberté	d.d.l
Drug-Delivery carrier	DDC
Electron-volt	eV

Liste des abréviations

Empirical Bayes estimates	EBE
Epidermal Growth Factor Receptor	EGFR
Erreur Standard	SE
Erreur Standard Relative	RSE
Fc récepteur gamma	FcγR
Fc récepteur néonatale	FcRn
Fluorodésoxyglucose	FDG
Food and Drug administration	FDA
Fraction antigen binding	Fab
Galactine-9	Gal-9
Ganglions	(N)
Goodness-of-fits plots	GOP
Human Epidermal growth factor Receptor	HER
Immunofluorescence	IF
Immunoglobuline G	IgG
Immunohistochimies	IHC
Immunoréactivité	IR
Indice de masse corporelle	IMC
Inhibiteur de tyrosine kinase	ITK
Clairance intercompartimentale	Q
Inhibiteur des Checkpoints Inhibiteurs	ICI
Interféron- γ	INF-γ
Intraveineuse	IV
Logarithme népérien	Ln
LogLikelihood	LL
Lymphocyte activation gene-3	LAG-3
Lymphocyte T	LT
Lymphocytes B	LB
Lymphocytes T cytotoxique	LTC
Lymphocytes T infiltrés	LTI
Lymphocytes T régulateurs	Tregs
Medical Internal Radiation Dose	MIRD
Métastase	(M)

Liste des abréviations

Microenvironnement tumoral	MET
Mitogen-Activated Protein Kinase	MAPK
Multi-compartmental	Multi-CMT
Myeloid-Derived Suppressor Cells	MDSC
Natural Killer	NK
Non Compartmental Analysis	NCA
Nuclear Factor	NF-kB
Organisation Mondiale de Santé	OMS
Pharmacocinétique	PK
Pharmacodynamique	PD
Phosphate buffer salin / Tampon phosphate	PBS
Potentiel hydrogène	pH
Prediction corrected VPC	pcVPC
Programmed-Cell Death Ligand 1	PD-L1
Programmed-Cell Death1	PD-1
Protein Kinase B	AKT
Pureté radiochimique	PRC
Rayonnement ionisant	RI
Récepteurs aux œstrogènes	RE
Reactive oxygen species	ROS
Signal-sur-bruit	SNB
Standard Option Recommandations	SOR
Standard uptake values	SUV
Surface Plasmon Resonance	SPR
Survie globale	OS
Survie sans progression de la maladie	SPM
T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains	TIGIT
T Helper de type 1	TH1
Target Mediated Drug Disposition	TMDD
T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3	TIM-3
Tumour Necrosis Factor	TNF
Thyroid Transcription Factor -1	TFF1
Tomodensitométrie	TDM

Liste des abréviations

Tomographie par Émission de Positon	TEP
Alanine Aminotransférase	ALT
Tumeur	(T)
Tumours Associated Macrophage	TAM
Variabilité Inter-Individuelle	IV
Vascular Growth Factor	VEGF
Visual Predictive Check	VPC
Volume de Distribution	VD
Zirconium-89	[⁸⁹ Zr]

Figures

Figure 1 : Les différents types de CPNPC chez l'homme.....	21
Figure 2 : Coupes histologiques (Hématoxyline-éosine) d'adénocarcinomes pulmonaires avec les différents modèles de croissance	22
Figure 3 : Prise en charge des petits prélèvements jusqu'au stade du génotypage.....	23
Figure 4 : Les différentes voies de signalisation du cancer.	24
Figure 5 : Répartition de la mutation EGFR dans le CPNPC.....	25
Figure 6 : Cascade de signalisation de RAS.....	26
Figure 7. Taux d'incidence et de mortalité en France selon l'année.....	28
Figure 8 : Carcinome épidermoïde peu différencié (M1b) chez un homme de 57 ans. ...	31
Figure 9 : Immunothérapie du cancer humain avec des anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1/L2	36
Figure 10 : Rôle de l'immunothérapie dans la restauration de la réponse immunitaire.	38
Figure 11 : Les différents types d'anticorps monoclonaux.	41
Figure 12 : Identification de PD-1/PD-L1. La liaison du TCR et CMH active la réponse adaptative.....	45
Figure 13 : Compagnon diagnostic.....	48
Figure 14 : Principe de la détection de la TEP.	49
Figure 15 : Image TEP-CT de quatre patients illustrant la captation tumorale du [⁸⁹Zr]atezolizumab en cinq endroits différents au jour 7 après l'injection.....	51
Figure 16 : Pharmacocinétique in vivo des vecteurs à base d'anticorps ciblant les tumeurs en fonction de leur poids moléculaire et de leur taille.	53
Figure 17 : Représentation des deux fragments d'un anticorps monoclonal	58
Figure 18 : Concentration de l'infliximab au cours du temps chez les sujets sains avec et sans sécrétion d'ADA.	60

Figures

Figure 19 : Calcul de l'AUC selon la méthode trapézoïdale.....	62
Figure 20 : Intervalle de prédiction à 90% quant à l'incertitude des prédictions due au modèle de l'erreur résiduelle.....	64
Figure 21 : Des données expérimentales à la description des données par un modèle à effet mixte.....	64
Figure 22 : Distribution des paramètres pharmacocinétiques de clairance et de volume	65
Figure 23: Modèle à 2 compartiments.....	66
Figure 24 : Représentation des différents graphes lors de l'étape de diagnostic.....	75
Figure 25: Notion de précision de l'estimation du paramètre en se basant sur l'erreur standard relative.....	76
Figure 26 : VPC ou visual predictive check basé sur 500 simulations	77
Figure 27 : Méthode d'analyse étape par étape sur l'outil Monolix lors d'une étude par approche de population.	78
Figure 28 : Modèle pharmacocinétique avec une élimination linéaire et non linéaire. ...	80
Figure 29 : Évolution de la concentration en fonction du temps avec différentes doses dans un modèle TMDD.....	81
Figure 30 : Les différents groupes de souris utilisés au cours de la thèse.....	85
Figure 31 : Disposition de la souris lors de l'injection des cellules tumorales.	86
Figure 32 : Les deux types de formations tumorales dans le modèle préclinique.....	87
Figure 33 : Induction du modèle préclinique et validation ex-vivo du développement tumoral.	88
Figure 34 : Courbe de survie (Keplan-Meir) chez la souris CPNPC traitée ou non par immunothérapie.	89

Figures

Figure 35 : Schéma d'étude pour l'étude de l'expression de TIM-3 chez les souris CPNPC	89
Figure 36 : Évolution qualitative de l'expression de TIM-3 chez la souris CPNPC traitée avec de l'anti-PD1. Les flèches blanches indiquent l'expression de TIM-3.	90
Figure 37 : Contrôle qualité de l'étape de chélation par HPLC.	92
Figure 38 : Radio-HPLC contrôle permettant en fin de radiosynthèse.	93
Figure 39: Schéma d'acquisition de données TEP-CT et prélèvements sanguins chez les groupes A & B	95

Tableaux

Tableau 1 : Résumé des mutations dans le CPNPC	26
Tableau 2 : Survie moyenne à 5 ans en fonction du stade de la pathologie	29
Tableau 3 : Évolution de la survie globale sur 5 ans dans le CPNPC et traitements associés en fonction du stade de développement.....	34
Tableau 4 : Interaction entre les différentes cellules du systèmes immunitaire et fonctions associées de TIM-3	37
Tableau 5 : Résumé des études cliniques anti-PD1 dans le CPNPC.....	40
Tableau 6 : Les différents effets pharmacodynamiques des ACM	42
Tableau 7 : Type de profile de tumeur et microenvironnement tumoral.	46
Tableau 8 : Nature des rayonnements ionisants.....	56
Tableau 9 : Résumé des caractéristiques des ACM.	61
Tableau 10 : Modèle pharmacocinétique de population utilisé pour les checkpoints inhibiteurs	81

Introduction générale

Le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) se place en 2^{ème} position en termes de nouveaux cas de cancer dans le monde avec 2,2 millions de cas après le cancer du sein. En revanche, il est classé 1^{er} en termes de mortalité avec plus de 1,7 millions des cas. Bien que les dernières avancées et des découvertes thérapeutiques ont amélioré la prise en charge des patients, il n'en demeure pas moins que le cancer du poumon reste un enjeu de santé.

L'une des raisons de ce funeste résultat réside majoritairement dans notre capacité à le détecter précocement. Le CPNPC est généralement asymptomatique et est détecté de façon fortuite à la suite d'examens d'imagerie. En effet, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 70% des cas de CPNPC seraient détectés à des stades avancés (III ou IV). La seule thérapie actuellement efficace reste la lobectomie sur des stades I ou II avec une combinaison chimiothérapie-radiothérapie.

Il existe actuellement, différents types de traitements dans le CPNPC qui dépendent principalement du stade de progression de la maladie. Avec les récentes avancées, des thérapies basées sur des inhibiteurs de checkpoints inhibiteurs (ICI) portant sur l'expression de protéines comme PD-L1 (*Programmed Death Ligand-1*) ont vu le jour. Ces traitements permettent de restaurer la réponse immunitaire en bloquant l'action inhibitrice de certaines molécules présentent dans le microenvironnement tumoral (MET) ou à la surface des cellules tumorales. Leur administration est conditionnée par l'expression de molécules qu'on nomme checkpoint inhibiteurs (CI).

Le principe des ICI se base sur l'inhibition des interactions entre la tumeur et le MET. On appelle MET l'ensemble des cellules « gravitant » autour du tissu tumoral, on y retrouve notamment des cellules immunitaires comme les lymphocytes T régulateurs (Treg) ou les *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) et des cellules effectrices comme les lymphocytes T cytotoxiques (LTC) ou encore les lymphocytes *Naturel Killers* (NK). Ces cellules sont à l'origine de l'organisation de la réponse immunitaire. Cette dernière repose sur un équilibre de signaux d'activations (moléculaire co-stimulatrice) et de signaux d'inhibitions (moléculaire co-inhibitrice).

Les molécules inhibitrices de la réponse immunitaire sont naturellement exprimées afin de la réguler et éviter une suractivation néfaste pour l'ensemble de l'organisme. Cependant, dans

Introduction générale

certaines pathologies comme le cancer, le tissu tumoral peut surexprimer certains CI en réponse à une attaque du système immunitaire afin de la limiter ou l'arrêter.

Parmi les CI, on retrouve PD-L1 qui est surexprimé dans certains cancers. Sa liaison avec le *Programmed death-1* (PD-1), présent à la surface des cellules immunitaires, provoque une baisse de l'activation, prolifération, sécrétion des cytokines et la survie des LTC. Un autre CI, la galactine-9 (Gal-9) se lie avec le *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*, provoquant une dysfonction de ces derniers et une perte de sécrétion de INF- γ .

Ces interactions entre la tumeur et le MET ont donné lieu à des thérapies afin de restaurer la réponse immunitaire. Les ICI sont la classe thérapeutique la plus étudiée aujourd’hui et comprennent des anticorps monoclonaux (souvent des IgG) anti-PD1, anti-PDL1 et anti-CTLA-4. Certains sont utilisés en clinique comme le nivolumab ou le pembrolizumab (anti-PD1). En venant se fixer sur les lymphocytes cytotoxiques, ces anticorps empêchent l’interaction PD-1/PD-L1 et permettent de restaurer le système immunitaire. L’utilisation de ces immunothérapies a donné des résultats très encourageants sur des sous populations ciblées (tumeurs PD-L1 $^{+}$) améliorant ainsi les durées de vie de ces patients et assurant des réponses durables en comparaison aux chimiothérapies classiques.

Les conditions d’administrations de ces traitements reposent principalement sur le taux d’expression de PD-L1 sur des biopsies. Dans le CPNPC, le pembrolizumab est administré en 1^{ère} ligne lorsqu’on observe un seuil d’expression PD-L1 supérieur à 50%, le nivolumab en 2^{ème} ligne de traitement pour un seuil d’expression de PD-L1 supérieur à 1%. Les taux d’expression de PD-L1 sont obtenus par immunohistochimie et permettent de prédire l’efficacité du traitement chez certaines sous-population en fonction de leur immuno-score (densité d’expression de PD-L1).

En revanche, certains patients possédant des immuno-scores nuls semblent bénéficier des traitements par immunothérapie tandis que des patients avec des immuno-score non nuls ne montrent pas de réponse au traitement. Plusieurs études font mention de ces observations et deux hypothèses ont émergé où il existerait une hétérogénéité de l’expression de PD-L1 et une évolution de l’expression de PD-L1 dans le temps.

En dépit des très bons résultats de l’immunothérapie, les taux de réponses pour ces traitements dans le CPNPC sont seulement compris entre 15 et 20% et où une grande majorité de patients développent des résistances primaires [1]. Il devient donc nécessaire de développer un outil diagnostic permettant d’une part de mieux cibler les patients potentiellement répondeurs aux

Introduction générale

ICI et de détecter l'apparition des phénomènes de résistances afin d'améliorer et de personnaliser la prise en charge des patients. C'est dans ce contexte que des compagnons diagnostics radiomarqués basés sur l'imagerie par Tomographie par Émission de Positron (TEP) pourraient offrir une solution appropriée. La TEP est une méthode d'imagerie fonctionnelle basée sur le marquage d'un vecteur (molécule ciblant un tissu ou des cellules) par un isotope radioactif émetteur β^+ . Il existe une catégorie d'entre eux qualifiée d'immuno-TEP. Cette dernière se base sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, hautement spécifique de la cible, couplés à des radionucléides.

Mes travaux de thèse auront pour but de visualiser l'expression tumorale de PD-L1 à l'aide d'un anti-PDL1 radiomarqué au zirconium-89 dans un modèle murin de CPNPC, d'en étudier la dosimétrie et la pharmacocinétique (PK). Ces travaux se concentreront ensuite dans la mise en place d'un modèle PK permettant de décrire la distribution du traceur chez la souris CPNPC, d'analyser les éventuelles sources de variabilité et de simuler le rapport signal-sur-bruit (SNB). Ce modèle PK permettra d'établir un rationnel sur la sélection du meilleur temps d'imagerie après l'injection du traceur basé sur le SNB. Ce SNB correspondra au rapport de la prédition de la concentration tumorale divisée par la prédition de la concentration pulmonaire.

Ce manuscrit débutera par une revue bibliographique. Dans un premier temps, une vue d'ensemble sur le CPNPC sera développée où nous évoqueront entre-autres son diagnostic, ses traitements et les phénomènes de résistances sous-jacents. Cette section sera suivie par la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux et la méthodologie des modèles non linéaires à effets mixtes, correspondant à l'approche de population utilisée pour l'analyse des données PK. Enfin, on s'intéressera aux compagnons diagnostics et aux différents isotopes pour l'immuno-TEP. Dans un deuxième temps, on s'intéressera aux travaux personnels réalisés durant cette thèse qui se divisent en deux étapes portant sur la mise en place d'un modèle murin de CPNPC et de l'application de la modélisation PK de population sur l'anticorps radiomarqué :

- **1^{ère} partie : Mise en place d'un modèle syngénique murin de CPNPC :**

Le modèle murin de CPNPC se base sur le modèle de Howard Li. Il consiste dans l'administration de 10 000 à 15 000 cellules CMT167 dans la région thoracique. Afin de valider la prise tumorale, une analyse par scanner ou tomodensitométrie (CT ou TDM) a été réalisé 1 semaine après injection des cellules tumorales. Dans un deuxième temps, une validation de l'expression de PD-L1 a été réalisé sur des coupes histologiques appartenant aux souris CPNPC. Pour valider l'utilisation du modèle préclinique pour évaluer les phénomènes de résistances,

Introduction générale

nous avons réalisé un suivi de l'expression de TIM-3 sur un lot de souris CPNPC et traitées par anti-PD1 durant 4 semaines.

- **2^{ème} partie : Imagerie de PD-L1 dans un modèle murin de CPNPC appliquée au [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1**

Cette deuxième partie de mes travaux de thèse peut se diviser quant à elle en 3 différentes sous-parties.

- Mise au point du radiomarquage d'un anti-PDL1 murin

Nous verrons la mise au point une méthode de radiomarquage d'un anti-PDL1 (Immunoglobuline G) murin au zirconium-89. Ce dernier est un émetteur β^+ avec une période physique de 78,4 h compatible avec la période biologique des anticorps monoclonaux. La méthode de radiomarquage se base sur l'utilisation d'un chélateur le p-NCS-Bz-DFO.

- Tests *in vitro* du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1

Des tests *in vitro* de *binding* (KD) et d'immunoréactivité (IR) seront mis en place afin de s'assurer de l'intégrité et de la capacité de fixation de l'anticorps radiomarqué à sa cible. Ces tests seront complétés par un test de stabilité dans un tampon phosphate (PBS) et dans le plasma humain.

- Biodistribution et dosimétrie du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 chez la souris saine & souris CPNPC

La biodistribution du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 sera évaluée chez la souris saine (n=7) et la souris CPNPC (n=24) à l'aide de prélèvements sanguins à 1h, 3h, 24h, 48h, 72h et 168h ainsi qu'à l'aide de l'imagerie TEP à 24h, 48h, 72h et 168h après injection intraveineuse (I.V) caudale du traceur. L'analyse de la biodistribution portera sur cinq organes d'intérêt que sont le cœur, les poumons, le foie, les reins et les os, communs aux cohortes souris saines et CPNPC. La dernière cohorte inclura en plus la tumeur. L'évaluation de la dosimétrie sera réalisée uniquement chez les souris saines à l'aide de l'application de la modélisation PK de population. La spécificité du marquage du traceur sera réalisée en co-injectant un excès d'anti-PDL1 chez des souris CPNPC.

- **3^{ème} partie : Développement d'un modèle pharmacocinétique (PK) appliquée au [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 et estimation du meilleur temps d'imagerie**

Nous avons développé un modèle PK en utilisant l'approche de population pour décrire la biodistribution du traceur chez les souris CPNPC au niveau du compartiment systémique

Introduction générale

(sanguin), pulmonaire et tumorale. Afin d'évaluer le meilleur temps d'imagerie, nous nous sommes basés sur deux critères que sont la rapport signal-sur-bruit et la période physique du zirconium-89. Le rapport signal-sur-bruit se définit comme le rapport entre les concentrations tumorales divisées par les concentrations pulmonaires. Dans l'approche PK ce sera la prédition de la concentration tumorale du modèle divisée par la prédition de la concentration pulmonaire du modèle. Ce modèle PK servira également pour décrire les différentes constantes de transferts et d'analyser la variabilité PK chez les souris CPNPC.

A. Revue de la bibliographie

1. Le cancer du poumon non à petites cellules

1.1. Histologie

Chez l'homme, on retrouve deux types histologiques : Le cancer du poumon à petites cellules (CPPC) et le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) [2]–[4]. Ces 2 types cellulaires se comportent différemment dans leur progression et leur sensibilité aux traitements. Les CPNPC représentent 85% des cancers du poumons [5]–[7]. Avec 3 sous-types histologiques : les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes à grandes cellules indifférenciées [8] (Figure 1).

- Les adénocarcinomes représentent environ 40% des cas de CPNPC. Ce sont des tumeurs épithéliales avec une différenciation glandulaire. Cette différenciation peut être reconnue morphologiquement par la présence de glandes ou de muscosécrétion [9]. Les adénocarcinomes se présentent souvent d'emblée à un stade métastatique [10]. Le sous-type histologique adénocarcinome est peu associé au tabagisme par rapport au cancer épidermoïdes [11].
- Les carcinomes épidermoïdes ou Malpighien représentent également entre 30 et 40 % des cas de CPNPC. Ce type de cancer se caractérise par une différenciation au niveau des cellules épithéliales [12] reconnues morphologiquement par la présence de ponts d'union ou de kératine. Les cellules sont souvent localisées au niveau proximale, péri ou endo bronchique.
- Les carcinomes à grandes cellules représentent 10 à 15% des cas de CPNPC [13]. Il s'agit de tumeurs qui ne présentent pas de critères de différenciations par rapport aux carcinomes épidermoïdes, glandulaires ou à petites cellules. Il s'agit d'un diagnostic d'exclusion par rapport aux autres variants du type histologique à grandes cellules. On retrouve une forme variante : le carcinome neuroendocrine à grandes cellules.

1. Le cancer du poumon non à petites cellules

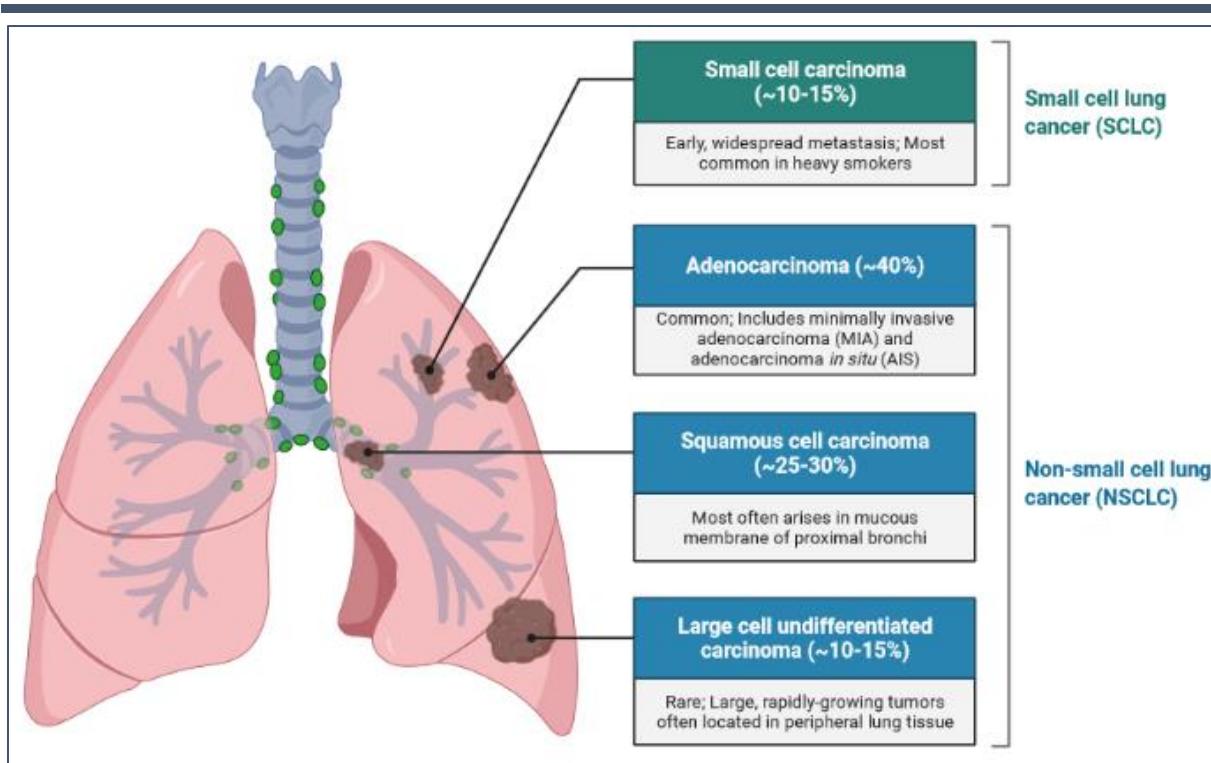


Figure 1 : Les différents types de CPNPC chez l'homme. Inspirée de Lynne Eldridge (2020, 13 Août), What Is Non-Small Cell Lung Cancer et extraite de Biorender.

L'origine des cellules cancéreuses pulmonaires demeure à ce jour inconnue cependant certaines hypothèses stipulent que les différents sous-types histologiques dérivent de cellules bien distinctes et localisées dans un microenvironnement spécifique [3]. Le type histologique et sous-type histologique sont déterminés par un examen anatomopathologique après biopsie où une première investigation architecturale du tissu prélevé est réalisée. Cette analyse s'effectue par une coloration hématoxyline-éosine et du bleu Alcian où on détermine l'architecture générale de la prolifération (Solide, acineuse, papillaire, etc.) et si la tumeur présente de petites cellules ou de grandes cellules. Afin de différencier entre les petites cellules par rapport aux grandes cellules, celles-ci sont comparées par rapport à la taille de lymphocytes : Si la taille dépasse 3 cellules lymphocytaires matures alors on considère la tumeur appartenant au sous-type histologique CPNPC et à l'inverse si la taille est inférieure à 3 cellules lymphocytaires on considère la tumeur appartenant au sous-type histologique CPPC. La présence de glande, prolifération lipidique, de papille ou de mucosécrétion permet d'orienter le diagnostic en faveur d'un adénocarcinome alors que la présence de ponts d'union et/ou de kératinisation oriente vers un carcinome épidermoïde (Figure 2).

1. Le cancer du poumon non à petites cellules

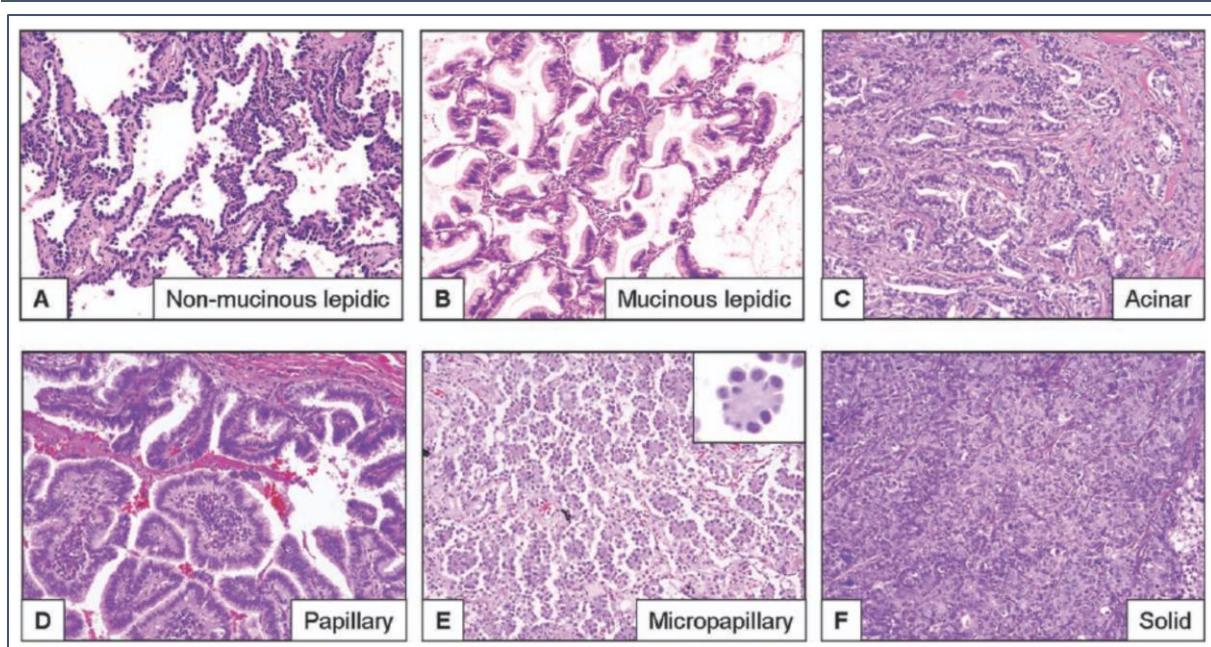


Figure 2 : Coupes histologiques (Hématoxyline-éosine) d'adénocarcinomes pulmonaires avec les différents modèles de croissance. A) Lipidique (Non musigène), B) Lipidique (Musigène), C) acineux, D) papillaire, E) Micropapillaire et F) Solide. (Zoom X 100, coupe 5 µm) [11].

En fonction de la localisation des prélèvements, il est nécessaire d'avoir recours à l'immunohistochimie dès lors que l'analyse morphologique ne permet pas de discriminer le type et sous-type histologique. Des anticorps dirigés contre la protéine P40 et TTF1, marqueurs nucléaires, sont respectivement révélateurs de sous-type histologiques carcinomes malpighiens ou adénocarcinomes. D'autres biomarqueurs sont recherchés afin d'orienter le traitement comme les mutations EGFR, ALK, ROS, ou l'expression de protéine comme PD-1 ou PD-L1 (Figure 3) [14].

Chaque tumeur est classée selon un stade TNM. Ce classement est déterminé en fonction de la taille et de la location de la tumeur (T), le nombre de site des ganglions régionaux atteints (N) et la présence ou non de métastase (M). On peut classer la maladie selon un stade I à IV d'après le classement TNM. Les stades I et II correspondent à des formes localisées de la tumeur, les stades III sont des formes localement avancées et le stade IV regroupe les formes disséminées ou métastatiques. La détermination du type histologique, du sous-type histologique ainsi que la classification TNM permettent d'orienter le choix de la stratégie thérapeutique à adapter [15].

1. Le cancer du poumon non à petites cellules

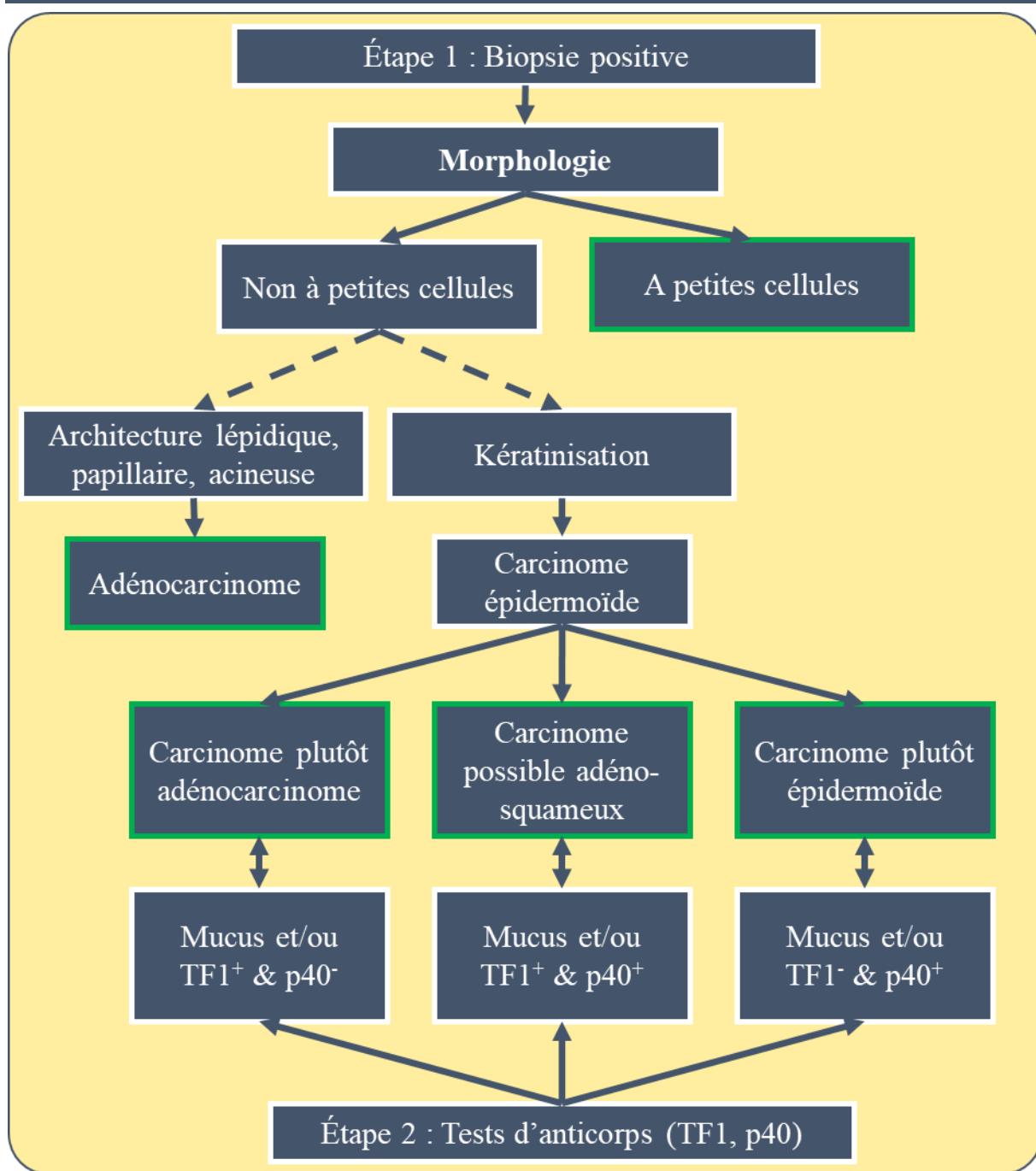


Figure 3 : Prise en charge des petits prélèvements jusqu'au stade du génotypage (adapté du tableau récapitulatif de l'OMS 2015), figure inspirée et simplifiée de Rouquette-Lasalle et al [14].

1.2. Étiologie

Parmi les principales causes, le tabagisme représente 85% à 90% des cancers du poumon et pour cause, on y retrouve plus de 60 molécules cancérogènes et parmi elles, 20 seraient hautement associées avec le développement du cancer du poumon [16]. Les processus

1. Le cancer du poumon non à petites cellules

moléculaires de cancérisation dans le cancer du poumon ne sont pas tous liés au tabagisme malgré le fait qu'un fumeur présente 20 à 30 fois plus de risques de développer un cancer. Il existerait également un risque d'apparition du cancer du poumon chez des patients ayant un historique familial du même type de cancer [17]. D'autres sources peuvent être à l'origine de l'apparition du développement du cancer du poumon comme l'amiante ou encore l'exposition au Radon-222.

1.3. Biologie du cancer CPNPC

Les cellules cancéreuses peuvent être soumises à des voies de signalisations amplifiées impliquées dans leur survie et leur prolifération anarchique. Les molécules oncogéniques sont codées par des proto-oncogènes, portion de gènes transformants, conférant le phénotype cancéreux à une cellule normale eucaryote. Ces oncogènes sont répertoriés en fonction de classes de protéines pour lesquels ils codent.

On retrouve les facteurs de croissances avec la famille FGF, les récepteurs transmembranaires avec la famille EGF, les protéines G avec la famille RAS, les tyrosines kinases membranaires, les tyrosines kinases cytosoliques et les protéines à activité nucléaire. La Figure 4 proposée par D. Hanahan et R.A. Weinberg représente ces différentes voies de signalisations comprenant la prolifération cellulaire, l'évasion aux signaux de contrôle de croissance, évasion et métastase, immortalité cellulaire, induction de l'angiogenèse et l'échappement aux signaux apoptotiques [18], [19].

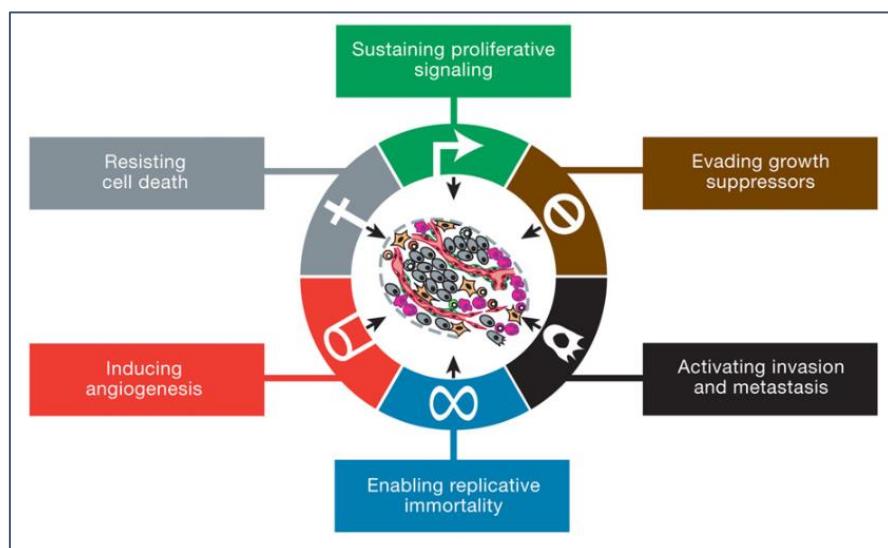


Figure 4 : Les différentes voies de signalisation du cancer d'après D. Hanahan et R.A. Weinberg [18], [19].

1. Le cancer du poumon non à petites cellules

Voie EGFR

La grande famille EGFR est une famille de récepteur transmembranaire avec une activité tyrosine induisant la croissance cellulaire [20]. Le récepteur EGFR est surexprimé dans 70% des cas de CPNPC[21], [22]. Ce type de mutation semble commun au CPNPC mais plus particulièrement dans le sous-type adénocarcinome, les non-fumeurs et les femmes. Une analyse sur un peu plus de 2 000 cas de cancer du poumon, la mutation EGFR était présente (figure 5) dans [23]:

- 45% chez les non-fumeurs
- 39% chez les femmes
- 30% des adénocarcinomes
- 10% des cas chez les hommes
- 7% des cas chez les fumeurs.

Ce type de mutation est recherchée systématiquement afin d'orienter le traitement (Utilisation d'inhibiteur à la tyrosine kinase, voir dans la section traitement).

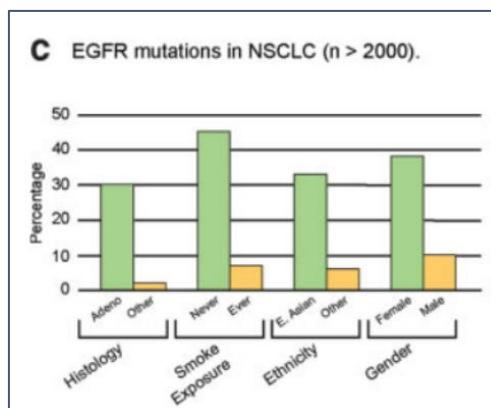


Figure 5 : Répartition de la mutation EGFR dans le CPNPC.

Voie RAS

La superfamille des protéines RAS sont des protéine G impliquées dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. La mutation sur le gène codant pour les protéines RAS est assez fréquente (10 à 15% des CPNPC) et plus spécifiquement dans les adénocarcinomes où elle se retrouve dans 20 à 30% des cas [24], [25].

La superfamille RAS active d'autres voies de signalisation comme la voie de PI3K, AKT et PTEN [26], [27]. Son effecteur est l'AKT possède des propriétés oncogéniques telles que la prolifération, l'apoptose, la croissance cellulaire mais également la motilité cellulaire. La voie

1. Le cancer du poumon non à petites cellules

AKT est régulée par la protéine PTEN qui permet d'inhiber son activité. PTEN se trouve fréquemment mutée dans le CPNPC où son expression est diminuée provoquant une perte de contrôle de la voie AKT [28].

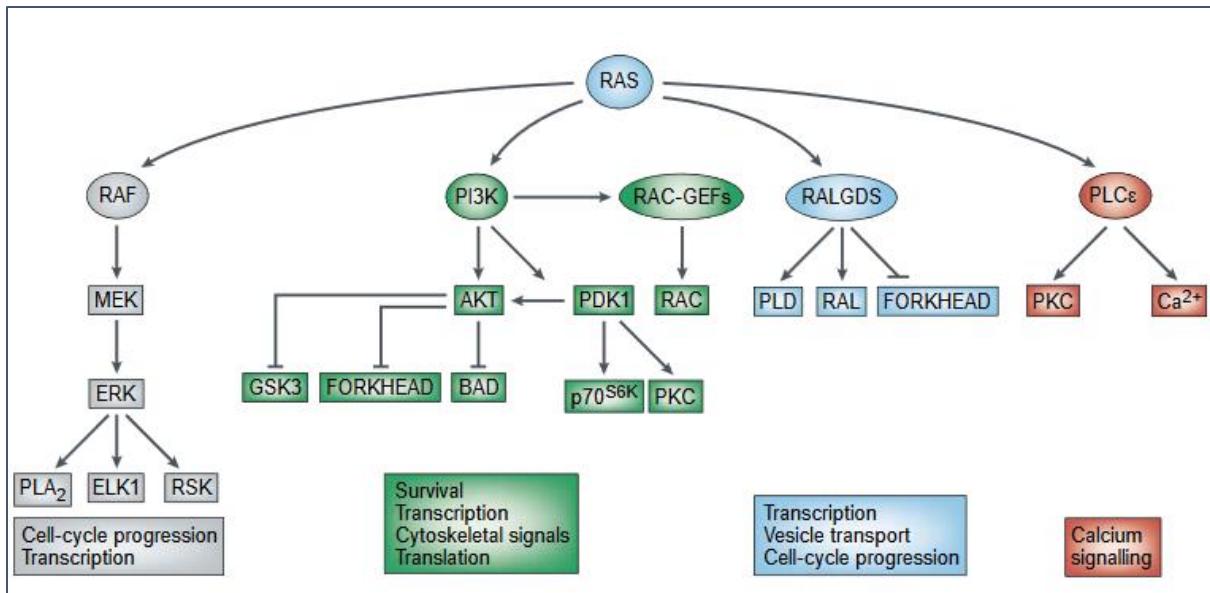


Figure 6 : Cascade de signalisation de RAS [24].

La voie p53

D'autres mutations peuvent avoir lieu sur des régions assurant le contrôle cellulaire, l'une d'elle concerne le gène codant la protéine p53. Le rôle de p53 est d'arrêter le cycle cellulaire afin de réparer la cellule ou d'entrer en apoptose en réponse à un stress oncogénique [29]. La protéine p53 présente un taux de mutation élevé dans le sous-type adénocarcinomes et carcinomes épidermoïdes avec une fréquence de 46 et 81% respectivement [30], [31]. La mutation du gène codant pour la protéine p53 est corrélée avec le tabagisme.

Tableau 1 : Résumé des mutations dans le CPNPC.

Mutation	Taux d'apparition dans le CPNPC	Rôle / Voie de signalisation
Instabilité microsatellite	2 à 70%	Changement au niveau de la structure d'ADN
Voie EGFR EGFR HER2	70%	Croissance cellulaire

1. Le cancer du poumon non à petites cellules

Voie RAS/RAF	RAS	10 à 15%	Prolifération, différenciation et survie
	KRAS	20 à 30%	Différenciation
	BRAF	3%	Effecteur de RAS
Voie RAS/PI3K	PI3K	3%	Prolifération, Croissance, réarrangement du cytosquelette
	AKT	~ 90%	Prolifération, apoptose, croissance et motilité. Angiogénique en association avec VEGF & HIF
Voie p53	P53	46% Adénocarcinome & 81% Épidermoïde	Suppresseur de tumeur et d'oncogène

1.4. Épidémiologie

Au niveau mondial le cancer du poumon représente le cancer le plus fréquent et il est la première cause de décès par cancer dans le monde. Son incidence est de 1,82 millions de nouveaux patients (soit 12,9% du nombre total de cancer) et il représente 1,7 million de décès (soit 19,4% du nombre total de décès par cancer) [2], [32]–[34]. Les taux d'incidences dans le monde augmentent et varient d'un pays à un autre avec des taux d'incidences et de mortalité plus élevés en Europe de l'Est et en Asie de l'Est chez l'homme et des taux plus faibles en Afrique reflétant ainsi des différences géographiques liées au mode de vie [35]–[37].

En 2018 en France, le nombre de patients atteints cancer du poumon était estimé à plus de 46 000 cas et le nombre de décès enregistrés était supérieur à 33 000. Le cancer du poumon est le deuxième cancer solide le plus fréquent chez l'homme et le troisième le plus fréquent chez la femme. Le cancer du poumon se place au premier rang des décès liés au cancer chez l'homme et au deuxième rang chez la femme après le cancer du sein. Pour l'homme, l'âge médian du diagnostic est de 67 ans alors que celui du décès est de 69 ans. Pour la femme, les chiffres sont de 65 ans et de 68 ans respectivement montrant ainsi que le cancer du poumon reste une maladie aggressive d'évolution rapide malgré les progrès dans la prise en charge des patients [38]. Le taux d'incidence du cancer du poumon chez l'homme est quasiment stable depuis 1990 avec une variation annuelle moyenne -0,3% sur la période 2010 à 2018. En revanche, il connaît une

1. Le cancer du poumon non à petites cellules

forte augmentation chez la femme avec + 5,3% par an sur la période 1990 à 2018 (Figure 7). Cette évolution chez la femme est due en partie à une augmentation du tabagisme [39].

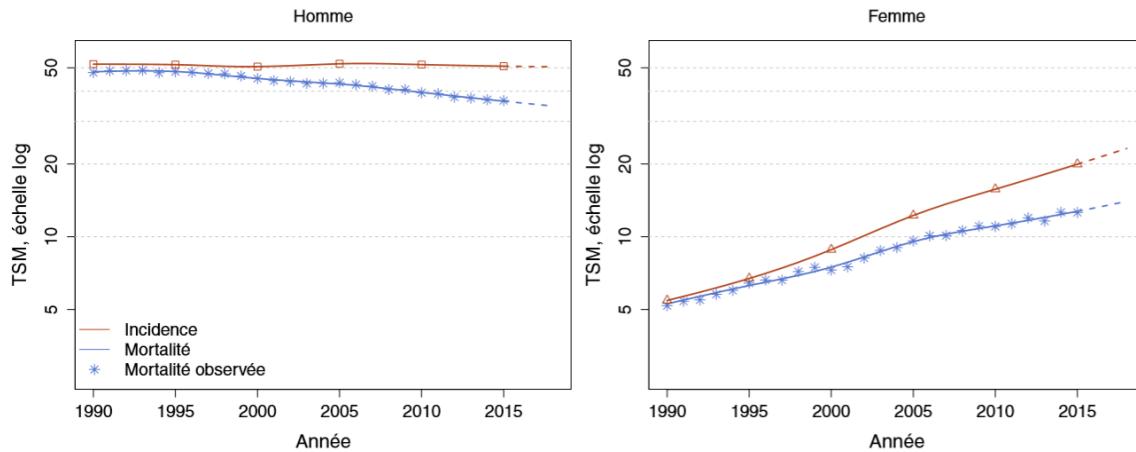


Figure 7 : Taux d'incidence et de mortalité en France selon l'année. (TSM : Taux standardisés mondial). Source : Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Volume 1 - Tumeurs solides.

La répartition par incidence histologique dépend principalement du tabagisme. On retrouve une prédominance des fumeurs ou ex-fumeurs du tabac (95% des cas présentent le sous-type histologique carcinome épidermoïde) [40]. Ceci peut s'expliquer par l'évolution biologique du cancer épidermoïde qui prend origine au centre du poumon (fumée de cigarette qui s'accentue au centre) alors que l'adénocarcinome évolue en périphérie des poumons [36], [41], [42].

L'adénocarcinome présente une incidence plus élevée chez les femmes non fumeuses que chez les hommes non-fumeurs. Des études montrent que les récepteurs aux œstrogènes (RE) pourraient expliquer le tropisme en faveur de l'adénocarcinome chez les femmes. [43]–[45].

La survie moyenne à 5 ans du cancer du poumon est comprise entre 10 et 20% et dépend principalement de la précocité du dépistage de la pathologie [46]. La survie moyenne évolue de 10 à 92% en fonction du stade de détection [15], [47], [48]. D'après l'OMS, on estime que 70% des cas de cancer de poumon sont diagnostiqués aux stades III et IV, cette détection tardive peut s'expliquer par l'apparition des symptômes plus ou moins graves orientant les patients vers les cliniciens [49]. Même présents, les symptômes peuvent être non-spécifiques de la maladie conduisant à une détection à des stades plus ou moins tardifs. En comparaison, 91% des cancer de la prostate et 80% mélanomes sont diagnostiqués à des stades précoce en raison de leur symptômes spécifiques.

1. Le cancer du poumon non à petites cellules

Maghfoor *et. al* ont regroupé les différents stades d'évolutions de la pathologie avec la moyenne de survie à 5 ans chez les patients où la moyenne de survie diminue en fonction du stade d'avancement de la pathologie (Tableau 2) [50]. On remarque que l'espérance de survie à 5 ans diminue de façon dramatique avec le stade de la pathologie soulignant l'importance d'un diagnostic précoce.

Tableau 2 : Survie moyenne à 5 ans en fonction du stade de la pathologie [50].

Stade	TNM	Survie à 5 ans
0	Carcinome <i>in situ</i>	-
IA	T1N0M0	67%
IB	T2N0M0	57%
IIA	T1N1M0	55%
	TN1M0	39%
IIB	T3N0M0	38%
	T3N1M0	25%
IIIA	T1-T3N2M0	23%
	T4 NX à N3M0	7%
IIIB	TX à T4 N3M0	3%
	Tous T	
IV	Tous N	1%
	M1	

2. Diagnostic

Comme vu précédemment, le diagnostic du cancer du poumon impacte significativement la survie des patients à 5 ans. Plus le diagnostic est précoce, plus les chances de survie augmentent. Les symptômes les plus fréquents restent généralement non spécifiques de la pathologie et la détection du cancer reste majoritairement fortuite avec des stades souvent avancés. Pour rappel, 70% des cas sont à des stades III et IV dans la classification TNM et la survie à 5 ans de dépasse pas les 10%. De plus, sur 100 cas de cancer du poumon, 20 sont opérables (stade I & II) et 25% à 50% d'entre eux survivent au-delà de 5 ans. Ces symptômes aspécifiques sont généralement de l'asthénie, l'anorexie et la perte de poids. Dans une étude publiée en 2003 de Beckales et al [51], les auteurs ont tenté de retracer les différents symptômes qu'on retrouve fréquemment chez les patients souffrant du cancer du poumon et en fonction du stade d'avancement. Sur une étude de 678 patients, 6% étaient asymptomatiques, 27% présentaient des symptômes liés à la tumeur primitive. La plupart des patients présentaient des signes non-spécifiques comme l'anorexie ou l'asthénie pour 27% d'entre eux ou des symptômes spécifiques métastatiques chez 32% d'entre eux. Le pronostic de la pathologie varie en fonction des symptômes présents lors de la détection du cancer et les patients ne présentant pas de symptômes lors du diagnostic aurait une meilleure survie [52].

Dans une étude de Buccheri & Frerigno sur une cohorte de 1277 patients suivies depuis 1989 à 2002 avec un cancer du poumon, on retrouve dans 87,6% des cas des symptômes chez comme la toux (50%), dyspnée (33,9%), douleur thoracique (31,5%) ou infection thoracique (19,7%) contre 12,4% patients asymptomatiques [53].

Le diagnostic du cancer du poumon repose sur **un examen clinique** qui a pour objectif d'évaluer et rechercher les signes cliniques évocateurs de la maladie. Cet examen est suivi d'une **radiographie du thorax** permettant de mettre en évidence des anomalies au niveau du poumon. S'il y a une suspicion, **un scanner thoracique (TDM)** est réalisé pour repérer des lésions pulmonaires (taille d'au moins 3 mm) existantes ainsi que des atteintes ganglionnaires. Lorsqu'une lésion est détectée, on **une biopsie** est réalisée afin de récupérer des échantillons du tissus tumoral et d'en analyser le contenu : type et sous-type histologique, mutation de type EGFR ou KRAS ainsi que des biomarqueurs comme PD-L1. La biopsie permet ensuite d'orienter le traitement à l'aide de thérapie ciblées.

L'Imagerie TEP-[¹⁸F]FDG

2. Diagnostic

La TDM permet dans un premier temps d'identifier correctement le stade (T) de la tumeur et l'attente des ganglions lymphatiques (N) [54]. Ce dernier joue un rôle fondamental dans le diagnostic des masses pulmonaires ainsi que des nodules [55]. D'après SOR ou Standard Option Recommandations [56], une lésion pulmonaire tissulaire isolée de plus de 1 cm sans critère de bénignité en imagerie, justifie l'exploration en TEP-[¹⁸F]FDG (TEP-FDG). L'examen TEP-FDG trouve l'une de ses meilleures indications dans le diagnostic du cancer du poumon. Le [¹⁸F]FDG est médicament radiopharmaceutique qui permet d'avoir une imagerie de type métabolique basée sur la consommation du glucose. En effet, comme les cellules tumorales sont généralement actives (division cellulaire) elles auront tendance à avoir une consommation énergétique plus importante. Une fois internalisé, le [¹⁸F]FDG est bloqué à l'intérieur des cellules tumorales. En se désintégrant, il émet des positons ou particules β^+ . Ces dernières rencontrent des électrons (e^-) et s'annihilent en émettant deux photons γ de 511 keV à 180°. Ces photons sont nommés photons d'annihilation et sont détectés à l'aide d'une caméra dédiée. Une fois les événements détectés, le signal sera superposé aux données du tomodensitomètre (TDM) permettant de localiser le signal sur un plan anatomique (Figure 8). Cependant cette technique présente des limites car en cas d'infection et d'inflammation comme dans des cas de tuberculose ou histoplasmosse, le [¹⁸F]FDG peut être à l'origine de faux-positifs en étant capté ou consommé par des cellules de l'immunité.

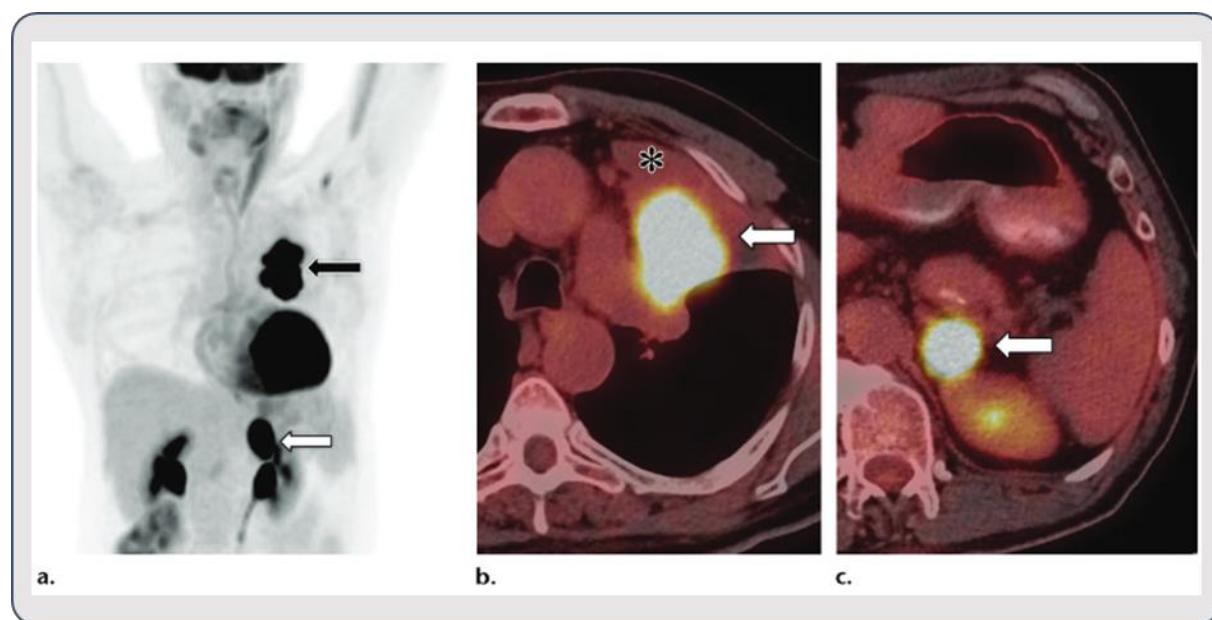


Figure 8 : Carcinome épidermoïde peu différencié (M1b) chez un homme de 57 ans. (a) L'image coronale de projection d'intensité maximale de la TEP-CT au [¹⁸F]FDG montre une masse du lobe supérieur droit (flèche noire) et une métastase surrenalienne solitaire (flèche blanche). (b) Image axiale fusionnée [¹⁸F]FDG TEP-CT du thorax montre une masse de 6,5 cm (flèche

2. Diagnostic

blanche)) dans le lobe supérieur gauche. Notez le poumon adjacent atélectatique () sans absorption de [¹⁸F]FDG. (c) L'image TEP-CT axiale et fusionnée de l'abdomen montre un nodule métastatique (flèche blanche) de 2,6 cm marqué au FDG dans la glande surrénale gauche [57].*

3. Traitements du cancer du poumon

Comme dans la majorité des cancers, la prise en charge du patient diffère en fonction du stade d'avancement du cancer du poumon. Le tableau 3 résume les différents traitements en fonction du stade de la maladie. Lorsque cela est possible, le traitement par chirurgie reste le principal traitement du cancer du poumon. La chirurgie a pour objectif le retrait de la totalité de la tumeur une fois localisée. Le retrait du tissu tumoral implique l'ablation partielle du poumon (lobectomie) ou totale du poumon (pneumectomie) [58]. Au stade IV (métastatique), le traitement du cancer du poumon consiste en l'administration multimodale de chimiothérapie (exemple : dérivés de platine), chimiothérapie ciblée sous condition d'expression de biomarqueurs ou de mutations comme les mutations EGFR dans le cas des inhibiteurs aux tyrosines kinases ou l'expression de PD-L1 dans l'administration des traitements par l'immunothérapie.

Durant les 20 dernières années, le traitement du CPNPC a évolué de l'utilisation des thérapies à base de cytotoxique vers l'utilisation de thérapies ciblées. Les dérivés de platine (Cisplatine en combinaison avec d'autres cytotoxiques) représentaient le standard pour le traitement du CPNPC au stade avancé [59]. D'autres combinaisons thérapeutiques ont vu le jour avec l'utilisation du pemetrexed et l'ajout du bevacizumab (anticorps monoclonal) dirigé contre le VEGF mais sans impact significatif sur la survie du patient [60]. L'avènement des thérapies ciblées a changé le paradigme du traitement du CPNPC. L'incorporation du génotypage de la tumeur lors du traitement permet d'apporter une médecine individualisée où des taux de réponses plus importants et une amélioration globale de la survie des patients qui en bénéficient ont été observés [61].

Le traitement basé sur l'expression de biomarqueurs a vu le jour en 1990 avec l'utilisation du gefitinib, inhibiteur aux tyrosines kinases (ITK) dirigée contre EGFR avec une amélioration de la symptomatologie et une réponse radiologique partielle [62]. En comparaison avec la combinaison carboplatine & paclitaxel, le gefitinib a augmenté la survie sans progression de la maladie (PFS à 9,5 mois en comparaison de 6,3 mois) [63].

L'aspect biomoléculaire du cancer du poumon est très hétérogène et différentes mutations peuvent orienter le clinicien vers le choix d'une thérapie ou une autre. Cette hétérogénéité dépend également du type et sous-type histologique du tissu tumoral.

3. Traitements du cancer du poumon

Tableau 3 : Évolution de la survie globale sur 5 ans dans le CPNPC et traitements associés en fonction du stade de développement.

Stade	Survie globale sur 5 ans	Traitements
I	71-89 %	Lobectomie ou pneumotomie
		Lobectomie ou pneumotomie
II	55-64 %	avec chimiothérapie & radiothérapie adjuvantes
III	11-37 %	Radiothérapie & chimiothérapie
IV	6 %	Chimiothérapie ou thérapie ciblée (ITK, immunothérapie)

ITK : Inhibiteurs aux tyrosines kinases

3.1. Principes généraux de la réponse immunitaire

Avant de s'intéresser aux traitements par immunothérapie, nous devons comprendre comment s'organise la réponse immunitaire dans le contexte tumoral. La réponse immunitaire se base sur trois principes fondamentaux : (1) la détection des cellules du non-soi, (2) la production des effecteurs et de fonctions luttant spécifiquement contre les cellules infectées ou malignes et (3) le développement d'une réponse durable dans le temps [64]. La réponse immunitaire se sépare en deux : la non-spécifique et la spécifique.

Réponse innée

La réponse non-spécifique ou innée est une réponse rapide du système immunitaire sans reconnaissance spécifique du pathogène ou de l'allergène. Cependant cette réponse n'est pas durable. La réponse innée se base sur deux types de cellules : les NK et les phagocytes (neutrophiles, monocytes et macrophage) [65].

Réponse acquise

La réponse immunitaire acquise ou adaptative implique le développement de mémoire contre les différents antigènes. Cette forme d'immunité est lente et repose sur l'acquisition de nouvelles compétences des cellules T et B naïves [64]. La première étape de l'activation de la réponse immunitaire acquise consiste en la rencontre des cellules lymphocytaires T à l'aide du *T-Cell Receptor* (TCR) avec les cellules présentatrices d'antigènes ou de peptide par le biais de

3. Traitements du cancer du poumon

complexe majeur d'histocompatibilité. Cette première interaction s'accompagne de signaux co-stimulant permettant une activation optimale des cellules immunitaires.

Processus d'activation

L'une des molécules co-stimulatrices est le CD28. Le plus connu est CD28 et est présent sur les cellules lymphocytaires naïves. Il se lie au CD80/CD86. L'absence de cette liaison résulte en une apoptose chez les cellules lymphocytaires, une incapacité de production des interleukines-2 ainsi que la perte des signaux de prolifération. Le CD28 permet d'améliorer la capacité de production des cytokines chez les cellules immunitaires ainsi que le signal anti-apoptotique BCL2 augmentant la durée de la réponse immunitaire [66]–[69]. Cette capacité d'activation des cellules lymphocytaires a été observée lors d'une étude clinique du TGN1412, anticorps monoclonal anti-CD28 agoniste, ayant entraîné une libération massive de cytokines chez 6 volontaires sains après seulement 90 min d'injection intraveineuse [70]. D'autres molécules participent également à l'activation du signal comme les CD40, CD137, CD27 ainsi que le CD134.

Processus d'inhibition

Afin de réguler le signal d'activation, d'autres molécules co-inhibitrices du signal sont exprimées comme CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*), PD-1/PD-L1 (*Program death ligand 1*), TIM3 (*T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3*), Lag-3 (*lymphocyte activation gene-3*) ou encore TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*). Ces molécules apparaissent progressivement lors de la réponse immunitaire entraînant une régulation négative à la fin de la réponse immunitaire. Cette régulation est indispensable d'un point de vue physiologique en évitant l'apparition d'un emballement auto-immun.

CTLA-4

La molécule CTLA-4, appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig) et participe à l'inhibition des lymphocytes. Son rôle dans l'organisme est essentiel au maintien de l'homéostasie de la réponse immunitaire. Chez des souris déficitaires du gène CTLA-4, les lymphocytes ont prolifié de façon anarchique et ont provoqué une défaillance majeure des organes menant à une mortalité précoce (3 à 4 semaines) [71].

PD-1/PD-L1

3. Traitements du cancer du poumon

D'autres molécules inhibitrices exprimées sont les PD-1/PD-L1. PD-1 est une molécule exprimée sur les LT, NK et LB activées [72]. PD-1 se lie sur deux cibles PD-L1 et PD-L2. PD-L1 est quant à lui exprimé sur différentes sous population de macrophages et est régulée positivement au niveau des cellules tumorales en réponse aux INF- γ et d'autres médiateurs de l'inflammation [73], [74]. La voie d'activation PD-1/PD-L1 contrôle l'induction et la maintenance de la tolérance immunitaire au sein du microenvironnement tumoral. L'interaction entre PD-1 et ses deux ligands provoque des baisses au niveau de l'activation, prolifération, sécrétion des cytokines et la survie des LT [75]. PD-L1 quant à lui est exprimé sur des cellules immunitaires activées comme les LT et LB et sur les cellules tumorales afin d'échapper à la réponse antitumorale (Figure 9) [76]–[78]. La voie PD-1/PD-L1 est modulée par différentes voies de signalisation des cellules cancéreuses, on retrouve la voie PI3K (*Phosphatidine-3-kinase*) /AKT (*Protein Kinase B*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) ou encore NF- κ B (*Nuclear Factor*) [75]. A l'inverse de CTLA-4 dont l'expression débute dès les premiers instants de la réponse immunitaire, l'expression de PD-1 sur les cellules du système immunitaire (LT, LB et NK) débute après l'activation de ses dernières afin d'exercer son rôle d'inhibition du signal [79].

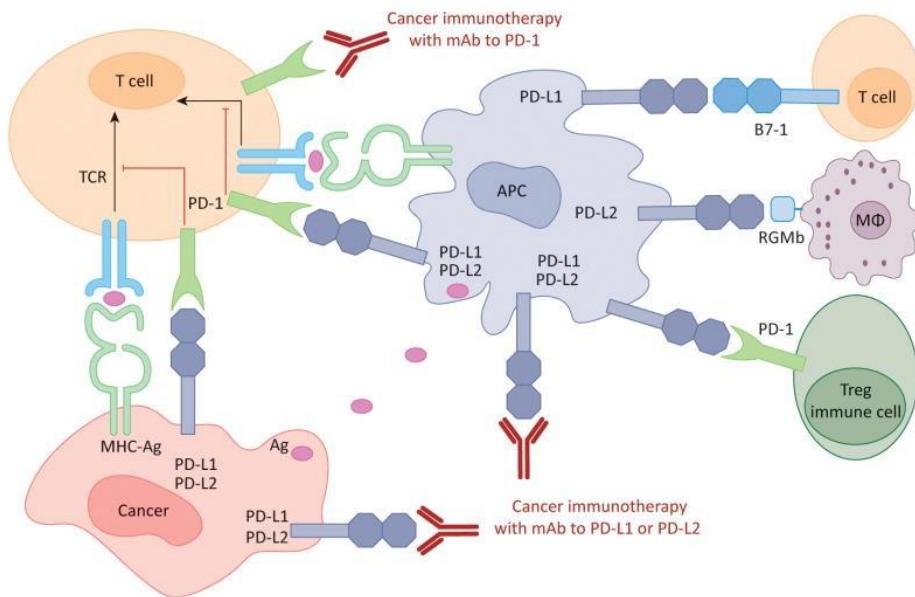


Figure 9 : Immunothérapie du cancer humain avec des anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1/L2. APC : Cellules présentatrice d'antigènes, B7-1 : CD80, Ag : Antigène, MHC : Complexe majeur d'histocompatibilité [76].

TIM-3

3. Traitements du cancer du poumon

La protéine transmembranaire TIM-3 a été initialement caractérisée comme une molécule présente sur les cellules lymphocytaires Th1 (*T helper de type 1*) responsables de la production de INF- γ . TIM-3 peut également être exprimée à la surface d'autres cellules du système immunitaire comme les LT régulateurs, LT-CD8 (cytotoxique), LT-B, cellules NK ainsi que des cellules myéloïdes suppressives. TIM-3 possède différents ligands au sein de l'organisme et de par sa fonction inhibitrice, permet de réguler les LT Th1 et les LT-CD8 lors de sa liaison à la galectine-9 (Gal-9) en diminuant la production d'INF- γ (Tableau 4) [80]. La protéine Gal-9 est également exprimée au niveau des cellules tumorales comme décrite par l'article de Garnier et al chez des patients atteints du cancer rénal [81]. Du fait de son expression sur les différentes cellules immunitaires, TIM-3 présente un intérêt grandissant en conséquence de son association aux maladies auto-immunes et aux cancers.

Tableau 4 : Interaction entre les différentes cellules du système immunitaire et fonctions associées de TIM-3.

Cibles cellulaires	Fonctions	Référence
Lymphocyte T-CD8	Dysfonction, INF- γ	[82]
Lymphocyte T-CD4 (helper)	Dysfonction, INF γ	[83]
Lymphocyte T-CD4 (régulateur)	Activité suppressive	

INF- γ : Interféron gamma

Ainsi, la réponse immunitaire acquise s'organise autour de phénomènes d'activation et d'inhibition pour lutter contre les pathogènes (bactéries, virus) ou les cellules cancéreuses. Cette régulation est assurée par des biomarqueurs que l'on nomme checkpoints inhibiteurs (CI) dans le cas de l'inhibition du signal immunitaire. Cependant, ces phénomènes de régulations peuvent être détournés par les cellules tumorales afin de limiter voire d'inhiber la réponse immunitaire en surexprimant des molécules comme PD-L1, CTLA-4 ou encore TIM-3. Ces interactions entre la tumeur et le MET ont donné lieu à des thérapies basées sur la levée de l'inhibition produite par l'interaction des CI et leurs ligands respectifs : l'immunothérapie (Figure 10). Ce sont en majorité des anticorps hautement spécifique qui viennent se fixer sur la cible (comme CTLA-4, PD-L1 ou PD-1) et restaurer la réponse immunitaire.

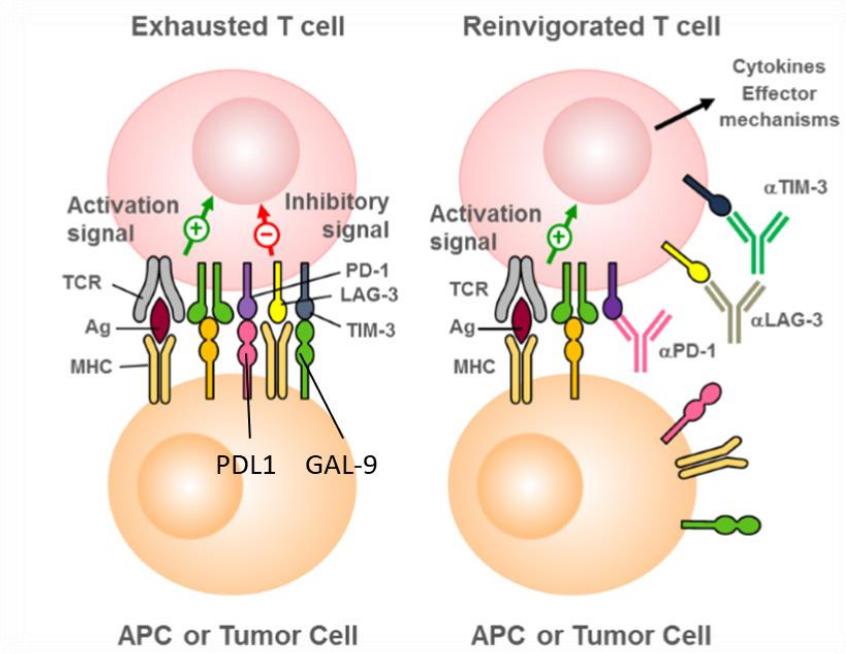


Figure 10 : Rôle de l'immunothérapie dans la restauration de la réponse immunitaire [84].

3.2. Traitement du cancer à base d'immunothérapie

Parmi ces thérapies innovantes, l'anti-CTLA-4 (ipilimumab) a été le premier anticorps monoclonal (immunoglobuline G1) à être approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour bloquer l'action inhibitrice du CTLA-4 dans le mélanome [85].

Devant l'efficacité thérapeutique de l'ipilimumab pour le traitement du mélanome, différents essais cliniques ont vu le jour afin de traiter le cancer du poumon sur l'action cytotoxique induite par l'anti-CTLA-4. Cependant, l'immunothérapie à base d'ipilimumab n'a pas présenté d'aussi bons résultats que ceux pour le traitement du mélanome. D'autres combinaisons incluant l'anti-CTLA-4 avec la chimiothérapie (dérivé de platine, taxol) ont été testées mais ont échouées à produire des résultats aussi intéressant que dans le mélanome. Il semblerait donc que cette voie de signalisation n'est pas prédominante dans le CPNPC.

De nombreux cancers, dont le CPNPC, surexpriment le PD-L1 suggérant un mécanisme commun des cancers pour l'échappement à la réponse du système immunitaire [86], [87]. En effet, PD-1 intervient lors de la tumorigénèse en désactivant les lymphocytes T reconnaissant l'antigène spécifique de la tumeur [73]. Son interaction avec PD-L1 inclut entre autres l'inhibition de la prolifération, de la survie, du signal effecteur (relargage de cytokine & de cytotoxique) ainsi que le recrutement et l'aide à différentiation des CD4⁺ en Treg augmentant ainsi l'inhibition de la réponse immunitaire des LTC [88]. PD-L1 est également exprimé sur

3. Traitements du cancer du poumon

une grande population de LT infiltrés à l'origine de la réponse antitumoral où ils sont « épuisés » ou dans un état pseudo-inactif. Le blocage de cette interaction PD-1/PD-L1 permet de restaurer la fonction et l'activité du système immunitaire des LT-CD8 à l'aide d'anticorps comme l'anti-PD1 (pembrolizumab ou nivolumab) ou l'anticorps anti-PDL1 (atezoluzumab) utilisés en clinique [89]–[91].

Le pembrolizumab est utilisé en 1^{ère} et 2^{ème} ligne de traitement, chez les patients avec un cancer présentant un stade avancé avec un niveau d'expression de PD-L1 supérieur à 50% [92]. En 2^{ème} ligne de traitement, le nivolumab (anti-PD1) et l'atezoluzumab (anti-PDL1) sont administrés chez les patients indépendamment du statut PD-L1.

Le pembrolizumab est une IgG4 hautement spécifique dirigée contre PD-1 (Tableau 5). En se liant à PD-1, il permet de bloquer l'interaction en ses deux ligands PD-L1 & PD-L2 [93]. Au cours de l'étude Keynote 001, le taux de réponse était de 19,4% avec une durée médiane de réponse de 12,5 mois [94]. On remarquera que dans cette étude, le taux de réponse était plus important (45,2%) entre les patients exprimant la protéine PD-L1 au-delà de 50% que ceux compris entre 1 à 49%. Cette différence au niveau de l'expression de PD-L1 s'est également vue sur la médiane de survie avec 11,3 mois chez les patients précédemment traités présentant un taux d'expression allant de 1 à 49% en comparaison à une médiane de survie de 15,4 mois chez les patients précédemment traités ayant un taux d'expression supérieur à 50% [95].

L'administration des anticorps anti-PD1 ou anti-PD-L1 est soumise à un seuil d'expression de PD-L1 avant administration chez le patient. Le taux d'expression de ce biomarqueur est réalisé à l'aide de tests d'immunohistochimies (IHC) afin d'obtenir une valeur prédictive de la réponse au traitement. Cependant, ces tests manquent de spécificité et de sensibilité. Ils dépendent du type d'anticorps, des valeurs seuils admises (nombre de PD-L1 sur la surface des cellules tumorale) mais également de l'évolution de l'expression de PD-L1 et du site de la biopsie.

À noter que l'expression de PD-L1 n'est pas le seul facteur permettant de déterminer la réponse ou non de l'immunothérapie. En effet, il existe des différences de réponses au sein même des sous-types histologiques et de leurs interactions avec le MET. Pour l'adénocarcinome, le facteur clé de la réponse immunitaire réside dans l'interaction des cellules LT-B régulatrice alors que pour les carcinomes épidermoïdes, ce sont les macrophages qui sont au centre de la réponse immunitaire [96].

3. Traitements du cancer du poumon

Tableau 5 : Résumé des études cliniques anti-PD1 dans le CPNPC.

Nom de l'étude	Histologie, PD-L1	Line de traitement	Bras contrôle de l'étude	Résultats de l'étude	Hazard ratio
KEYNOTE-024	CPNPC, PD-L1 > 50%	Traitements naïve	OS : mois	14,2 OS : mois	0,63 (0,47 – 0,86), p = 0,002
KEYNOTE-042	CPNPC, PDL1 > 1%	Traitements naïve	OS : mois	12,1 OS : mois	0,85 (0,71 – 0,93), p = 0,0018
CheckMate 026	CPNPC, PD-L1 > 1%	Traitements naïve	OS : mois	13,2 OS : mois	1,02 (0,80 – 1,30), P = NS
OAK	CPNPC	Second ligne	OS : 9,6 mois	OS : mois	0,73 (0,62 – 0,87), p = 0,0003

OS : Overall survival (Survie globale), NS : Non significatif.

L'expression de PD-L1 peut varier avec le temps et avec le traitement administré aux patients (chimiothérapie ou radiothérapie). Des études précliniques montrent que le taux d'expression de PD-L1 peut varier lors de cycles de radiothérapies. D'autres sources de variabilités peuvent être imputables aux sites d'extraction de l'échantillon tumoral au cours de la biopsie. En effet, qu'il s'agisse de la tumeur primaire ou d'une métastase, l'expression de PD-L1 peut être hétérogène.

3.2.1. Les anticorps monoclonaux (ACM)

Le traitement par immunothérapie repose pour une partie sur l'administration d'anticorps qui interagissent avec des cellules clé du système immunitaire. Ces anticorps sont des immunoglobulines qui se lient de façon spécifique à leur cible avec des valeurs d'affinité de l'ordre du nanomolaire (10^{-9} M) dans le cas du pembrolizumab et du picomolaire (10^{-12} M) dans le cas de l'atezolozumab. Cette spécificité des anticorps monoclonaux pour leur cible présente l'avantage de cibler préférentiellement les cellules tumorales qui surexpriment le PDL-1 des et des cellules saines.

3. Traitements du cancer du poumon

La structure des anticorps se divise en deux parties : La partie (I) reconnaissant spécifiquement l'antigène et la partie (II) effectrice du signal permettant de recruter les cellules responsables de la réponse immunitaire. Les parties (I) et (II) se composent respectivement de deux chaînes de polypeptides légères et lourdes. La partie (I) est nommée Fab (*fraction antigen binding*) responsable de la reconnaissance de spécifique de l'antigène. Celle-ci est hautement variable et permet d'acquérir cette spécificité de reconnaissance contre l'antigène. La partie (II) est appelé Fc (*Constant fragment*), non variable. Elle permet la médiation de la réponse physiologique des anticorps suite à la fixation de la partie Fc sur les cellules effectrices comme les NK ou LT-CD8 [97]. Le site de fixation sur les cellules endogènes est nommé Fc récepteur gamma (Fc γ R). Par conséquent, en fonction du types cellulaires, des effets différents peuvent être observés comme l'initiation de cytotoxicité liaison-dépendante à l'égard de la cible. Parmi les effecteurs, on retrouve en majorité des Ig de types G1 et G3 [98]. Les IgG1 sont particulièrement efficace dans la promotion de cytotoxicité liaison-dépendante envers la cellule cible, et de ce fait, ce sont les types d'Ig les plus utilisées et recherchées dans le traitement du cancer. On retrouve le trastuzumab, le cetuximab, le pembrolizumab ou encore l'atezolizumab.

Le premier ACM utilisé en thérapie chez l'homme provenait de la souris, cependant, il présentait très peu d'efficacité à induire une réponse cytotoxique chez l'homme et sa clairance était rapide. Ainsi, de nouvelles combinaisons d'ACM ont vu le jour en intégrant des composants d'immunoglobuline humaine. Il en existe 4 types et sont regroupés dans la Figure 11 avec des degrés d'immunogénicité et des propriétés pharmacocinétiques / pharmacodynamiques différentes.

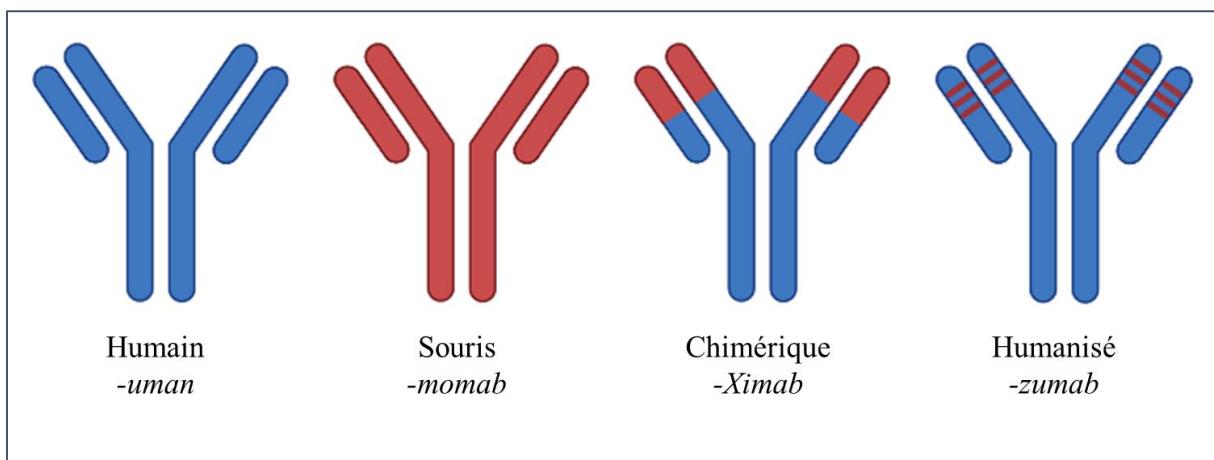


Figure 11 : Les différents types d'anticorps monoclonaux.

3. Traitements du cancer du poumon

Les anticorps chimériques comprennent 65% à 90% de protéines humaines et possèdent une Fc humaine permettant ainsi l'action cytotoxique des ACM. Quant aux humanisés, ils présentent 95% de protéines humaines [99].

3.2.2. Principes pharmacologiques des ACM

La haute affinité des anticorps pour un antigène spécifique les rend particulièrement intéressants pour cibler une molécule responsable de la pathologie et limiter ainsi les interactions avec d'autres cellules non tumorales [100]. Le Tableau 6 résume les différents modes d'actions.

La neutralisation : Cette action permet de bloquer la liaison entre un ligand et son récepteur en vue d'arrêter la cascade de signalisation. Dans le traitement du cancer, ce type d'interaction permet la perte de l'activité de la cellule tumorale, la baisse de la prolifération ainsi que l'activation de processus pro-apoptotiques [101].

L'ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) : Cette action pharmacologique permet, une fois l'ACM lié à son ligand, d'engager une liaison avec cellules effectrices comme les macrophages, les NK ou les LT-CD8 afin de lyser la cellule cible [102].

Le CDC (*complement-dependent cytotoxicity*) : Une fois liée à sa cible, l'ACM forme une cascade de protéines permettant d'attaquer la membrane et de lyser la cellule [102].

Le DDC (*Drug-delivery carrier*) : Une fois conjugué à des molécules cytotoxiques ou des radioisotopes, les ACM permettent de délivrer les substances toxiques aux cellules cibles. L'avantage de cette technique réside dans la haute spécificité des ACM qui permet de délivrer une forte concentration des molécules d'intérêt au niveau de la région tumorale tout en diminuant les effets sur les cellules saines [102].

Tableau 6 : Les différents effets pharmacodynamiques des ACM

Action pharmacologique	Description	Exemple & cible	Indication
Neutralisation	Action permettant de bloquer la ligation entre un ligand et son récepteur en vue d'arrêter la cascade de signalisation.	ipilimumab (CTLA-4) pembrolizumab (PD-1)	Mélanome avancé Cancer du poumon

ADCC	Recrutement de cellules effectrices pour action cytotoxiques	cetixumab (EGFR)	Cancer colorectal & cancer tête et cou
CDC	Formation d'un complexe protéine lysant la cellule cible	trastuzumab (HER-2)	Cancer du sein HER-2 positif
DCC	Délivrer les cytotoxiques (molécules ou radiothérapeutique) dans la cellule post-internalisation	trastuzumab-Emtansine	Cancer du sein HER-2 positif & métastatique

ADCC : antibody-dependent cellular cytotoxicity (Cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante), CDC : complement-dependent cytotoxicity (Cytotoxicité complément-dépendante), DCC : Drug-Delivery carrier (Vecteur de transport moléculaire), HER-2 : Human Epidermal growth factor Receptor (Récepteur du facteur de croissance épidermique humain).

On notera que les ACM utilisés en thérapies ne possèdent pas qu'un seul mode d'action mais une combinaison d'action. En effet, ils peuvent, tout en se liant à la cible, inhiber l'interaction et recruter des cellules effectrices afin d'engager une réponse cytotoxique.

3.3. Phénomènes de résistances à l'immunothérapie et microenvironnement tumoral

La grande efficacité de l'immunothérapie dans le traitement du CPNPC a été démontrée, particulièrement dans les cas où les tumeurs expriment un taux de PD-L1 important (>50%). Cependant, la majorité des patients développent des formes de résistances primaires et seulement 15 à 20% d'entre eux parviennent à développer une réponse complète ou partielle. La résistance acquise survient également chez les patients initialement répondeurs atteints de CPNPC avancé traités par CI [103]–[108]. Ces mécanismes de résistances ne sont pas pleinement compris mais différentes voies de recherches s'y intéressent.

3. Traitements du cancer du poumon

Sharma et al [109] ont résumé les différentes formes de résistances sous trois classifications : Résistance primaire, résistance adaptative immunitaire et résistance acquise (Figure 12). Par exemple, l'expression de PD-L1 peut être constitutive ou induite afin d'éviter l'attaque immunitaire et son expression est modulée par la synthèse de l'INF- γ . L'expression donc de PD-L1 est donc considérée comme une forme de résistance adaptative [109]. INF- γ étant sécrété lors de la réponse immunitaire anticancéreuse en permettant : (1) d'améliorer la reconnaissance entre l'antigène aux cellules immunitaires, (2) le recrutement des cellules immunitaires et (3) des effets antiprolifératifs et pro-apoptotique [110]. En revanche, une exposition prolongée aux INF- γ peut conduire à une augmentation de l'expression de PD-L1 et à un échappement, participant ainsi aux différentes formes de résistances [111].

La résistance primaire : On retrouve cette forme de résistance chez les patients qui présentent une résistance aux CI et ne répondent donc pas aux traitements par immunothérapie d'emblée. L'une des raisons concernerait la non-expression d'antigènes d'intérêt par la tumeur [112]. Une autre alternative pourrait être que les cellules cancéreuses présentent l'antigène mais développent un mécanisme inhibant la présentation de ces mêmes antigènes aux complexes majeur d'histocompatibilité (CMH) [113], [114].

La résistance acquise : Un quart à un tiers des patients traités par immunothérapie anti-CTLA4 ou anti-PD1 rechutent dans le cas du mélanome [115]. Les différents mécanismes potentiels de cette forme de résistance seraient liés à la perte des fonctions effectrices des cellules T, un signal inhibiteur important ainsi que le développement de mutation permettant cet échappement thérapeutique.

D'autres formes de résistances existent et peuvent être classifiées comme étant intrinsèques ou extrinsèques aux cellules cancéreuses. Ces résistances intrinsèques se produisent au sein même des cellules et englobent des caractéristiques comme l'expression de gène, la signalisation cellulaire, la reconnaissance immunitaire et les réponses aux dommages d'ADN. Les résistances extrinsèques sont imputables au microenvironnement tumoral à la suite de la bio-activation des cellules T [116], [117].

Parmi les phénomènes intrinsèques, l'expression des néo-antigènes est la clé permettant de stimuler la réponse immunitaire. Ces néo-antigènes sont soumis à des mutations où celles-ci sont associées à la réponse du traitement anti-PD1 [118], [119]. En effet, dans le CPNPC, les tumeurs avec un faible taux de mutation ou de néo-antigènes étaient corrélées à une faible médiane de survie dans la progression de la maladie [119]–[122]. En plus de la faible expression

3. Traitements du cancer du poumon

des néo-antigènes, il existe une forte hétérogénéité au niveau du CPNPC participant aux différents phénomènes de résistances [120].

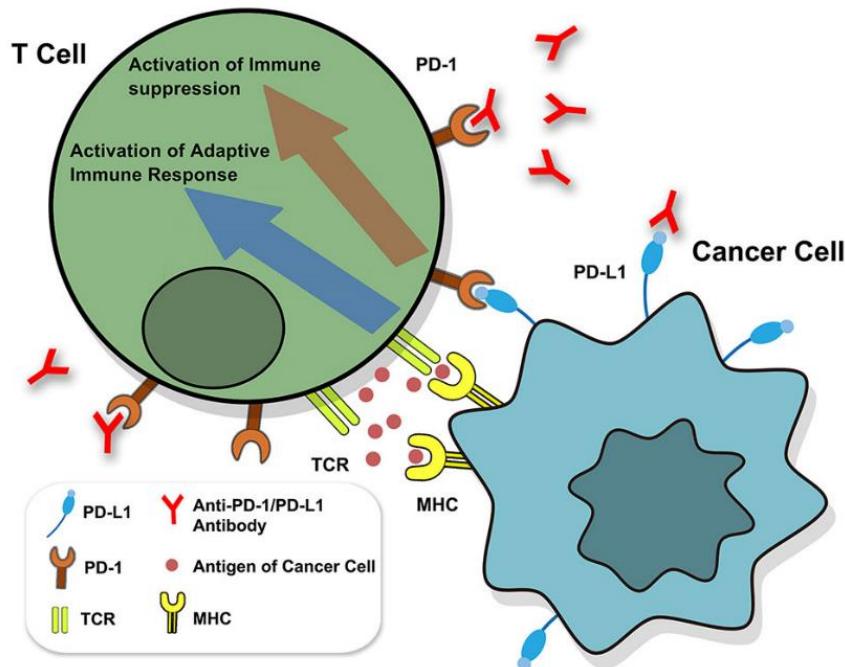


Figure 12 : Identification de PD-1/PD-L1. La liaison du TCR et CMH active la réponse adaptative. La liaison entre le PD-1 et le PD-L1 peut empêcher la transduction du signal des cellules T et ainsi inhiber la réponse immunitaire. L'anti-PD1 et PD-L1 permettent de lever cette inhibition. (TCR : Récepteur des cellules T) [123].

Les lymphocytes T infiltrés (LTI) participent aux phénomènes extrinsèques responsables de la résistance immunitaire. Les LTI sont des cellules immunitaires différencierées et comprennent des CD8 actifs spécifiques de la tumeur (marqueur de bon pronostic dans le CPNPC), des CD4 actifs (Tregs, Th1, Th2 et Th17) sécrétant des cytokines et INF- γ responsables de l'activation et de la suppression des CD8 infiltrés [124]–[126]. La constitution de ce système cellulaire autour de la tumeur permet de définir 3 profiles de tumeur : chaude, altérée ou froide en fonction du nombre LTI et de cytokines pro-inflammatoire [127].

Dans le CPNPC, l'utilisation de l'immunothérapie provoque l'expression d'autres systèmes de checkpoints inhibiteurs comme l'expression de LAG-3 ou de TIM-3. LAG-3 ou *Lymphocyte activation gene-3* présente un intérêt majeur étant donné que son expression est généralement associée à celle de PD-1 sur les cellules immunitaires du microenvironnement. D'après les études menées par Huard et al [128], le blocage de l'interaction entre LAG-3 et le CMH II

3. Traitements du cancer du poumon

augmente la prolifération des cellules lymphocytaires ainsi que la production de cytokines. Malgré des résultats modestes en préclinique, Okazaki et al [129], démontrent une efficacité de la combinaison des traitements par immunothérapie en combinant l'anti-PD1 et l'anti-LAG-3.

Tableau 7 : Type de profile de tumeur et microenvironnement tumoral. Inspiré de Galon et Bruni [127].

Type de profile	Description
Tumeur froide	<ul style="list-style-type: none">• Absence des LTI• Faible taux de néo-antigènes au bord de la tumeur (absence de stimulation)• Immuno-score 0
Tumeur altérée	<ul style="list-style-type: none">• Faible taux de LTI (immunosupprimés) / Haut taux de LTI au bord de la tumeur (exclus)
Tumeur chaude	<ul style="list-style-type: none">• Haut taux de LTI• Immuno-score 4

Immuno-score : densité d'expression des biomarqueurs (PD-L1)

Comme vu précédemment, TIM-3 est une molécule co-inhibitrice du système immunitaire. Son expression et activation sur différentes cellules immunitaires comme les Treg ou encore les NK permet d'inhiber leur action. Afin d'étudier l'impact de TIM-3 concernant l'apparition des phénomènes de résistances adaptatives, Koyama et al [130] ont évalué l'expression de TIM-3 sur deux types de modèles de cancer du poumon murin (adénocarcinome, mutation sur EGFR et KRAS) sous thérapie anti-PD1. Les investigations de TIM-3 au cours du traitement anti-PD1 ont révélé une augmentation de son expression. Cette expression était retrouvée sur les cellules lymphocytaires autour de la tumeur. Plus révélateur, l'expression de TIM-3 prédominait sur les CD4 et CD8 où l'anti-PD1 s'était lié et son évolution au cours du temps augmentait en fonction de la durée du traitement anti-PD1. Bien que les travaux de Koyama et al, démontrent le potentiel rôle dans l'apparition des résistances, d'autres études précliniques ont permis de mettre en évidence l'intérêt de TIM-3 afin d'améliorer la survie globale dans le cancer. Ces résultats intéressants ont mené à des études cliniques étudiant l'efficacité d'un anti-TIM3 en phase 1 [131]–[133].

La réponse immunitaire est un processus dynamique qui répond à différentes interactions immunologiques, génomiques mais également aux traitements (chimiothérapie, radiothérapie

3. Traitements du cancer du poumon

ou/et immunothérapie). Il n'existe pas qu'une seule forme de résistance singulière mais bien une multitude d'entre-elles. Ces interactions d'inhibition et d'activation ont lieu dans un tissu qui entoure la tumeur qu'on nomme le microenvironnement tumoral. Ce dernier se constitue de cellules immunitaires, tumorales, de cytokines, de matrices extracellulaires mais également de vaisseaux entourant et régissant les interactions tumeurs-système immunitaire.

4. Immuno-TEP & Compagnon diagnostic

D'après la FDA, on appelle un compagnon diagnostic (CDx) un test permettant d'extraire des informations clés pour l'utilisation efficace et sécurisée de la molécule thérapeutique associée [134]. Le premier concept du CDx a été introduit avec l'utilisation du trastuzumab dans le cancer du sein HER-2 positif qui consiste en un test par immunohistochimie accompagnant l'administration du traitement en détectant la surexpression de HER-2 dans le tissu tumoral [135], [136]. D'autres CDx ont été développés pour l'administration des traitements anti-PD1 ou PD-L1 comme le Dako 22C3 par pharmadX pour le pembrolizumab avec des seuils de positivité de 50% (en monothérapie et 1^{ère} ligne) ou le Dako 28-8 pour des expressions avec des seuils allant de 1% à 10% concernant les traitements nivolumab et atezolizumab (2^{ème} ligne de traitement) [92]. Le principe des tests Dako 22C3 et Dako 28-8 reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques du PD-L1 humain. Ces anticorps sont révélés par DAB et permettent l'analyse quantitative et qualitative de l'expression de PD-L1 sur des coupes histologiques. Ces tests ne concernent pas que l'immunothérapie mais également la chimiothérapie à base d'inhibiteur aux tyrosines kinases comme le crizotinib et le ceritinib dans le traitement du CPNPC portant la mutation ALK [137], [138].



Figure 13 : Compagnon diagnostic. Inspiré de Van Heertum de [139].

Un compagnon diagnostic est un test permettant de détecter la présence d'un biomarqueur. Cette détection peut être réalisée à l'aide de différents outils techniques comme l'IHC, l'analyse du phénotypes ou génotypes des cellules et s'étend de plus en plus à l'utilisation de radiotraceurs. Ces derniers se présentent comme des molécules radiomarquées analogues ou non aux molécules thérapeutiques et permettent de quantifier l'expression du biomarqueur. On retrouve par exemple le fluoroestradiol marqué au fluor-18 ciblant les récepteurs aux estrogènes dans le cancer du sein, le DOTATATE marqué au gallium-68 dans la prise en charge du diagnostic des tumeurs neuroendocrines ou encore le PSMA marqué au gallium-68 dans le diagnostic du cancer de la prostate. Ces médicaments radiopharmaceutique présentent également un versant

4. Immuno-TEP & Compagnon diagnostic

thérapeutique en changeant le radionucléide par du lutétium-177 dès lors que le biomarqueur est exprimé.

4.1. Immuno-TEP

L'immuno-TEP est une modalité d'imagerie combinant la spécificité de l'anticorps monoclonal et la sensibilité de l'imagerie TEP. L'immuno-TEP se base sur l'imagerie moléculaire qui se définit comme une visualisation, caractérisation et mesure des processus biologiques au niveau moléculaire et cellulaire chez l'homme [140].

Principe de la TEP

Le principe se base sur l'enregistrement ou l'acquisition des émissions des rayons ionisants suite à l'injection intraveineuse d'un médicament radiopharmaceutique par une couronne de détecteur. Le médicament radiopharmaceutique est composé d'une molécule vectrice qui se distribue spécifiquement dans un tissu et d'un isotope radioactif qui émet un positon. Au cours de sa biodistribution, la molécule vectrice portant le radioisotope va se fixer dans un tissu pour lequel elle a une affinité importante (exemple : tumeur). Le médicament radiopharmaceutique va alors s'accumuler dans le tissu d'intérêt où il y aura émission de positons (β^+). Après un parcours dépendant de l'énergie du positon, le positon va rencontrer un électron et le processus d'annihilation aura lieu. De ce processus résultera l'émission de deux photons de 511 keV émis de même direction mais de sens opposé (180°). Les détecteurs permettent de détecter en coïncidence ces deux photons de même énergie puis de retracer l'origine du signal, correspondant à une localisation très proche de la molécule radioactive (Figure 14) [141].

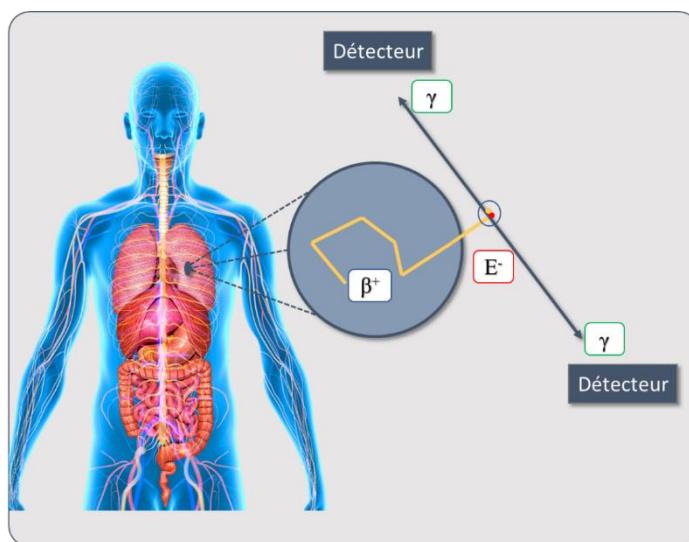


Figure 14 : Principe de la détection de la TEP. Inspirée de Omami et al [141].

4. Immuno-TEP & Compagnon diagnostic

Après acquisitions des images, la méthode de quantification classique est la valeur standardisée de fixation ou SUV (en anglais, *Standard Uptake Value*). Cette dernière consiste à rapporter l'activité de la lésion par gramme de tissu à l'activité injectée et à la masse corporelle du patient [142].

$$SUV = \frac{\text{Activité dans la ROI} (kBq/mL)}{\frac{\text{Activité administrée} (kBq)}{\text{Poids du patient} (g)}}$$

Il existe d'autres méthodes de quantifications basées sur l'utilisation de données dynamiques et de modèles pharmacocinétiques comme le STRM ou *Simplified reference tissue model*. Ces méthodes permettent d'estimer des paramètres cinétiques chez le patient comme le potentiel de liaison (BP_{ND}), le ratio du volume de distribution (VDR) ou encore les constantes de transferts intercompartimentales.

Parmi les médicaments radiopharmaceutiques, le [¹⁸F]FDG est la molécule la plus utilisée en TEP. Le TEP-CT au [¹⁸F]FDG apporte des informations fonctionnelles qualitatives et quantitatives de l'activité métabolique glucidique. Plus les cellules sont actives, plus elles en consomment. C'est le cas du cerveau qui consomme de manière physiologique entre 20% et 25% du glucose [143], [144]. L'inflammation et les pathologies tumorales sont une autre cause pathologique de captation du [¹⁸F]FDG. En effet, les cellules tumorales présentent un développement et division anarchique ce qui augmente leur avidité pour le glucose. L'une des problématiques concernant l'utilisation du [¹⁸F]FDG est son manque de spécificité quant au marquage tumoral. Des pathologies inflammatoires causeraient une captation du radiopharmaceutique non liée à la présence tumorale pouvant induire un risque de faux-positif. En revanche, l'utilisation de traceur spécifique (exemple : immuno-TEP) de la tumeur pourrait répondre à cette problématique et apporter information quantitative et qualitative de biomarqueurs exprimés sur la tumeur.

L'immunothérapie étant basée sur la surexpression de marqueurs, il est intéressant de développer des outils diagnostiques plus spécifiques pour caractériser la tumeur et donner le traitement le plus approprié au patient. L'une des utilisations remarquables de l'immuno-TEP comme marqueur prédictif de la réponse aux traitements par immunothérapie anti-PDL1 (atezolizumab) a été mené par Bensch et al [145]. Les auteurs ont procédé au radiomarquage de l'atezolizumab avec du zirconium-89 afin de détecter les potentiels patients répondeurs aux anti-PDL1. Ils ont aussi comparé le pouvoir prédictif de la réponse aux tests par immunohistochimie. En effet l'étude NCT02108652 a montré que des patients traités par

4. Immuno-TEP & Compagnon diagnostic

immunothérapie avec immuno-score 0 déterminé par immunohistochimie répondaient dans 21% des cas en comparaison au 28% de taux de réponse des patients pour lesquels l'immuno-score était de 2/3 [146]. Il existe certaines explications à cela comme l'hétérogénéité de l'expression de PD-L1 en fonction du site d'extraction de la biopsie mais également de l'évolution de son expression au cours des différents traitements [147]–[149]. Dans leur étude, Bensh et al ont administré le [⁸⁹Zr]atezolizumab chez 25 patients avec du CPNPC, cancer du sein triple négatif et cancer de la vessie. En plus de la visualisation des tumeurs primaires, les auteurs ont montré l'efficacité du radiotraceur à cibler les lésions métastatiques (Figure 15). Bien que le nombre de la population d'étude soit faible, les résultats de l'étude ont montré que la SUV du [⁸⁹Zr]atezolizumab au niveau des régions tumorales était corrélée à la réponse au traitement. Les patients ayant des SUV_{max} de 6,8 montrent progression de la maladie, ceux avec une SUV_{max} de 9,5 montrent une maladie stable, ceux avec une SUV_{max} de 12 montrent une réponse partielle et ceux avec une SUV_{max} de 22,6 montrent une réponse complète aux traitements par immunothérapie anti-PDL1. En revanche, l'utilisation de l'IHC (SP263 ou SP142) n'a réussi à discriminer les patients répondeurs à l'immunothérapie.

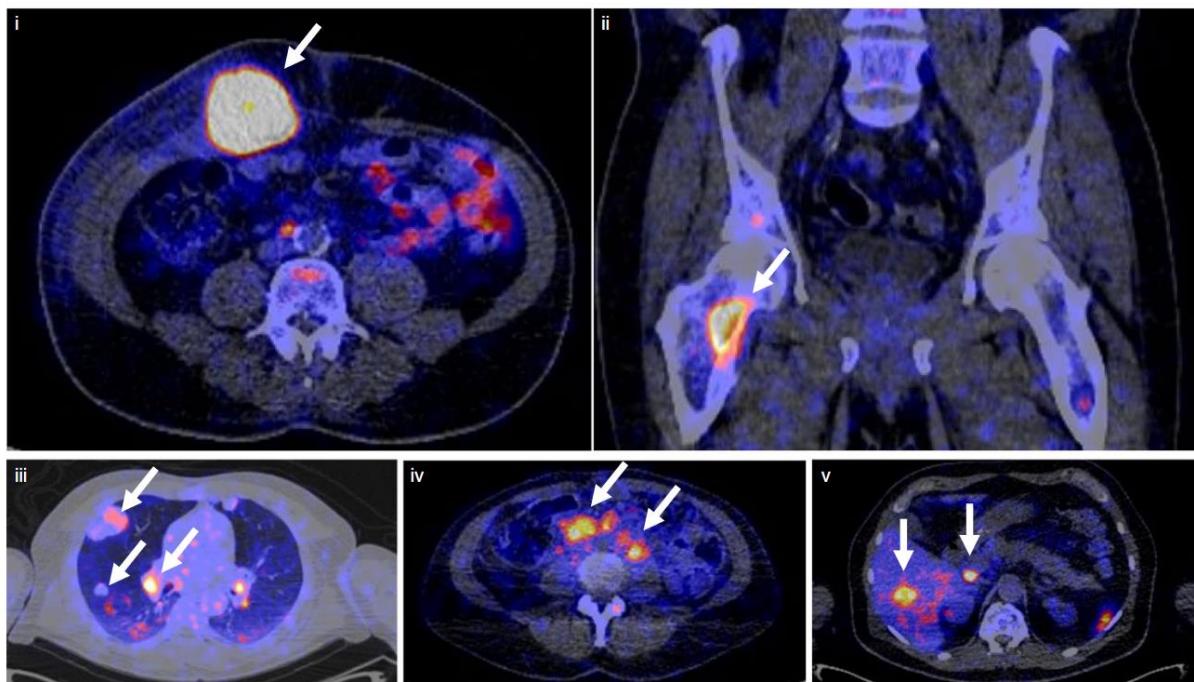


Figure 15 : Image TEP-CT de quatre patients illustrant la captation tumorale du [⁸⁹Zr]atezolizumab en cinq endroits différents au jour 7 après l'injection (les flèches blanches indiquent les lésions tumorales) au jour 7 après l'injection; les examens TEP ont été réalisés une fois par patient et par point de temps). Les images (i) et (ii) proviennent du même patient, tandis que les images (iii), (iv) et (v) proviennent d'un autre patient [145].

4. Immuno-TEP & Compagnon diagnostic

Les ACM entiers présentent certaines limitations comme leur taille de 150 kDa, leur faible clairance ainsi que leur distribution physiologique impactée par la liaison à la cible ainsi qu'aux récepteurs FcRn [150]. Ce phénomène peut jouer en défaveur des ACM en diminuant le rapport signal-sur-bruit [151]. De plus, l'affinité des ACM influence également leur pénétration au niveau des cellules tumorales et donc leur accumulation comme l'a montré l'étude menée par Rudnick et al. [152]. Les auteurs ont mesuré la pénétration et l'accumulation d'un anti-HER2 (C6.5 mab) et ont mis en évidence qu'une affinité modérée du C6.5 était à l'origine d'une accumulation tumorale plus importante en comparaison d'une affinité plus importante [152], [153].

L'immuno-TEP ne se limite pas à l'utilisation des ACM entier. On peut retrouver des fragments d'anticorps ou des protéines de fusions présentant une clairance plus importante du traceur libre augmentant le rapport signal sur bruit. On peut retrouver des scFv (~25 kDa) ou single chaîne fragment variable, des diabodies (composition de deux scFv, 50 kDa) ou encore des minibodies [154], [155]. Ils présentent une clairance plasmatique plus importante mais une faible pénétration et distribution tumorale.

Les ACM produisent la plus grande absorption tumorale (% ID/g) et les rapports tumeur/sang (contraste de l'image/indice thérapeutique) les plus élevés par rapport aux diabodies, ou minibodies . Les rapports tumeur/sang sont les plus élevés à des moments plus tardifs (>72 heures après l'injection). Ceci est principalement attribué à leur poids moléculaire élevé (~150 kDa) qui les rend inéligibles à la clairance rénale. En revanche ils sont recyclés dans la circulation sanguine à l'aide du FcRn, augmentant ainsi leur biodisponibilité pour cibler les tumeurs lors de multiples passages dans la circulation systémique. Différents formats de l'anticorps tels que les constructions de fusion scFv-Fc- (~100-150 kDa) et les minobodies sont des fragments d'anticorps intermédiaires qui atteignent une absorption relativement faible dans la tumeur, mais leur profil de clairance *in vivo* est plus rapide et leur permet de produire un contraste élevé entre la tumeur et le bruit de fond à des moments précoces. Ces constructions ont été synthétisées dans le but de réaliser une radioimmuno-imagerie le lendemain (24 heures post injection). Enfin, une composition structurelle des diabodies et des scFv(s) ne possédant pas de Fc diminue le recyclage médié par les FcRn et induit une clairance rénale et sanguine rapide. Ils peuvent être utilisés pour une imagerie le jour même (dès 2 à 4 heures post injection) [156].

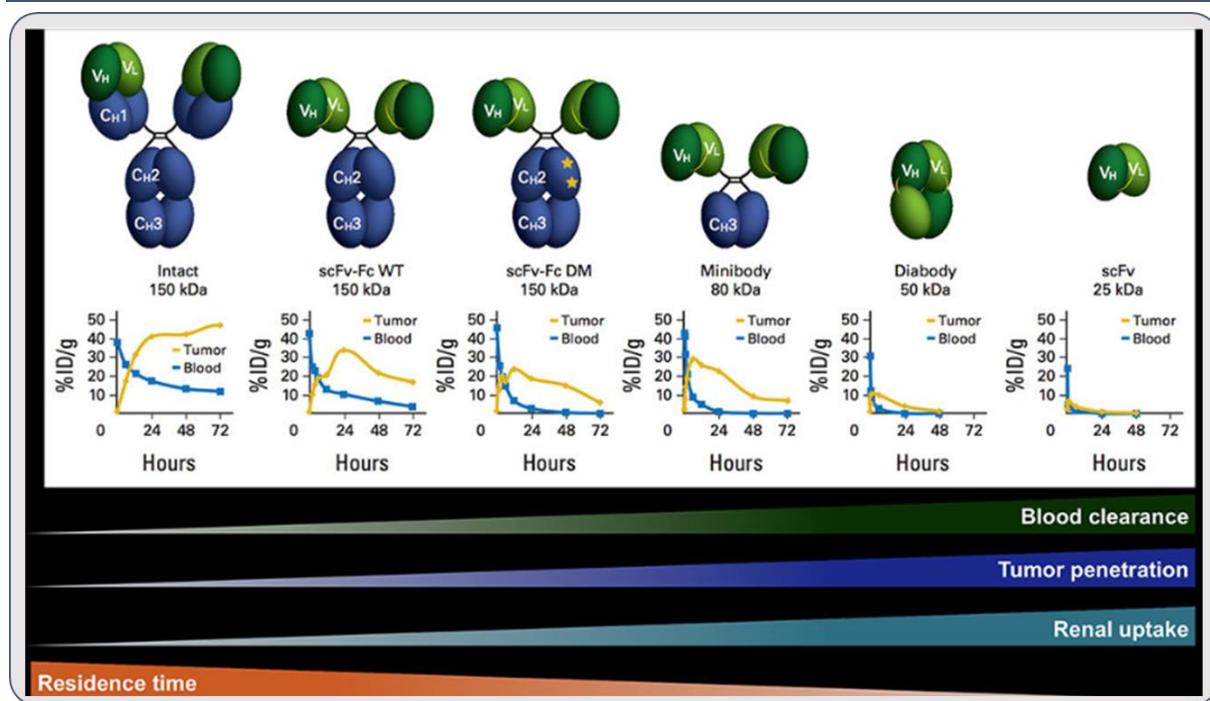


Figure 16 : Pharmacocinétique *in vivo* des vecteurs à base d'anticorps ciblant les tumeurs en fonction de leur poids moléculaire et de leur taille [156].

Ces caractéristiques intrinsèques doivent être appréciées au regard de la dosimétrie et du ciblage tumoral optimal dans le cadre du diagnostic. Ces caractéristiques influencent également le rapport signal-sur-bruit si ce dernier a pour référence l'activité qu'on retrouve au niveau de sang.

4.2. Principaux radioisotope de l'immuno-TEP

Le choix des radioisotopes est un paramètre important à considérer pour la mise en place de l'immuno-TEP. Comme vu précédemment dans la section introduisant les paramètres PK des ACM, ces derniers présentent un temps de demi-vie biologique long (ex : IgG) et leur distribution est conditionnée par différents facteurs. Il faut donc trouver un isotope dont la demi-vie physique est corrélée à la distribution tumorale de l'anticorps et sa demi-vie biologique [156].

Zirconium 89 :

Le zirconium-89 a une demi-vie physique de 78,4 heures. Il présente des caractéristiques en termes de rayonnement et de période radioactive idéales pour l'investigation de la biodistribution des ACM IgG. La décroissance du zirconium-89 se scinde en deux : (1) émission de positon (23%) et (2) capture électronique (77%). Avec une énergie β^+_{\max} de 897

4. Immuno-TEP & Compagnon diagnostic

keV et une énergie β^+ moyenne de 396,9 keV, le zirconium-89 présente une bonne résolution spatiale étant donné le faible parcours du positon dans la matière. De plus, il se distingue en émettant un photon gamma de 908,97 keV (99%) [157]. En comparaison avec l'iode-124, une fois internalisé le zirconium-89 tend à rester dans la cellule [158]. En dépit de ces caractéristiques, la limitation majeure du zirconium-89 est la dose effective corps entier délivrée au patient. En effet, l'émission du photon gamma de haute énergie augmente l'irradiation du patient en comparaison au fluor-18. Il existe d'autres radioisotope pour l'imagerie TEP comme le cuivre 64, l'yttrium 86, l'iode 124, l'indium 111 ou encore le magnésium 52.

Cuivre-64

Le cuivre 64 possède une demi-vie de 12,7h. Sa méthode de marquage se base sur l'utilisation d'un chélateur comme le TETA (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetraacetic acid) ou encore le DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) [159]. La proportion d'émission de positon est de 17,6% avec une énergie β^+ moyenne de 278 keV et un faible parcours du positon dans la matière [160].

Iode-124

L'iode-124 possède l'une des demi-vie physique (100,8h) les plus importantes des radioisotopes utilisés en clinique [161]. La période physique est compatible avec la période biologique des ACM. L'iode-124 se désintègre en émettant un positon dans 22,7% des cas avec une énergie maximale de 2,138 MeV et de capture électronique dans 77,3% des cas [162]. Différentes études précliniques ont été publiées concernant l'intérêt de l'utilisation de l'iode-124 en immuno-TEP notamment dans le ciblage de l'EGFR humain avec une captation tumorale de 12%ID/mL à 120h chez la souris [163].

4.3. Dosimétrie

La dosimétrie est le domaine d'application qui consiste dans la mesure des rayonnements ionisants reçus. Quand elle concerne l'individu on parle alors de dosimétrie individuelle. La dose mesurée chez un individu peut être de deux formes : externe ou interne. Pour la dosimétrie interne, la source d'irradiation doit se situer à l'intérieur de l'organisme comme dans le cas de la radiothérapie interne vectorisée.

Les radionucléides comme le zirconium-89, le fluor-18 ou le cuivre-64 émettent des rayonnements ionisants comme des photons gamma d'annihilations. Ils déposent ainsi de

4. Immuno-TEP & Compagnon diagnostic

l'énergie dans le tissu ou dans l'organisme en fonction de l'intensité du rayonnement (eV), leur temps de demi-vie, leur portée et le transfert linéaire d'énergie. Il est également nécessaire de considérer la biologie du tissu cible, sa radiosensibilité, la clairance du radionucléide ainsi que celle de son vecteur [164].

Les rayonnements ionisants (RI)

Les RI sont une forme d'énergie libérée par les atomes radioactifs (éléments instables nécessitant de perdre l'excédent énergétique). Cette énergie se propage par le biais d'ondes électromagnétiques (rayons X ou γ) ou de particules (neutron, β^+ , β^- ou α). On retrouve deux formes d'expositions aux rayonnements ionisants

- Exposition interne : se produit dès qu'un radionucléide est inhalé, ingéré ou pénètre dans la circulation sanguine (exemple : Radiothérapie interne vectorisée ou examen d'imagerie au $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$).
- Exposition externe : se produit quand le corps est exposé à des rayonnements ionisants (exemple : passage devant une source radioactive)

Les RI peuvent endommager les différents tissus ainsi que les organes en fonction de la dose reçue ou absorbée. Cette énergie absorbée s'exprime en gray (Gy). Cependant, cette unité ne tient pas compte de la source du rayonnement et de sa nocivité sur les tissus. **La dose équivalente (H)** s'exprime en sievert (Sv) permet de mesurer l'énergie déposée en fonction de la nature du rayonnement, on retrouve selon la commission internationale de la protection radiologique (CIPR) de facteur de pondération ω_R allant de 1 pour les photons (X ou γ) et les électrons (β) à un facteur 20 pour les particules α [165].

Cela étant, la dose équivalente ne tient pas compte de la radiosensibilité des organes ou des cellules. Plus une cellule aura tendance à se diviser comme les cellules hématopoïétiques ou les cellules gonadiques, plus l'impact des rayonnements sera important. **La dose efficace (E)** s'exprime en sievert et permet de définir la somme des doses absorbées tissus-équivalents et pondérée par le facteur ω_T (facteur de pondération tissulaire). On retrouve un facteur de 0,2 pour les gonades alors qu'un facteur de 0,01 est attribué à la surface des os [165]. On note la formule suivante pour retrouver la dose efficace :

$$E = \sum_T \omega_T \times H_T = \sum_T \omega_T \times \sum_R \omega_R \times D_{T,R}$$

4. Immuno-TEP & Compagnon diagnostic

Où E représente la dose efficace, ω_R le facteur de pondération des rayonnements, ω_T le facteur de pondération tissulaire, H_T la dose équivalente et $D_{T,R}$ la dose moyenne absorbée par le tissu.

Propriétés physiques des RI

Pour considérer des rayonnements comme ionisant, on a défini un seuil à partir de 10 keV. Durant l'interaction avec l'atome, les RI peuvent arracher un électron de l'atome provoquant une ionisation de l'atome cible. On retrouve deux formes d'ionisations : (1) directe et (2) indirecte.

Tableau 8 : Nature des rayonnements ionisants

Nature de rayonnement		Rayonnement ionisant
		Rayon X
Rayonnement électromagnétique	Ionisation indirecte	Rayon γ
		Neutron
Rayonnement particulaires	Ionisation directe	Électron ou β^- Position ou β^+

On distingue dans les RI directement ionisant les particules chargées comme les électrons, les positons et les particules α alors que dans les RI indirectement ionisant on retrouve des photons et des neutrons n'interagissant pas directement avec la matière [166].

Effets biologiques

Les RI provoquent une production de radicaux libres soumettant les cellules ou les tissus à un stress oxydatif. En se fixant sur les molécules (protéines) ou sur l'ADN, les radicaux libres peuvent causer des dommages cellulaires. Ces derniers peuvent être non réparables par les outils moléculaires induisant la mort cellulaire (effets déterministes) ou réparables mais provoquant des mutations générant des cellules cancéreuses (effet stochastique) [167], [168]. Les RI peuvent également interagir directement avec la matière en ionisant directement la matière.

Estimation de la dose délivrée à la matière vivante suite à un examen irradiant et calculs dosimétriques

Afin d'estimer la dosimétrie ou la dose absorbée par un organe ou un corps entier exposé aux irradiations internes ou externes, des logiciels ont vu le jour afin d'accomplir cette tâche comme IDAC-Dose (Internal Dose Assessed by Computer – Dose) ou OLINDA. Ces logiciels se basent

4. Immuno-TEP & Compagnon diagnostic

sur l'utilisation de fantôme anatomique représentant des organes (24) qui constituent le corps humain [169]. On se basera sur l'analyse d'IDAC-Dose 2.1 pour le contenu de la thèse [170].

Afin de calculer la dose absorbée corps entier, il est nécessaire de calculer la dose moyenne absorbée dans une région d'intérêt qui peut s'apparenter à un organe selon le MIRD (Medical Internal Radiation Dose) pamphlet 21 [164].

$$D(r_T, T_D) = \sum_{r_s} \tilde{A}(r_T, T_D) \times S(r_T \leftrightarrow r_s) \text{ [Gy]}$$

L'équation se compose de deux éléments :

- \tilde{A} est l'activité cumulée dans la cible ou l'organe (exemple : nombre total de désintégration dans la source durant période t).
- S est la dose moyenne absorbée dans la cible ou l'organe par transformation nucléaire.

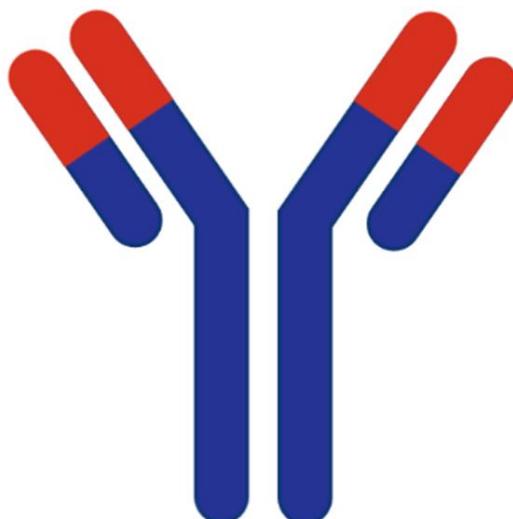
Le calcul de S dépend des valeurs des fractions de doses absorbées (SAFs) et de la dose efficace (E) concernant le tissu (à savoir en fonction de la pondération tissulaire ainsi que la pondération de la source radioactive). De plus, la dose efficace prend en considération les références pour les hommes ainsi que pour les femmes.

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

Comme vu précédemment, les anticorps monoclonaux sont des protéines hautement spécifiques de leur cible et présentent des actions pharmacologiques distinctes. Par rapport aux petites molécules, les ACM présentent des caractéristiques pharmacocinétiques (PK) différentes et sont influencés par d'autres facteurs comme l'expression de la cible, son renouvellement, la charge totale, l'immunogénicité, et bien d'autres encore.

Les différents anticorps thérapeutiques utilisés en cliniques sont des IgG et présentent la même structure tri-dimensionnelle que les autres classes d'anticorps (Figure 17). Ce sont des macromolécules de 150 kDa ($\approx 150\,000$ g/mol) possédant deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères variables [171]. Les chaînes légères ou variables comprennent le fragment responsable de la fixation des anticorps à la cible. La fraction cristallisable des deux chaînes lourdes peut se lier sur deux types de récepteurs Fc γ (Fc γ R) sur les cellules effectrices et le récepteur néonatal (FcRn) au niveau des vésicules intracellulaires des cellules endothéliales [172]. Ce dernier est présent sur différentes cellules et participe activement à la PK des ACM.

Fragment reconnaissant l'antigène



Fragment cristallisable

Figure 17 : Représentation des deux fragments d'un anticorps monoclonal

Le récepteur FcRn :

Le FcRn participe à la protection et la distribution des ACM. En se fixant sur le FcRn, les ACM sont internalisés au sein de la cellule. En fonction du pH (acide), les ACM forment un complexe

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

avec le FcRn permettant de les recycler en dehors de la cellule. Une fois l'endosome recyclé, le complexe ACM-FcRn se dissocie au contact du pH physiologique. Des phénomènes de compétitions peuvent avoir lieu au niveau du FcRn provoquant la dégradation des ACM dans l'espace lysosomale [173]. La liaison au FcRn présente un enjeu important dans le développement des ACM permettant notamment d'augmenter leur temps de demi-vie (20 jours à 60 jours) [174]. Ces interactions ACM-FcRn peuvent être exploitées pour limiter leur durée de vie dans un contexte diagnostic et dosimétrique (voir dans la section 4.3. Dosimétrie) [175].

Administration des ACMs :

La voie d'administration principale est la voie intraveineuse (I.V) sous forme de perfusion suivi par la voie sous-cutanée et la voie intramusculaire. En sous-cutanée, la biodisponibilité peut varier entre 20 et 90% et l'absorption dépend principalement du système lymphatique [177].

Distribution des ACMs :

La distribution physiologique des ACM est limitée au niveau de l'espace vasculaire et à l'espace interstitiel dû à leur taille et à l'hydrophilie. La distribution de l'espace vasculaire vers l'espace interstitiel se déroule principalement par mouvement de convection (flux sanguin vers l'espace interstitiel). Les facteurs pouvant influencer le processus de distribution comprennent la diffusion passive (très faible), la pinocytose, l'endocytose récepteur-dépendante, l'élimination du tissu, la charge et l'hydrophobicité [178] ainsi que la fixation à la cible ou le « turnover » du récepteur.

Métabolisme et catabolisme des ACMs :

Il existe différentes voies d'élimination des ACM : la dégradation protéolytique, l'élimination Fc γ -récepteur-dépendante, la clairance cible-dépendante, l'endocytose non-spécifique, la formation de complexes immuns et la clairance FcRn-dépendante [177]. On peut différencier deux types de clairance : spécifique et non-spécifique. La principale forme d'élimination des ACM est la dégradation protéolytique (non-spécifique) en peptides puis en acides aminés qui seront réutilisés dans la néosynthèse protéique ainsi que les phénomènes de pinocytoses [178], [179]. En général, la clairance non-spécifique est lente et non saturable résultant en une PK linéaire (dose-proportionnelle).

La clairance spécifique dépend de l'interaction entre les ACM et leur cible. Une fois fixée, les ACM sont internalisés et dégradés au niveau cellulaire. La clairance spécifique participe à la PK non-linéaire qu'on peut observer sur des profils cinétiques sanguins car elle dépend de

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

l'expression de la cible, du « *turnover* » (capacité de renouvellement de la cible), de sa modulation à la hausse ou à la baisse. Dans le cas de cibles membranaire, le cetuximab et le panitumumab présentent des PK non-linéaire à faible dose puis linéaire à dose élevée, une fois la cible saturée [180].

Un autre phénomène peut impacter la pharmacocinétique des ACM : la sécrétion d'ADA ou *anti-drug antibodies*. En dépit du succès des ACM, l'administration répétée de ces derniers provoquent la sécrétion d'ADA [181]. La formation des ADA impacte la PK et la réponse pharmacodynamique (PD) en réduisant leur efficacité [182]. Les ADA se divisent en deux catégories [183] :

- ADA neutralisant (ntADA) qui bloquent et interfèrent directement avec la capacité de l'anticorps à se lier à sa cible
- ADA non neutralisant (bADA) qui reconnaissent d'autres épitopes sur l'anticorps, cependant l'anticorps conserve sa capacité de reconnaissance

En clinique, les ntADA attirent particulièrement l'attention car ils diminuent l'efficacité des ACM. L'impact sur la PK a été décrit par Eli D. Ehrepreis [184] concernant l'Infliximab. Les auteurs remarquent une clairance des patients plus importante, des niveaux plasmatiques plus bas et une baisse de l'efficacité thérapeutique. Typiquement, la clairance chez les patients avec une sécrétion d'ADA est de 12,89 mL/h en moyenne comparée à 9,9 mL/h en moyenne chez les patients sans ADA (Figure 18).

Serum Infliximab vs Time Curves in a Normal Subject without Infliximab Anti-Drug Antibodies (ADA) and a Normal Subject with ADA

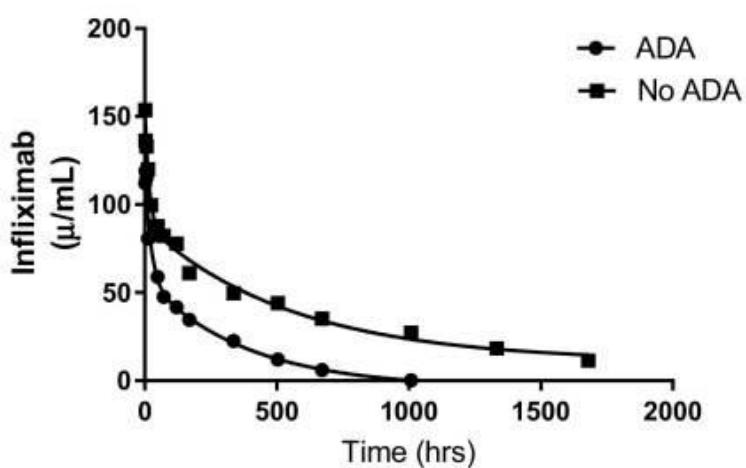


Figure 18 : Concentration de l'infliximab au cours du temps chez les sujets sains avec et sans sécrétion d'ADA (Anti-Drug Antibodies) [184].

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

Tableau 9 : Résumé des caractéristiques des ACM. inspiré de Kamath [185]

Paramètres	Caractéristiques
Liaison	Spécificité unique quant à la cible
	FcRn prévient le catabolisme et contribue au recyclage Fcγ produit une réponse (en fonction de la cellule effectrice)
PK/PD	PK dépend de biologie de la cible & de la PD Généralement PK bi-phasiqne avec distribution rapide et élimination lente
Proportionnalité de la dose	PK non-linéaire à faible dose PK linéaire à forte dose & post saturation de la cible PK linéaire si la cible est soluble et faiblement exprimée
Distribution	Limitée au compartiment systémique et espace interstitiel
Métabolisme	Catabolisme par dégradation protéolytique en acide aminées
Excrétion	Pas d'élimination rénale de l'ACM intact Formation d'ACM anti-ACM
Immunogénicité	Impact sur la PK, PD, efficacité et sécurité Immunogénicité chez l'animal non prédictif chez l'homme

5.1. Pharmacocinétique par approche non compartimentale et compartimentale

Lors de l'analyse des données PK, deux méthodes s'offrent à nous : L'approche compartimentale (CA) ou l'approche non-compartimentale (NCA).

L'approche non-compartimentale

Elle permet d'estimer les paramètres PK comme le degré d'exposition, la clairance ou le temps de demi-vie sans émettre d'hypothèses pour le calcul de ces paramètres. L'estimation de l'aire sous la courbe (ASC ou en anglais AUC) s'effectue à l'aide de la méthode dite "des trapèzes" (Figure 19) [186].

$$AUC_{t_i}^{t_{i+1}} = \frac{C_i + C_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i)$$

Avec AUC, l'aide sous la courbe d'un temps t_i à un temps t_{i+1} , C_i la concentration au temps i , C_{i+1} la concentration au temps $i+1$ et t pour le temps.

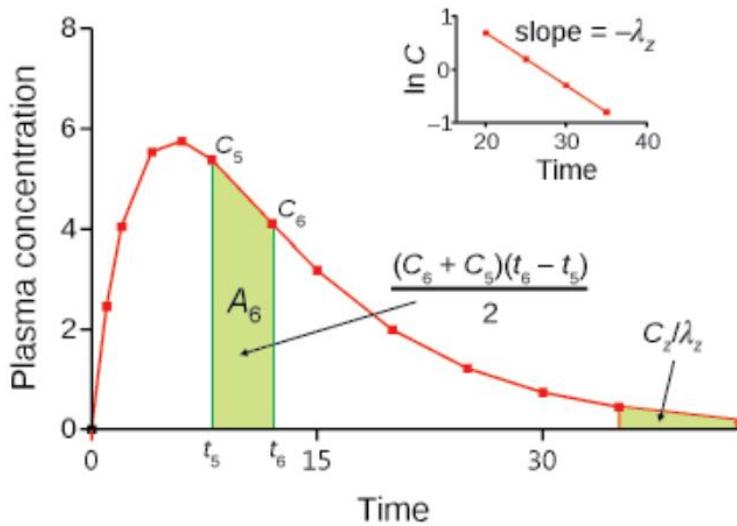


Figure 19 : Calcul de l'AUC selon la méthode trapézoïdale [187]

L'AUC est calculée en réalisant la somme des différentes surfaces intermédiaires $AUC_{t_i}^{t_{i+1}}$. L'estimation de la constante fractionnelle d'élimination (k_e) se fait par régression log-linéaire sur les points terminaux (3 à 4 points). Ceci permet d'estimer l'AUC au-delà du dernier point connu en extrapolant à l'AUC à l'infini selon l'équation :

$$AUC_{t_0}^{\infty} = AUC_{t_0}^{t_{last}} + \frac{C_{last}}{k_e}$$

Où $AUC_{0\text{à}\infty}$, Aire sous la courbe de 0 à l'infini, $AUC_{0\text{à}t_{last}}$, Aire sous la courbe de 0 jusqu'au dernier point observé, C_{last} dernier point de concentration relevé et k_e la pente d'élimination.

L'approche compartimentale

Elle se base sur la description de la concentration du médicament au cours du temps à l'aide d'équations mathématiques. Le principe consiste à simplifier la réalité en représentant le corps humain à l'aide d'un nombre limité de boîtes (les compartiments) dans lesquelles le principe actif va se répartir. Un compartiment est défini comme un espace ou volume dans lequel le médicament est considéré comme instantanément réparti de manière homogène, le principe actif arrive à la même vitesse, se distribue instantanément et ressort à la même vitesse en tout point du compartiment. Afin de représenter les différentes données expérimentales, les compartiments peuvent être plus nombreux qu'un seul et unique compartiment. Généralement, les modèles qu'on retrouve en pharmacocinétique sont des modèles de types « mamillaires ».

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

Ils se construisent autour d'un compartiment central (C_c) qui représente la circulation sanguine et/ou plasmatique connecté à d'autres compartiments dit périphériques ($C_{p1}, C_{p2}, \dots C_{pn}$).

5.2. Modélisation par approche de population

La modélisation pharmacocinétique par approche de population a été introduite par Sheiner et al en 1972 [188]. Elle repose sur l'analyse compartimentale avec des spécificités concernant l'estimation des paramètres pharmacocinétiques. L'approche de population considère l'ensemble des données PK des individus d'une même population simultanément contrairement à l'approche classique en deux étapes qui consiste à estimer les paramètres PK individuellement puis d'en déduire la moyenne et l'écart-type sur l'ensemble des individus étudiés. L'analyse en deux étapes ne permet pas de prendre en compte l'erreur réalisée sur l'estimation des paramètres PK individuels et la variabilité interindividuelle est souvent surestimée.

Les paramètres PK lors de l'analyse par approche de population sont décrits par des distributions statistiques et chaque individu correspond à une réalisation de ces distributions. Ce type de modèle mathématique est appelé : modèle non linéaire à effets mixtes. L'approche de population présente différents avantages puisque toutes les données sont analysées simultanément, elle permet d'inclure des individus ayant peu d'observations, par exemple dans les cas où il est impossible d'avoir accès à un nombre de prélèvements sanguins important pour des raisons de faisabilité ou d'éthique. Cette approche permet également de quantifier la variabilité interindividuelle des paramètres PK et de tester quelles covariables (physiologiques ou/et pathologiques) permettent d'expliquer cette variabilité. La sélection des covariables repose sur les connaissances des propriétés de la molécule, de la famille de molécule ou de la physiologie. Par exemple, en fonction de l'expression de biomarqueurs ou de la synthèse d'ADA, la PK des ACM peut en être impactée, se traduisant ainsi en une variabilité de l'estimation des paramètres PK. Cependant, si ce type d'approche permet d'effectuer des analyses même en l'absence d'un grand nombre de prélèvements par individu, elle nécessite néanmoins d'avoir un nombre minimal d'individus (20 à 30 individus) pour obtenir une estimation correcte des paramètres [189].

L'écart entre les concentrations observées et celles prédictes par le modèle à partir des paramètres PK individuels correspond à la variabilité résiduelle. L'origine de ces écarts est variée : elle peut être due aux erreurs sur le temps de prélèvements sanguins, aux erreurs de dosages ou à une inadéquation du choix du modèle de structure. Sur Monolix, cette variabilité est décrite par le modèle d'erreur (a et b) et elle peut être de 3 types (Figure 20) :

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

- Modèle d'erreur constant ou additif (a)
- Modèle d'erreur proportionnel (b)
- Modèle d'erreur combiné ou mixte (a & b)

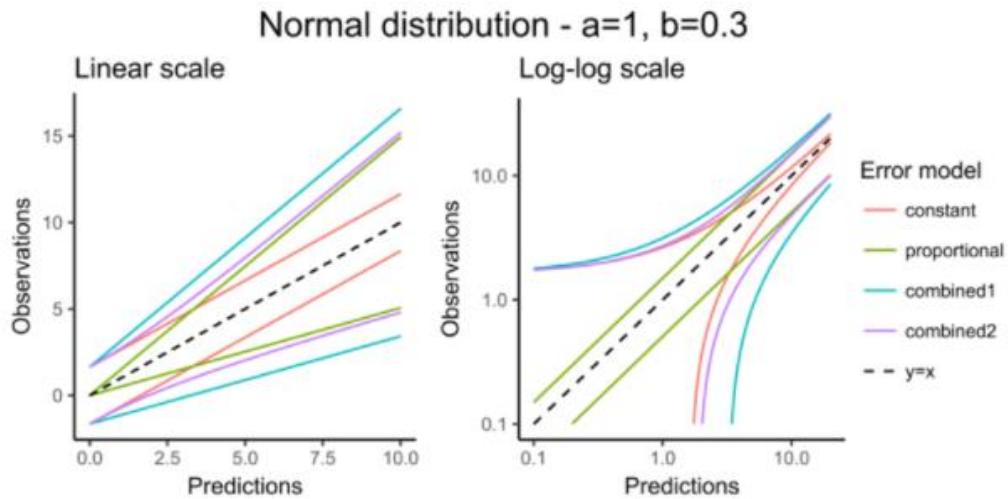


Figure 20 : Intervalle de prédiction à 90% quant à l'incertitude des prédictions due au modèle de l'erreur résiduelle. De monolix.lixoft.com

Modèles non linéaires à effets mixtes :

Comme vu précédemment, l'approche de population repose sur des modèles non linéaires à effets mixtes. Le terme "non linéaire" fait référence au fait que la relation entre la concentration et les paramètres du modèle est non linéaire.

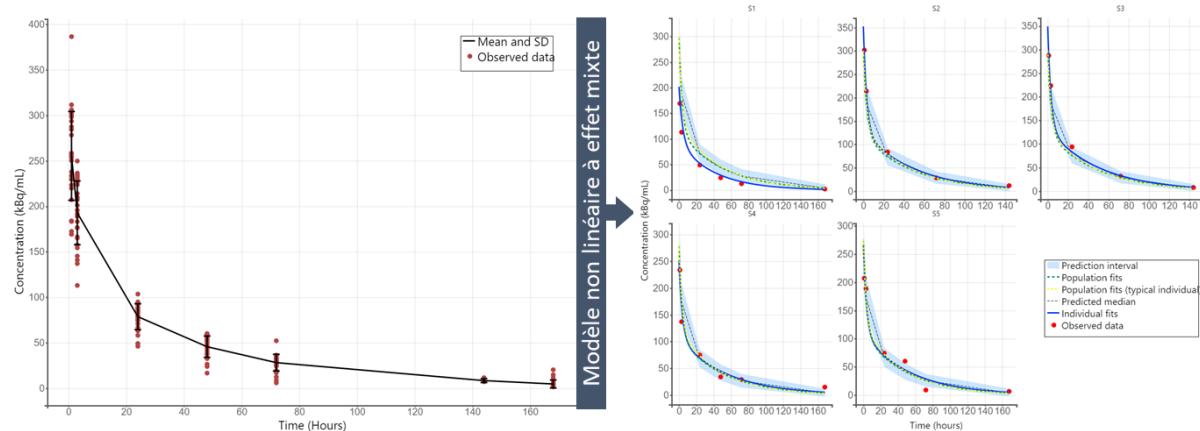


Figure 21 : Des données expérimentales à la description des données par un modèle à effet mixte. Les modèles à effets mixtes prennent en compte les erreurs liées à la variabilité inter-individuelle.

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

Les effets fixes : Ce sont des paramètres de population, ils ne varient pas d'un individu à une autre.

Les effets aléatoires : Ce sont des paramètres qui varient entre les individus et qui permettent de décrire les sources de variabilité.

La méthode consiste à estimer les paramètres de population ainsi que leur distribution statistique. Les paramètres individuels sont alors issus de cette distribution puis permettent de reconstruire un profil pharmacocinétique individuel (Figure 21 & 22).

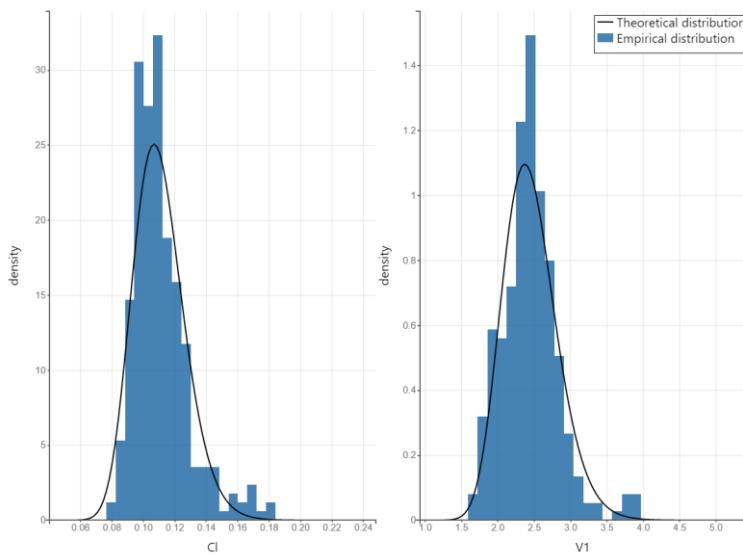


Figure 22 : Distribution des paramètres pharmacocinétiques de clairance et de volume.

Un modèle non linéaire à effets mixtes peut se diviser en deux parties : Le modèle structurel et le modèle statistique. Afin de conduire l'analyse PK par approche de population, on utilise des logiciels spécialisés, comme NONMEM (ICON Development Solution, Ellicott City, USA) ou MONOLIX (Lixoft, Ile de France, France).

Expression générale du modèle (Monolix) :

D'un point de vue mathématique, on peut décrire le modèle de la façon suivante [190]:

$$C_{ij} = f(x_{ij}; \varphi_i) + g(x_{ij}; \varphi_i) \times \varepsilon_{ij} \text{ où } \varepsilon_{ij} \sim N(0; \sigma^2)$$

- La fonction f correspond au modèle de structure et la fonction g correspond au modèle statistique. Ces deux fonctions sont non linéaires.
- C_{ij} correspond à la concentration ou à l'observation du patient
- φ_i correspond au vecteur contenant les paramètres du modèle

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

- ε_{ij} correspond à l'erreur résiduel de loi normale centrée sur 0 et de variance σ^2 . La variabilité résiduelle décrit la différence entre la concentration observée et la concentration prédictive, elle traduit la variabilité aléatoire non expliquée par le modèle.

Le modèle de structure ou structural :

La fonction f ou le modèle de structure correspond aux équations mathématiques qui permettent de décrire un processus biologique que l'on cherche à modéliser (Figure 23). Il s'agit de décrire la relation entre la concentration plasmatique ou sanguine d'une molécule avec le temps, la dose et les paramètres PK. Cette structure est décrite par un ensemble de compartiments interconnectés avec des constantes de transferts entre eux. Chaque compartiment est représenté par une équation différentielle décrivant le bilan des entrées et des sorties en molécule pour chaque intervalle de temps t :

$$\frac{dAa_{(t)}}{dt} = \sum \text{entrées dans } A - \sum \text{sorties de } A$$

La figure ci-dessous représente un modèle à 2 compartiments avec une administration en I.V

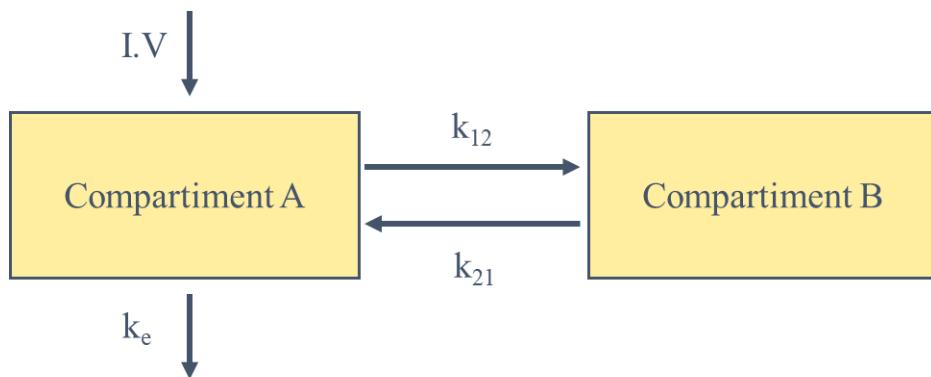


Figure 23: Modèle à 2 compartiments. Le compartiment (A) représente le compartiment central et le compartiment B représente le compartiment périphérique. Les constantes k_{12} et k_{21} représentent le transfert d'un compartiment A vers B.

Le système d'équation qui permet de décrire l'évolution de la quantité de molécule dans chaque compartiment est le suivant :

$$\frac{dAa_{(t)}}{dt} = k_{21} \times Ab_{(t)} - (k_{12} + k_e) \times Aa_{(t)}$$

$$\frac{dBb_{(t)}}{dt} = k_{12} \times Aa_{(t)} - k_{21} \times Ab_{(t)}$$

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

Avec k_{12} et k_{21} , les constantes de transferts entre les compartiments A et B et k_e la concentrant d'élimination du compartiment A. Les conditions initiales de ce modèle sont $A(0) = \text{dose}$ et $B(0) = 0$. Dans Monolix, on peut procéder au calcul de la concentration en divisant la quantité de matière au cours du temps $A_a(t)$ par le volume de distribution V_a

$$Ca_{(t)} = \frac{Aa_{(t)}}{V_a}$$

Ainsi le modèle procédera à l'ajustement sur la concentration et non sur la quantité de matière. Rappelons qu'en général, les données collectées sont des concentrations.

Dans la majorité des cas, la cinétique est linéaire. La vitesse de transfert est proportionnelle à la quantité de médicament ou de molécule présente dans le compartiment. On peut également retrouver deux autres formes :

- Processus d'ordre 0 (la vitesse de transfert est constante) : $\frac{dA_{(t)}}{dt} = k$
- Processus non linéaire de type Michaelis-Menten : $\frac{dA_{(t)}}{dt} = \frac{V_m}{(k_m \times V) + A} \times A$

Le choix de la relation dépend principalement des connaissances de la cinétique de la molécule mais également du profil PK qu'elle présente. Ces différentes possibilités peuvent être testées et dépendent de l'ajustement du modèle aux données expérimentales.

Le modèle statistique :

La variabilité inter-individuelle (IIV) : Dans un modèle non linéaire à effets mixtes, un paramètres PK individuel φ_i est obtenu à partir du paramètre moyen dans la population φ_{pop} (valeur typique) et un écart η_i qui représente la déviation au sein de la population, selon la formule suivante :

$$\varphi_i = \varphi_{pop} + \eta_i \text{ où } \eta_i \sim N(0; \omega^2)$$

Monolix estime donc la valeur typique (effet fixe ou valeur du paramètre PK de population) ainsi que la déviation standard des effets aléatoires ω^2 (Standard deviation of the random effects). L'estimation de la IIV peut se faire en suivant différentes lois statistiques : la log-normal, logit-normal, probit-normal (Ex. dans le cas de l'estimation de la biodisponibilité F , un ratio entre 0 et 1).

Afin de s'assurer que l'estimation de la distribution du paramètre est correcte, un test de Shapiro est proposé pour vérifier la distribution du paramètre (hypothèse nulle étant qu'elle suit une loi

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

normale). Si la p-value est faible, il se peut que la distribution ne soit pas gaussienne et qu'une autre loi de distribution des paramètres soit nécessaire.

La valeur ω^2 correspond donc à l'écart type du paramètre PK qu'on transforme généralement en coefficient de variation (CV). À noter que sur Monolix, il ne donne que ω^2 , il est donc nécessaire de calculer le CV(%) selon la règle suivante

$$CV(\%) = \sqrt{\omega^2} \times 100$$

En PK, les paramètres estimés sont tous positifs, c'est pour cela qu'on utilise une échelle log-normale grâce à la transformation suivante :

$$\varphi_i = \varphi_{pop} \times e^{\eta_i} \text{ où } \eta_i \sim N(0; \omega^2)$$

Lorsque ω^2 est faible, et dans le cas de données log-normales, le coefficient de variation peut également être approximé par racine (ω^2)*100 (en pourcentage) [191].

La variabilité intra-individuelle :

La variabilité intra-individuelle des paramètres pharmacocinétiques est une variabilité qui peut être observée chez un même individu, à différentes occasions (elle peut également être appelée variabilité inter-occasion). La source de cette variabilité peut être identifiée et se manifeste comme des changements à différentes occasions chez un individu. La dégradation de la fonction rénale par exemple peut impacter la clairance d'un médicament si ce dernier est éliminé par voie rénale ou l'absorption du médicament qui peut fluctuer chez un individu si celui-ci est pris à jeun ou durant un repas. Les sources de variabilité sont multiples, il est possible de modéliser cette variabilité liée à l'occasion du traitement.

Au niveau de l'estimation du paramètre individuel, on peut écrire (Monolix) :

$$\varphi_i = \varphi_{pop} + \beta_{i,k} + \eta_{i_{IV}} + \eta_{i_{IOV}} \text{ où } \eta_{i_{IV}} \sim N(0; \omega^2) \text{ & } \eta_{i_{IOV}} \sim N(0; \gamma^2)$$

Où η_{IOV} représente la variabilité inter-occasion appartenant à une loi normale centre sur 0 et de variance γ^2 .

Le modèle de covariable :

Un des objectifs de l'analyse de population est d'identifier les caractéristiques des patients, que l'on nomme covariables, qui influencent les paramètres PK et sont à l'origine d'une partie de la variabilité interindividuelle observée. Comme vu précédemment, ces covariables sont variées. Il peut s'agir de caractéristiques liste non exhaustive) :

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

- Démographiques : Age ou sexe
- Morphologiques : Poids, taille, IMC
- Biologiques : Créatininémie, albuminémie, ALT
- Physiopathologiques : Insuffisance rénale, hépatique
- Médicaments : polymédication (interaction médicamenteuse)

Le choix des covariables se base sur les connaissances a priori de la molécule (Ex : mécanisme d'élimination), de la pathologie (Ex : influence les paramètres physiologiques en relation avec l'élimination ou l'absorption du médicament) ou encore d'interactions avec d'autres médicaments (Ex : co-administration avec des inhibiteurs des cytochromes P450). Ces informations permettent d'anticiper des risques de surexposition ou de sous-exposition des patients.

L'écriture des paramètres PK varie en fonction de la nature des covariables : continue ou catégorielle.

Covariables continues :

L'exemple le plus commun serait l'âge et son influence sur la clairance. On peut alors estimer la valeur de la clairance (CL) selon 3 relations :

- Relation linéaire

$$CL_i = (\varphi_{pop} + \varphi_{AGE} \times AGE_i) \times e^{\eta_i}$$

Avec la CL_i , la clairance de l'individu, φ_{pop} la clairance moyenne d'un patient d'âge nul, φ_{age} l'effet de l'âge sur la clairance, AGE_i l'âge de l'individu i, et (η_i) la variabilité interindividuelle associée à l'individu i. Le paramètre φ_{age} s'interprète ainsi : Si l'âge de l'individu augmente d'un an, sa clairance typique augmente de la valeur de φ_{age} .

- Relation linéaire centrée sur la médiane

$$CL_i = (\varphi_{pop} + \varphi_{AGE} \times (AGE_i - AGE_{med})) \times e^{\eta_i}$$

Dans la relation linéaire, le paramètre φ_{pop} correspondait à la clairance moyenne d'un patient d'âge nul, qui ne fait pas sens biologiquement. Afin d'interpréter l'influence de l'âge sur la clairance, on préfère centrer la relation sur la médiane ou la moyenne. Φ_{pop} devient la clairance moyenne pour un patient d'âge de l'âge médian ou moyen dans la population étudiée. Cependant, l'interprétation reste inchangée.

- Relation de type puissance

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

$$CL_i = \varphi_{pop} \times \left(\frac{AGE_i}{AGE_{med}} \right)^{\varphi_{AGE}} \times e^{\eta_i}$$

Le paramètre φ_{pop} quantifie toujours l'effet de l'âge sur la clairance, cependant son interprétation n'est pas directe comme dans le cas de la relation linéaire. En convertissant sur une échelle logarithmique, on obtient :

$$\ln(CL_i) = \ln(\varphi_{pop}) + \varphi_{pop} \times \ln\left(\frac{AGE_i}{AGE_{med}}\right) + \eta_i$$

Le processus de sélection des relations entre les paramètres PK et covariables au cours du développement du modèle se base sur le modèle qui décrit le mieux les données.

Les covariables catégorielles :

Dans le cas d'une covariable catégorielle, comme le sexe, on peut implémenter la relation de deux façons différentes. Les relations sont strictement équivalentes mais l'interprétation n'est pas la même. La relation s'écrit alors :

$$CL_i = \varphi_{pop} \times (\varphi_{sex})^{SEX} \times e^{\eta_i}$$

Avec pour exemple SEXE qui vaut 1 pour une femme. Dans ce cas, la clairance typique chez les hommes est égale à φ_{pop} (SEX = 0). φ_{sex} représente le facteur par lequel la clairance typique est multipliée chez les femmes par rapport aux hommes.

On peut également implémenter l'estimation des clairances chez les hommes et les femmes différemment, on obtient pour chaque groupe :

$$CL_{typ,H} = \varphi_{pop1}$$

$$CL_{typ,F} = \varphi_{pop2}$$

Où $CL_{typ,F}$ et $CL_{typ,H}$ sont les clairances typiques dans le groupe des femmes et des hommes respectivement.

Test statistique de l'effet des covariables

Il existe différentes manières de tester les effets des différentes covariables dans le modèle. Une des approches les plus utilisées est la méthode dites « backward ». On réalise une analyse univariée dans laquelle on teste une à une chaque covariable. En fonction de l'impact sur la fonction objective ou sur le BICc (Bayesian Information Criteria corrected) la covariable est gardée ou non. Au degré de liberté (d.d.l) égal à 1 et un seuil de significativité de 0,05, si l'ajout

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

de la covariable permet d'obtenir une différence d'au moins 3,84, alors celle-ci est conservée. Ensuite toutes les covariables ayant un effet statistiquement significatif sont conservées et rassemblées dans un seul modèle. On les retire une à une du modèle et si ce retrait entraîne une augmentation significative de la fonction objective (dégradation), alors on conserve la variable. D'autres critères plus restrictifs peuvent être employés en changeant le seuil de significativité à 0,01 correspondant à une variation de 6,64 de la fonction objective. Il est nécessaire que cette évolution de la fonction objective s'accompagne d'une diminution de la variabilité interindividuelle ([Omega] sur Monolix). Cette diminution implique que la covariable permet d'expliquer une partie de la variabilité [189].

5.3. Estimations des paramètres pharmacocinétiques

Dans cette section, nous verrons les deux méthodes d'estimations des paramètres pharmacocinétiques. Ces derniers sont propres à chaque individu en fonction de ses caractéristiques biologiques, pathologiques et/ou en fonction des médications prises.

5.3.1. Estimation des paramètres pharmacocinétiques de population

Après avoir défini un modèle PK qu'on souhaite appliquer aux données collectées, le but réside dans l'estimation de paramètres PK permettant de minimiser l'écart entre les concentrations observées et les concentrations prédictes. Cette première étape de choix du modèle peut inclure différentes combinaisons de modèles, comme le modèle monocompartimental, bicompartimental, élimination d'ordre 1, 0 ou Michaelis-Menten. Ce principe repose sur la maximisation de la vraisemblance (Likelihood) représentant la probabilité d'observer les données étudiées avec le modèle et les paramètres utilisées. La métrique la plus utilisée est le logarithme de la vraisemblance (LL) et s'exprime ainsi :

$$LL_y(\theta) = \log(L_y(\theta)) \triangleq \log(p(y; \theta))$$

Où θ est le vecteur des paramètres PK de population du modèle considéré, $p(y; \theta)$ est la fonction de probabilité de distribution du paramètre estimée au sein des données de population.

Sur Monolix, l'estimation de ces paramètres PK est réalisé à l'aide de l'algorithme SAEM ou Approche Stochastique Espérance-Maximisation [192]. On peut résumer le fonctionnement de l'étape SAEM comme suit : C'est une méthode itérative qui permet de trouver les paramètres du modèle en maximisant la vraisemblance d'un modèle probabiliste. Il comprend deux étapes

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

- L'étape E (espérance) : Calcul de l'espérance de vraisemblance en prenant en compte les dernières variables observées (d'où la nécessité d'avoir un point de départ a priori)
- L'étape M (Maximisation) : Estimation du maximum de vraisemblance des paramètres trouvés à l'aide de l'étape E

Ce processus se réitère jusqu'à trouver le maximum de vraisemblance. Chaque étape d'optimisation prend en compte l'étape précédente dans son estimation des paramètres du modèle. D'après Chan et al ; cet algorithme est le plus abouti en termes d'estimation des paramètres [193].

La comparaison entre deux modèles emboités (l'un des modèles peut être considéré comme un cas particulier de l'autre) s'effectue à l'aide du test du rapport de vraisemblance. Ce teste consiste à comparer ou calculer la différence des deux valeurs de LL obtenues à partir des deux modèles. Il existe des cas où les modèles ne sont pas emboîtés alors on peut utiliser des critères comme l'AIC (Akaike Information Criterion), BIC (Bayesian Information Criterion) ou BICc (Bayesian Information Criterion corrected) :

$$AIC = -2LL_y(\theta) + 2P$$

$$BIC = -2LL_y(\theta) + \log(N) P$$

$$BIC_c = -2LL_y(\theta) + \dim(\theta_R) \log(N) + \dim(\theta_F) \log(n_{tot})$$

Où P représente le nombre total de paramètre et N le nombre de sujet. Le BICc pénalise la taille de θ_R (représente les effets aléatoires et les effets fixes impliqués dans le modèle aléatoire du paramètre individuel) avec le log du nombre de sujet (N) ainsi que de la taille de θ_F (représente tous les effets fixes, valeurs typiques dans la population, les paramètres β d'interaction avec les covariables impliqués dans le modèle non aléatoire du paramètre individuel ainsi que les paramètres du modèle d'erreur) avec le log du nombre total d'observation n_{tot} . Le BICc est donc plus pénalisant par rapport aux BIC et AIC.

En pratique, l'algorithme, dans sa 1^{ère} phase, va explorer l'espace de paramètres et se rapprocher d'un voisin de vraisemblance puis lors de la 2^{ème} phase, le smoothing ou affinage, il converge vers le maximum de vraisemblance.

5.3.2. Estimation des paramètres pharmacocinétiques individuels

Après l'estimation des paramètres de populations en utilisant l'algorithme SAEM, le logiciel procède au calcul des paramètres PK individuels. EBE ou *Empirical Bayes estimates* est la

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

valeur la plus probable d'un paramètre individuel en considérant l'estimation du paramètre dans la population et les données de chaque individu. Cette valeur représente le mode de la distribution conditionnelle du paramètre pour chaque individu. Ces valeurs permettent de calculer la valeur la plus probable pour chaque individu et donc la plus probable des prédictions individuelles (« fit » individuel).

Cependant, il arrive que les données de l'individu ne soient pas suffisamment informatives pour l'EBC. Dans ce cas-là, l'EBC a tendance à se rapprocher du centre de la distribution de la population (phénomène dit de “shrinkage”) et ne représente pas correctement la variabilité interindividuelle [191], [194], [195]. La valeur de “shrinkage” est acceptable dès lors qu'elle est comprise en 20 et 30% [196].

5.4. Évaluation du modèle

La validation du modèle se base sur des critères internes et externes. Nous n'évoquerons ici que les critères de sélection interne et spécialement sur l'interface Monolix.

La fonction objective

Différents critères peuvent être utilisés pour évaluer un modèle, notamment la fonction objective (qui est égale à $-2\log(\text{vraisemblance})$), et les indices AIC, BIC ou BICc. Ces critères ne permettent pas de juger directement de l'adéquation du modèle aux données. Cependant ils permettent de comparer deux modèles entre eux, et de juger par exemple de l'impact des covariables (modèle de covariable) ou du modèle statistique. Les 4 critères doivent être minimisés : plus leur valeur est faible, plus le modèle ajuste bien les données. Les différentes modifications du modèle évalué permettent de l'affiner et l'un des critères d'évaluation reste la fonction objective. Afin d'estimer si les modifications opérées dans le modèle permettent d'améliorer ce dernier, on se réfère à la table du χ^2 . Au risque α préalablement défini (5% en général) et à un degré de liberté donné, on peut évaluer si les modifications effectuées (ajout ou retrait de covariable, modification du modèle de structure ou du modèle d'erreur...) permettent de diminuer le critère d'intérêt. Si cette différence est supérieure ou égale à 3,84, alors la ou les modifications(s) faite(s) permet(tent) d'améliorer le modèle. Pour la sélection de covariable, ce seuil est plus restrictif avec un risque α de 1% et donc une diminution d'au moins 6,63 sur la table du χ^2 .

Diagnostic basé sur les graphes

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

L'évaluation de la qualité d'un modèle se base principalement sur l'appréciation visuelle de graphiques diagnostiques appelés « Goodness-of-fit plots » ou GOF. Ces GOF sont les suivants (Figure 24) :

- Prédictions individuelles ou de population versus les observations : Les points doivent être répartis autours de la droite d'identité. Ils permettent de juger de l'adéquation du modèle de structure aux données mais également du modèle d'erreur.
- Résidus en fonction des prédictions ou du temps : Les points doivent être répartis de façon symétrique autour de 0, avec 95% des points compris dans l'intervalle $[-2\sigma, 2\sigma]$, sans montrer de tendance particulière. Il permet également de juger du modèle de structure, du modèle d'erreur et d'en détecter les différents biais.
- Histogramme et diagramme quantile-quantile des effets aléatoires η_i : Permet de vérifier la distribution des effets aléatoires et de vérifier la normalité de ces derniers. Monolix propose également un test de Shapiro concernant la normalité des effets aléatoires
- Superposition des observations avec les prédictions individuelles ou de population en fonction du temps : Ce sont les courbes prédites par le modèle et elles doivent se rapprocher des courbes expérimentales. Ces courbes individuelles permettent de vérifier l'ajustement individuel de chaque sujet aux prédictions du modèle.

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

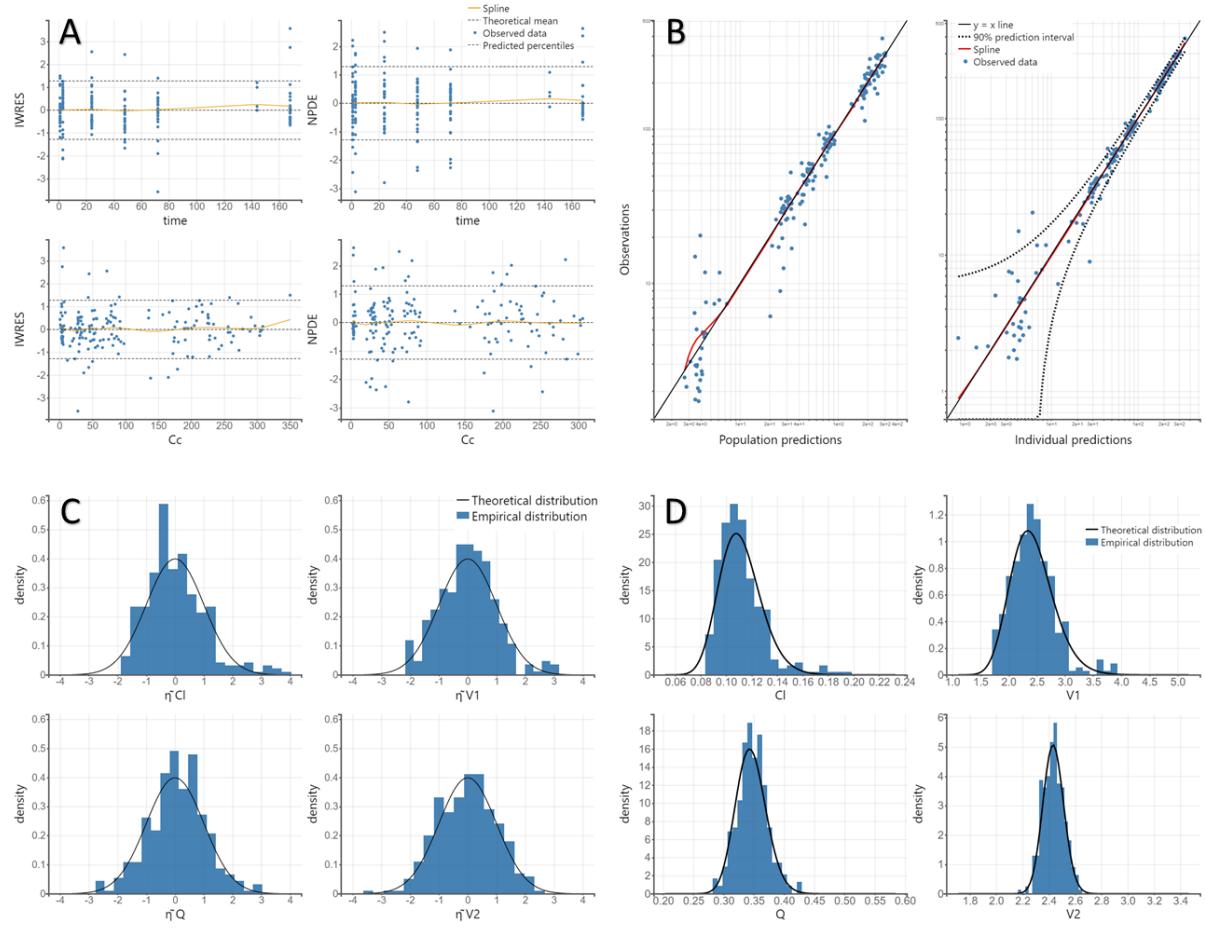


Figure 24 : Représentation des différents graphes lors de l'étape de diagnostic. (A) Les résidus par rapport au temps et aux concentrations observées. (B) Prédiction individuelle versus les données observées (Intervalle de prédiction à 90% dépend du modèle d'erreur). (C) Distribution des effets aléatoires ainsi que leur distribution normale. (D) Distribution des paramètres pharmacocinétiques de population (Log-normal).

Précision des estimations des paramètres

La quantification de l'incertitude associée aux paramètres PK du modèle est inhérente à la qualité du modèle. Sur Monolix, cette incertitude est mesurée à travers le SE ou erreur standard. Cette précision peut s'exprimer en pourcentage nommée RSE ou erreur standard relative (%) selon la formule suivante :

$$RSE (\%) = \frac{SE}{\varphi} \times 100$$

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

Où φ est la valeur du paramètre estimé (effet fixe). Afin de mieux appréhender l'interprétation des valeurs de RSE, la Figure 25 permet d'illustrer la notion de RSE. On admet généralement comme correct :

- Effets fixes (θ) : RSE < 30%
- Effets aléatoires (ω) : RSE < 50%

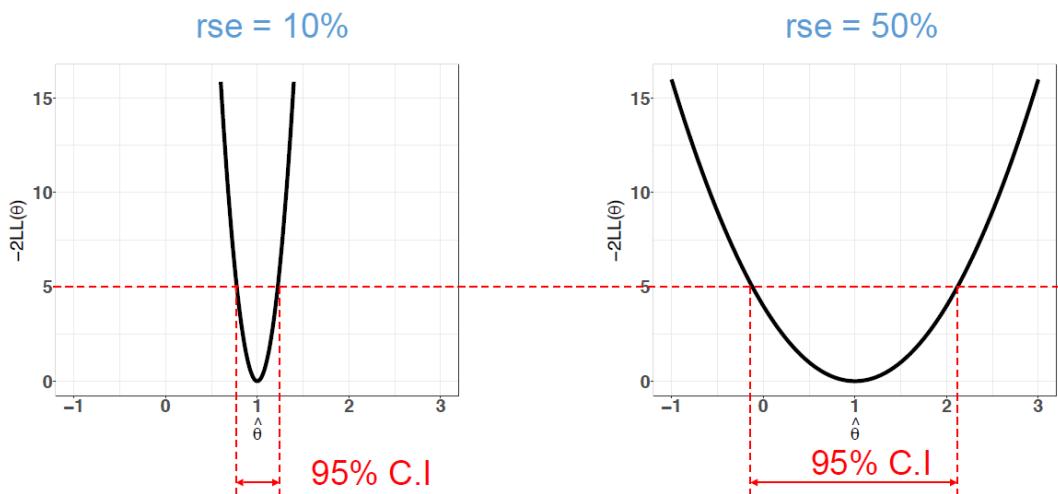


Figure 25: Notion de précision de l'estimation du paramètre en se basant sur l'erreur standard relative. Inspirée par le cours du Dr. Sébastien Benzekry

Visual Predictive Check (VPC) :

Le VPC est reconnu comme étant l'un des principaux outils d'évaluation du modèle et permet d'évaluer : (1) son adéquation aux données et (2) sa performance prédictive. Le VPC est obtenu en faisant des simulations à partir du modèle (généralement 500 sur Monolix). On calcule alors le 5^{ème}, le 50^{ème} et le 95^{ème} percentile des données simulées ainsi que leur intervalle de confiance à 90%. Les percentiles obtenus ainsi que leur intervalle de confiance (nommé levels sur Monolix) sont superposés avec les données collectées comme dans la Figure 26. Le VPC découle du découpage de la variable indépendante comme le temps en plusieurs intervalles que l'on nomme des « bins ». Cette sélection de « bins » peut reposer sur différents critères comme le nombre de données par « bins », le nombre de « bins » et le critère de calcul (même taille, même largeur ou pondérés par la méthode des moindres carrés). Néanmoins, il faut faire attention à l'interprétation du VPC si des covariables sont utilisées ou des doses différentes d'un sujet à un autre (typiquement le cas lors de l'utilisation de radiopharmaceutique) [197]. On propose alors de calculer plutôt des *prediction corrected* VPC (pcVPC), ce qui consiste à normaliser la variable dépendante (par exemple la concentration) dans chaque *bin* (Figure 26)

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

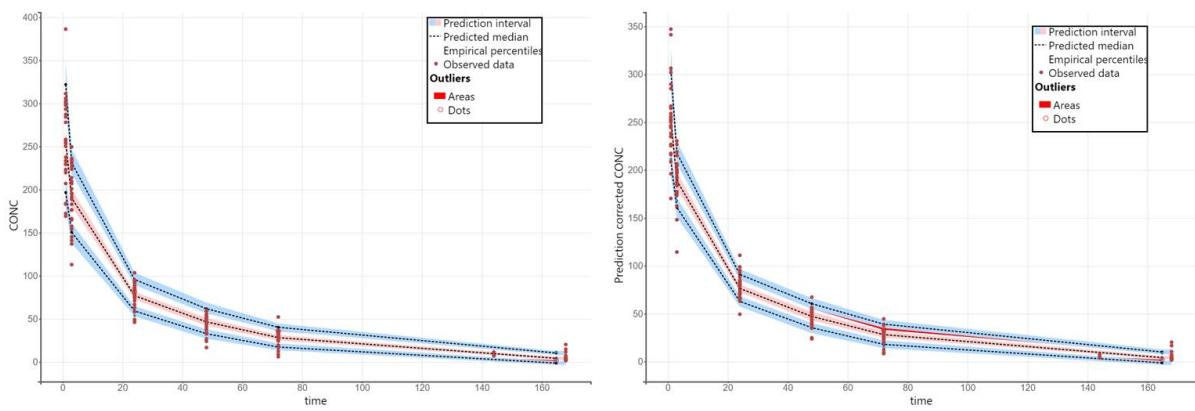


Figure 26 : VPC ou visual predictive check basé sur 500 simulations

Analyse de sensibilité (Monolix)

Une autre forme de validation consiste à varier les effets fixes du modèle dans un intervalle donné. À chaque lancement (ou « Run »), l'algorithme sélectionne des données dans l'intervalle prédefini pour les paramètres du modèle et débute une estimation des paramètres (selon SAEM). Cette technique a pour but de vérifier la stabilité du modèle et l'impact des valeurs des paramètres sélectionnées dans le modèle final. Si le modèle est robuste, la valeur de départ aura peu d'incidence sur l'estimation du LL final et tous les différents « runs » aboutiront à une valeur proche. En revanche, il se peut que certains « runs » présentent des écarts au niveau de l'estimation du LL en ayant un LL plus important. Ceci peut indiquer qu'un paramètre influence grandement la stabilité du modèle.

Workflow appliqué à la modélisation PK

Cet infographie permet de couvrir les différentes étapes lors de la sélection du modèle à la fin de l'analyse en utilisant Monolix (Figure 27). Ces différentes étapes regroupent (1) la sélection des modèles de structures comprenant les modalités d'administration (oral, à libération prolonger, I.V, perfusion...), nombre de compartiments, élimination linéaire ou non linéaire, etc. (2) le modèle d'erreur (3) le modèle de covariables (corrélation des paramètres PK versus covariables continues & catégorielle)

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

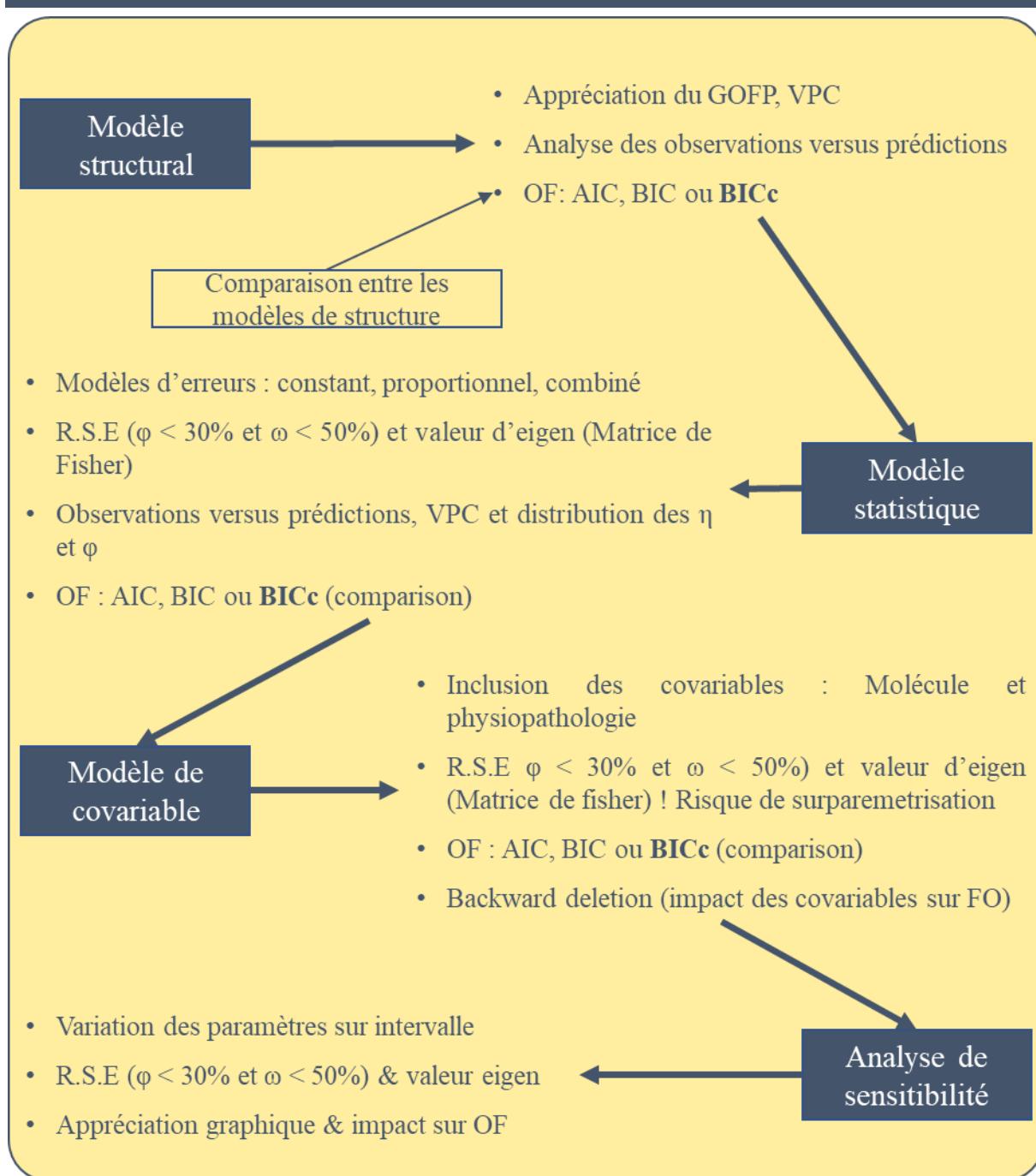


Figure 27 : Méthode d'analyse étape par étape sur l'outil Monolix lors d'une étude par approche de population.

5.5. Modélisation pharmacocinétique appliquée aux anticorps monoclonaux

Nous avons vu précédemment les différentes caractéristiques pharmacocinétiques des ACM. Ces derniers présentent des caractéristiques complexes, comme une voie d'administration par voie I.V ou musculaire, une distribution souvent limitée aux compartiments systémiques et une

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

élimination par catabolisme réalisable par toutes les cellules au niveau du système réticulo-endothéliale. Au même titre que les petites molécules, les ACM présentent des formes de variabilités interindividuelles [198]. Cette variabilité peut être expliquée par la production d'ADA, polymorphisme pharmacologique du FcRn (*Variable Number of Tandem Repeat* ou Fc γ IIIa) et caractéristiques démographiques du patient.

Dans la majorité des approches par population décrites dans la littérature (clinique) sur les ACM, le modèle à 2 compartiments a été le plus utilisé pour représenter les données collectées. L'estimation du volume de distribution des compartiments central et périphérique présentait une valeur faible avec respectivement un volume de distribution compris entre 2,4 et 5,5 L pour le compartiment central et entre 1,3 et 6,8 L pour le volume du compartiment périphérique [198]. De plus, la variabilité interindividuelle sur le volume de distribution du compartiment central était modérée avec un coefficient de variation de 26% Cependant, la variabilité sur le volume de distribution du compartiment périphérique ainsi que de la clairance intercompartimentale (Q) n'étaient pas estimés. Les modèles de structure pour décrire l'élimination se basaient sur une élimination linéaire, non linéaire ou une combinaison des deux [198]. Le rationnel étant la voie d'élimination liée à l'expression de la cible (*TMDD* ou *Target Mediated Drug Disposition*). En effet, la fixation à la cible provoque l'internalisation du complexe puis métabolisation au sein de la cellule. La clairance des ACM estimée en clinique gravite autour d'un intervalle de 0,2 à 0,5 L/Jour [199]–[201] alors que la clairance des IgG endogènes est à 0,2 L/Jour.

Centanni et al [202] ont résumé dans un tableau (Tableau 10) les différents modèles structuraux utilisés ainsi que les paramètres PK de population obtenus. On remarque que le modèle utilisé pour les ACM ciblant l'axe PD-1/PD-L1 est un modèle à 2 compartiments avec une élimination linéaire et non linéaire. En revanche, la majorité des ACM présentent une élimination linéaire aux doses utilisées en clinique. Les différents paramètres PK estimés sont influencés par différentes covariables comme la présence ou non d'ADA, la concentration d'albumine ou albuminémie, la taille tumorale ou encore la masse corporelle.

Bien que la majorité des modèles appliqués soient des modèles à 2 compartiments pour décrire la pharmacocinétique de population des ACM, des modèles plus mécanistiques ont vu le jour pour décrire les données PK/PD du efalizumab et du omalizumab [203], [204]. Il est nécessaire de comprendre les phénomènes sous-tendant la PK des ACM. Si on se concentre sur la clairance, les ACM sont majoritairement éliminés par une captation cellulaire puis dégradation protéolytique. La voie catabolique suit ainsi deux voies d'éliminations [205]. C'est sur cette

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

base que des modèles PK de population incluent deux formes de clairance comme le décrit la figure ci-dessous.

Non spécifique ou linéaire : cette voie d'élimination du 1^{er} ordre comprend l'interaction des ACM avec la région FcRn et FcRγ.

Spécifique ou non linéaire : cette voie d'élimination dépend des interactions avec la cible ou de la région Fab de l'ACM et la cible. Il faut également tenir compte du fait que l'expression de la cible peut évoluer au cours du temps et du traitement.

Bien que ces modèles ne reflètent pas la clairance non linéaire, les doses utilisées en thérapie sont très importantes et elles saturent les phénomènes d'élimination cible-dépendants.

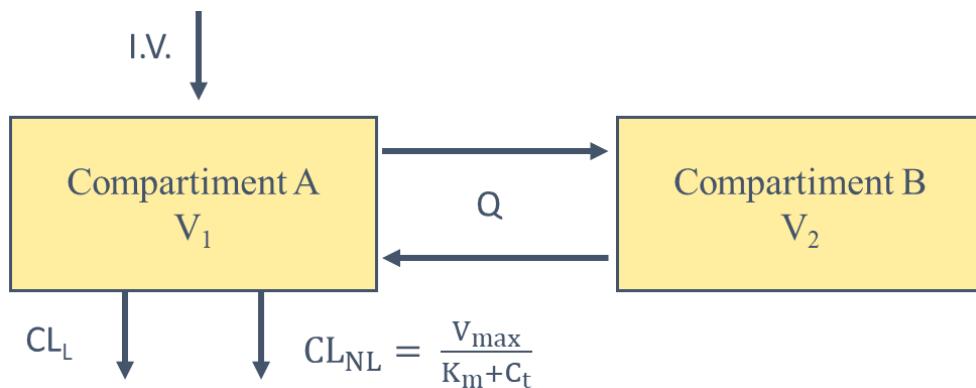


Figure 28 : Modèle pharmacocinétique avec une élimination linéaire et non linéaire.

CL_{NL} correspondant à la clairance non linéaire dépendant de la fixation des ACM à la cible et CL_L correspondant à la clairance linéaire représente une forme d'élimination non saturable (Figure 28). On en déduit que si la concentration est importante, la composante CL_{NL} devient négligeable. Il est donc compréhensible qu'à certaines doses, les modèles PK employés n'incorporent pas d'élimination non linéaire [198].

Modèle TMDD

Les modèles de types TMDD tendent à expliquer le caractère non linéaire qu'on retrouve au niveau des données collectées des ACM. En 1994 Levy, a introduit le concept de TMDD étant donné qu'on observe une différence entre les molécules avec une élimination du 1^{er} ordre (mono, bi ou tri exponentielle) et celles présentant une grande affinité pour leurs cibles. De plus, les molécules présentant ce type de caractéristique montrent une forme de proportionnalité qu'à forte dose à l'inverse des faibles doses [206]. Le TMDD se produit dès lors que la molécule (ACM) d'intérêt se fixe sur sa cible. Cette fixation influence la distribution et l'élimination des

5. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux

ACM. Le modèle TMDD prend donc en compte, la liaison (k_{on}) et la déliaison (k_{off}) de l'ACM à la cible, la synthèse (k_{syn}) et la dégradation (k_{deg}) de la cible ainsi que l'internalisation du complexe (k_{in}).

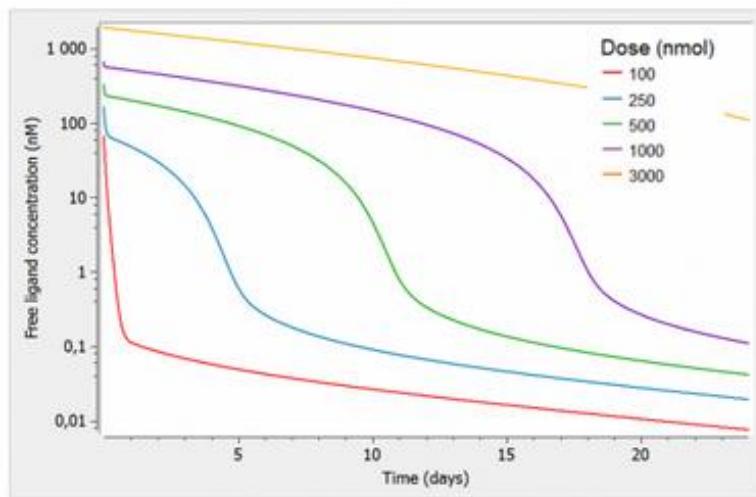


Figure 29 : Évolution de la concentration en fonction du temps avec différentes doses dans un modèle TMDD. De monolix.lixoft.com

Tableau 10 : Modèle pharmacocinétique de population utilisé pour les checkpoints inhibiteurs [167].

Molécule	Dose (mg/kg)	PopPK model	CL (L/Jour)	Vc (L)	VP (L)	Q (L/Jour)	VII (CV(%))
Atezoliz- umab	1 à 20	2-comp, LE	0,2	3,3	3,4	0,5	CL : 29% VC : 18% VP : 34%
Durval- umab	0,1 à 20	2-comp, LE + NLE	0,2	3,5	3,5	0,5	CL : 27% VC : 22%
Nivol- umab	0,1 à 20	2-comp, LE	0,2	3,6	2,8	0,8	CL : 35% VC : 35%
Pembro- lizumab	1 à 10	2-comp, LE	0,2	3,5	4,1	0,8	CL : 38% VC : 21%

CL : Clairance, VC : Volume du compartiment principale, VP : Volume du compartiment périphérique, comp : compartiment, LE : élimination linéaire, NLE : élimination non linéaire.

B. Travaux personnels

1. Objectif de la thèse

L'immunothérapie a changé le paradigme du traitement du CPNPC. La réponse immunitaire s'organise finement autours de signaux d'activation (ex : CMH, INF) et d'inhibition (ex : PD-1, PD-L1, TIM3, etc). Ces phénomènes d'inhibition sont nécessaires afin de contrôler la réponse immunitaire et d'éviter la prolifération anarchique des cellules immunitaires. Cependant, des cellules cancéreuses peuvent exprimer ces checkpoints inhibiteurs pour échapper au contrôle du système immunitaire. Cette action aura pour effet d'inactiver des cellules effectrices comme les lymphocytes cytotoxiques (LT). L'interaction de PD-1 avec PD-L1 provoque des cascades de signaux inactivant les LT. En bloquant l'action des checkpoints inhibiteurs, l'immunothérapie tente de restaurer les fonctions des LT au sein de la tumeur.

Les résultats cliniques de l'immunothérapie ont permis d'améliorer la survie globale dans les stades avancés du cancer par rapport à la chimiothérapie. Au même titre que les thérapies ciblées (ex : inhibiteurs des tyrosines kinases dirigés contre les mutations EGFR, ALK, etc.), les patients doivent être sélectionnés sur des critères d'expression des biomarqueurs d'intérêts. Dans le cas d'une administration en 1^{ère} ligne du pembrolizumab dans le traitement du CPNPC au stade avancé, l'expression de PD-L1 au niveau du tissu tumoral doit être supérieur à 50% (par immunohistochimie, SP142). Cependant, certains patients ne présentant pas de seuil de positivité de l'expression de PD-L1 attendu, semblent répondre à l'immunothérapie. En fonction de la localisation du tissu prélevé lors de la biopsie, tumeur primaire ou métastase, l'expression de PD-L1 peut être hétérogène. Il faut toutefois nuancer les résultats des traitements par immunothérapie. Dans la majorité des cas, des phénomènes de résistances apparaissent et la croissance tumorale reprend dans les mois suivants.

Il devient donc nécessaire de développer des techniques permettant d'estimer l'expression de PD-L1 sur l'ensemble de l'organisme avant de débuter la phase de traitement et de suivre l'évolution de PD-L1 au cours du temps afin d'anticiper les formes d'échappements thérapeutiques. Des compagnons diagnostic basés sur l'utilisation de l'imagerie nucléaire (non-invasif) permettraient de répondre à ces questions. L'utilisation d'une molécule analogue au traitement permettrait d'évaluer l'expression de PD-L1 dans l'ensemble de l'organisme et de suivre son évolution au cours du temps et du traitement. L'utilisation de radiotraceurs expose le patient à des rayonnements ionisants. Il est donc important d'évaluer la dose efficace reçue par

1. Objectif de la thèse

le patient pour s'assurer que le risque lié à l'exposition des RI est inférieur au bénéfice de l'examen.

Mes travaux de thèse portent sur le développement d'un modèle syngénique de CPNPC puis de l'évaluation de l'expression de PD-L1 à l'aide d'un anti-PDL1 murin marqué au zirconium-89.

Dans cette 1^{ère} partie nous allons voir la mise en place et la caractérisation du modèle préclinique. Afin de mimer au mieux la pathologie du CPNPC chez l'homme, nous avons mis en place le développement d'un modèle murin syngénique de CPNPC suivant la méthode de Howard Li et al :

1. Sélection des cellules CMT167 appartenant à la lignée murine d'adénocarcinome et hautement métastatique. Celles-ci portent la mutation KRAS retrouvée chez l'homme et une validation de l'expression de PD-L1 a été réalisé à l'aide de la cytométrie en flux.
2. Injection de 10 000 à 15 000 cellules CMT167 à travers la cage thoracique la souris C57BL/6.
3. Validation des lésions tumorales à l'aide du scanner 1 semaine après l'injection des cellules
4. Des coupes histologiques pulmonaires ont été réalisées afin de valider l'expression de PD-L1 en utilisant l'immunohistochimie.
5. Une caractérisation du modèle a été mise en place afin d'évaluer la survie des souris CPNPC sous traitement anti-PD1
6. Afin d'évaluer l'intérêt du modèle préclinique dans l'étude de l'évolution du MET, nous avons suivi l'expression de TIM-3 dans le temps chez des souris CPNPC traitées par immunothérapies à l'aide de l'immunofluorescence (IF)

Dans une 2^{ème} partie, nous allons radiomarquer un anticorps murin anti-PDL1 avec du [⁸⁹Zr], étudier sa biodistribution et sa dosimétrie dans un modèle de souris saine puis un modèle de souris CPNPC :

1. La mise en place de la méthode de radiomarquage de l'anti-PDL1 avec le zirconium-89.
2. Les tests *in vitro* d'immunoréactivité, d'affinité et de stabilité permettant de valider l'utilisation du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 avant l'étape *in vivo*.
3. La distribution du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 chez les souris saines et chez les souris CPNPC à l'aide de l'imagerie TEP-CT à 24h, 48h, 72h et 168h. La distribution chez les souris CPNPC nous permet dans un premier temps d'évaluer le rapport signal-sur-bruit,

1. Objectif de la thèse

consistant en un rapport entre la concentration tumorale divisée par la concentration pulmonaire.

4. La spécificité du traceur sera testée à l'aide d'une cohorte de souris co-injectée avec un excès d'anticorps non-radiomarqués.
5. L'application de la modélisation par approche de population afin d'estimer les paramètres PK au niveau des organes.
6. L'extrapolation des paramètres PK de la souris vers l'homme en utilisant des équations allométriques ainsi que l'estimation de la dosimétrie corps entier chez l'homme selon la CIPR 103.

Enfin dans une 3^{ème} partie, nous allons développer un modèle PK multi-compartiment permettant d'estimer les constantes de transferts entre le compartiment central et les compartiments périphériques et d'estimer le meilleur rapport signal-sur-bruit :

1. La mise en place du modèle pharmacocinétique multi-compartimental décrivant la distribution du traceur au niveau du compartiment sanguin, pulmonaire et tumoral.
2. Estimation du rapport signal-sur-bruit à l'aide des prédictions des concentrations tumorales et des concentrations pulmonaires
3. Simulation de l'administration des différentes doses et de l'impact sur le rapport signal-sur-bruit

2. Matériels et méthodes

Dans cette partie, nous allons détailler les techniques ainsi que le matériel utilisé pour répondre aux objectifs vu précédemment. Cette partie va donc se diviser en deux parties. La 1^{ère} consistera dans la mise au point du modèle préclinique, sa validation et sa caractérisation. La 2^{ème} partie portera sur le radiomarquage et l'imagerie préclinique. Concernant la partie PK, les éléments de méthodes ont déjà été présentés dans la partie 5 du chapitre A.

Le figure ci-dessous (Figure 30) présente toutes les souris utilisées durant cette thèse.

- 7 souris saines (groupe A) ont été utilisées pour la biodistribution du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 dans les conditions physiologiques. Ces souris serviront de groupe contrôle pour la biodistribution et le calcul de la dosimétrie.
- 24 souris CPNPC (groupe B) ont été utilisées pour la biodistribution du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 dans les conditions tumorales.
- 2 souris CPNPC (groupe C) ont été utilisées pour confirmer la spécificité de ciblage *in vivo* du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1.
- 24 souris CPNPC (groupe D) ont été utilisées pour caractériser l'évolution de TIM-3 à l'aide de l'immunofluorescence.

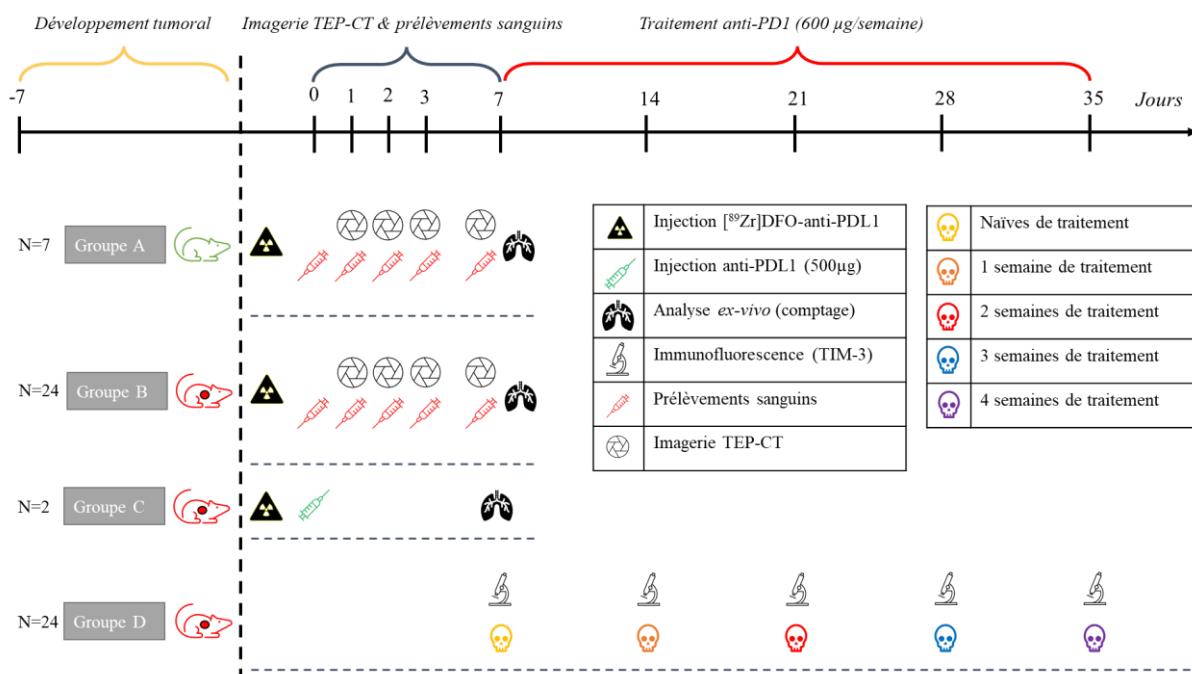


Figure 30 : Les différents groupes de souris utilisés au cours de la thèse.

2. Matériels et méthodes

Un autre groupe de 10 souris (groupe E) a été utilisé pour décrire la survie des souris CPNPC. Deux de ces souris n'ont pas développé de tumeur. Sur les 8 souris restantes, 3 ont été suivies sans traitement et 5 avec traitement. L'objectif était d'évaluer l'efficacité du traitement et la survie maximale des souris.

2.1. Modèle murin syngénique de CPNPC

Mise en place du modèle syngénique de CPNPC :

La mise en place du modèle préclinique et son développement a été réalisé en collaboration avec **IMAVITA**. Le modèle préclinique de CPNPC chez la souris consiste en l'administration de cellules CMT167 à travers la cage thoracique. Les cellules CMT167 appartiennent à la lignée murine du cancer du poumon et au sous-type histologique d'adénocarcinome hautement métastatique. Les souris sont anesthésiées, maintenues sous 3% d'isoflurane et injectées avec 10 000 à 15 000 cellules CMT167 dans un volume de 50 µL (Figure 31). Les cellules sont maintenues dans du milieu de culture (20% de sérum) et sur une plaque chauffante (~37°C).

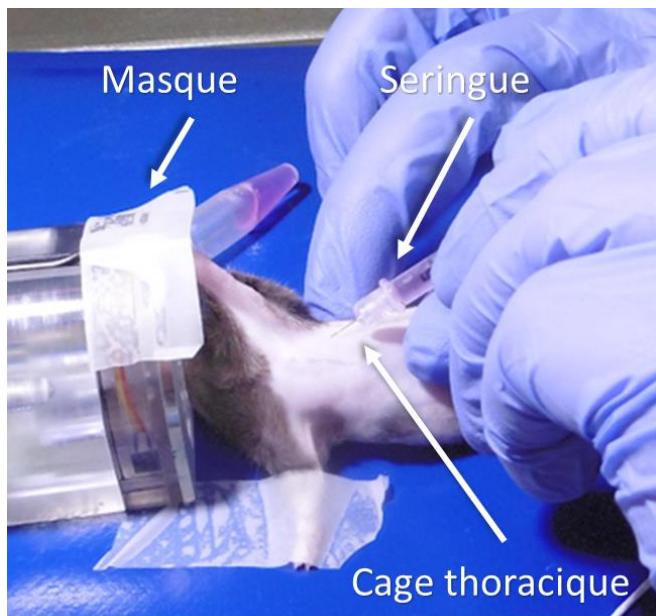


Figure 31 : Disposition de la souris lors de l'injection des cellules tumorales.

Imagerie CT des souris CPNPC :

La validation de la présence de lésions pulmonaires (indicateur de la prise tumorale) est réalisée à l'aide d'un scanner 1 semaine après injection des cellules. Sur les images CT, les lésions tumorales présentent un contraste plus important (généralement gris) par rapport aux poumons (noir). Ces lésions tumorales sont de deux types au point d'injection : Elles peuvent se retrouver

2. Matériels et méthodes

localisées à l'intérieur du poumon ou adjacentes au poumon se développant sur la paroi thoracique. Cette variation au niveau de la prise tumorale peut s'expliquer par le positionnement de l'aiguille lors de l'injection des cellules (Figure 32).

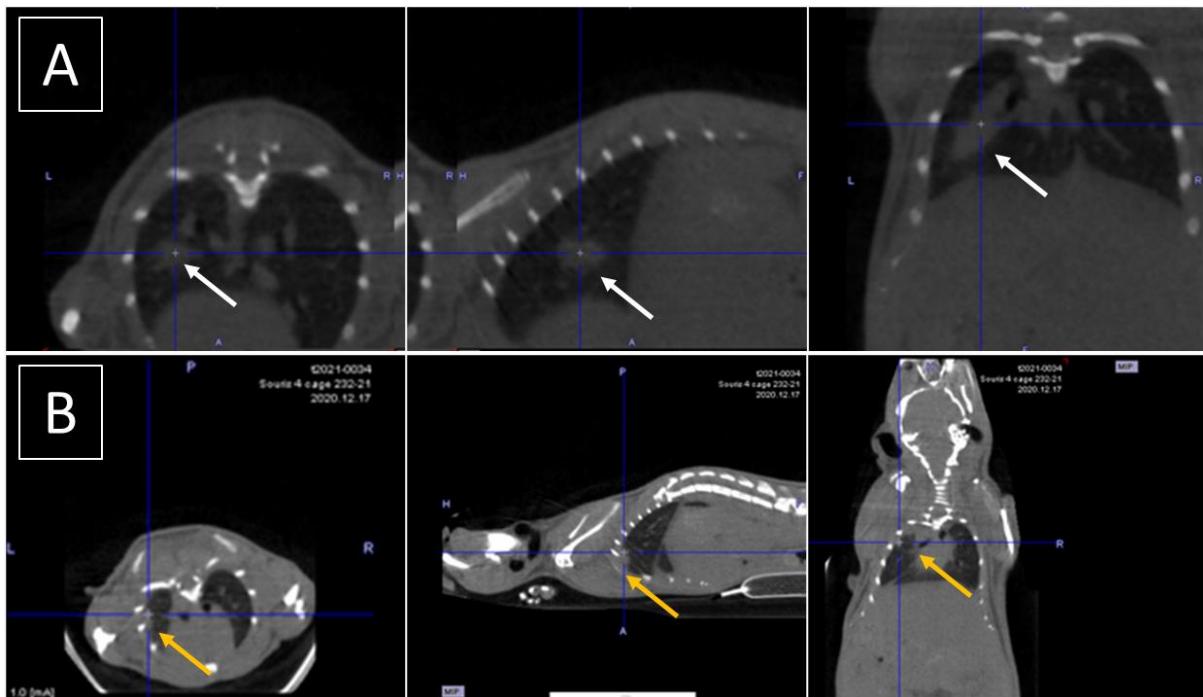


Figure 32 : Les deux types de formations tumorales dans le modèle préclinique. (A) indique un développement tumoral au niveau intrapulmonaire (flèches blanches) et (B) indique un développement tumoral au niveau de la paroi thoracique (flèche orange).

La Figure 32.A montre un développement de la tumeur à l'intrapulmonaire tandis que la Figure 36.B montre un développement au niveau de la paroi thoracique. Ce dernier type de lésion tumorale peut conduire à l'exclusion de la souris étant donné que le contraste de la tumeur est « noyé » dans le contraste du tissu intercostale et des côtes thoraciques. Ces deux formes de développement tumorale sont représentées *ex-vivo* sur la Figure 33.B (intrapulmonaire) et par la Figure 33.C (thoracique).

2. Matériels et méthodes

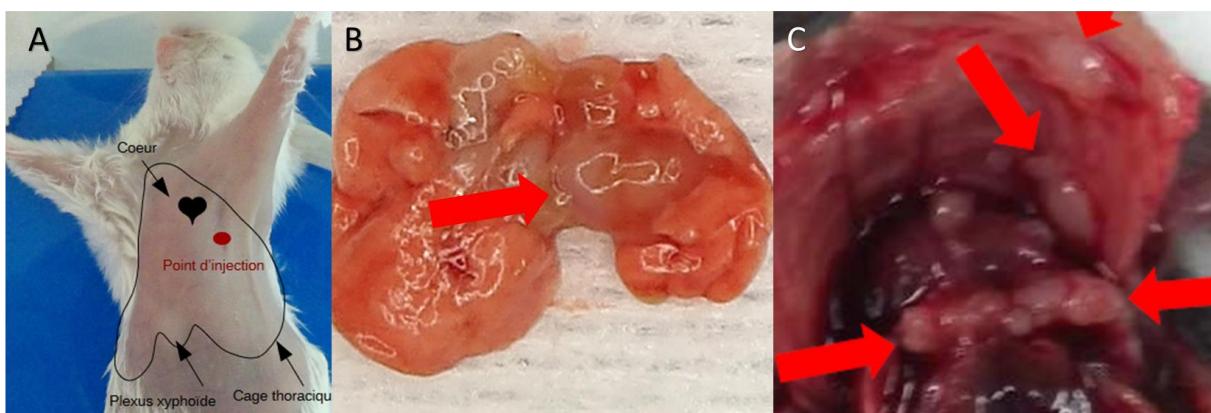


Figure 33 : Induction du modèle préclinique et validation ex-vivo du développement tumoral. (A) Point d'injection (en rouge), les flèches noires indiquent : cœur, cage thoracique et plexus xypoïdes, (B) développement intrapulmonaire et (C) développement intra-cage thoracique.

Évaluation de l'expression de PD-L1 à l'aide de l'IHC et de la cytométrie en flux :

L'évaluation de l'expression de PD-L1 est réalisée à l'aide de coupes histologiques sur des poumons de souris CPNPC. Dix jours après injection des cellules, un groupe de souris ($n=3$) CPNPC a été euthanasié et les poumons ont été instillés (formol 36%) puis prélevés. Les poumons ont été ensuite conservé dans un bloc de paraffine. Des coupes pulmonaires d'épaisseur de 5 μm ont été réalisées et ont été incubés durant toute la nuit avec de l'anti-PDL1 (PA5-20343, ThermoFisher) à la dilution 1:200. L'anticorps est révélé à l'aide d'un kit DAB (3,3'-diaminobenzidine). Le marquage des noyaux cellulaires est réalisé l'aide de l'hématoxyline. Ce dernier permet de distinguer les cellules pulmonaires et les cellules tumorales (généralement plus nombreuses et un tissu tumoral plus dense).

Une étude complémentaire réalisée par IMAVITA a montré que les cellules CMT167 (en culture) n'étaient pas naïves de l'expression de PD-L1 avec 20% d'expression. En revanche, l'expression de PD-L1 est très hétérogène chez la population de cellules tumorales exprimant le PD-L1.

Évaluation de l'efficacité du traitement anti-PD1 et de la survie des souris CPNPC

Dans le groupe E, 10 souris CPNPC ont été utilisées pour établir l'efficacité du traitement et d'évaluer la survie des souris traitées. Sur les 10 souris seulement 8 avaient des tumeurs (validées par *ex-vivo*). Le traitement (anti-PD1, pembrolizumab) a été administré 3 fois par semaine par voie intraperitoneale (200 μg /injection) pour un total de 600 μg .

2. Matériels et méthodes

Les souris traitées ($n=5$) présentent une médiane de survie à 32 jours contre 25 jours pour les souris non traitées ($n=3$) (Figure 34).

Bien que la cohorte utilisée soit faible en nombre, l'objectif de l'étude a permis d'établir une médiane de survie chez les souris traitées. Bien qu'informatif, cette durée permet d'établir l'intervalle de temps d'utilisation du modèle.

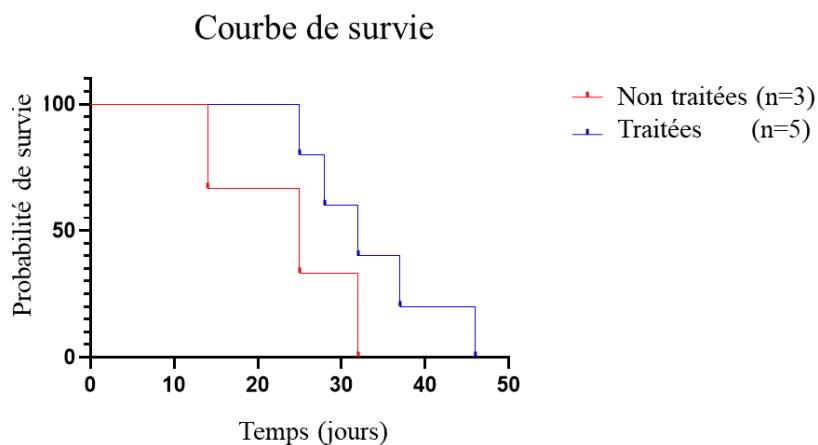


Figure 34 : Courbe de survie (Kaplan-Meier) chez la souris CPNPC traitée ou non par immunothérapie.

Évaluation de l'expression de TIM-3 à l'aide de l'IF :

Le même modèle préclinique de CPNPC a été utilisé pour décrire l'évolution de TIM-3 au cours du traitement par immunothérapie anti-PD1. Les souris ont été euthanasiées et les poumons prélevés : Souris naïves de traitement, 1 semaine après initiation du traitement, 2 semaines après initiation du traitement, 3 semaines après initiation du traitement et 4 semaines après initiation du traitement (ou S1, S2, S3, S4) (Figure 35).

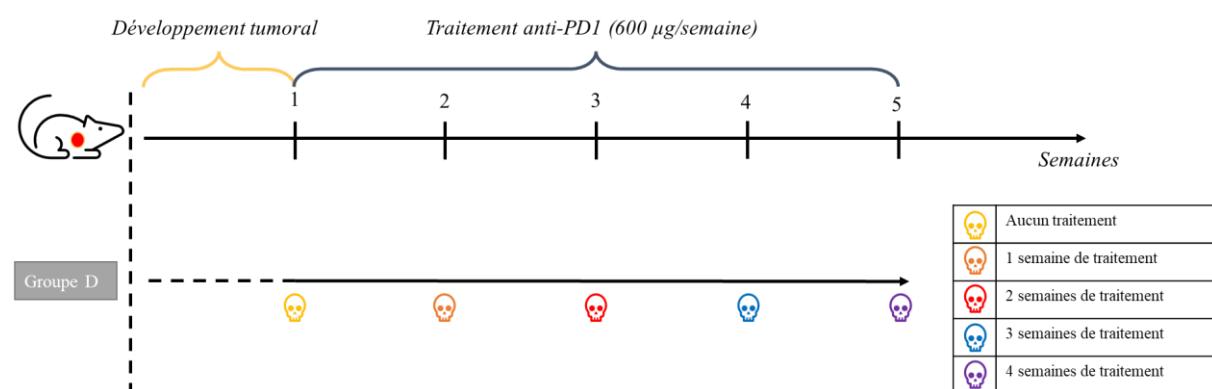


Figure 35 : Schéma d'étude pour l'évaluation de l'expression de TIM-3 chez les souris CPNPC. Les poumons ont été prélevés au cours des 4 semaines de traitement

2. Matériels et méthodes

Deux coupes histologiques successives de 5 µm d'épaisseur chacune sont réalisées. La première coupe en coloration hématoxyline et éosine (coloration des noyaux), nous a permis de valider la présence de la tumeur intrapulmonaire. Celle-ci se distingue avec une forte concentration cellulaire par rapport au tissu pulmonaire. Seules les coupes avec des tumeurs ont été analysées

Le deuxième marquage consiste à révéler la protéine TIM-3 sur la 2^{ème} coupe histologique. Ce marquage en IF a nécessité l'utilisation du TrueView (Vector) afin de diminuer les phénomènes d'autofluorescence durant 2 min. L'anticorps primaire (14-5871-82, ThermoFisher) a incubé durant toute la nuit et pour une quantité totale de 0,25 µg par test. L'anti-TIM3 a été révélé par un anticorps secondaire couplé à la *green fluorescence protein* (GFP). Le DAPI (Vector) a été utilisé afin de marquer les noyaux des cellules. Ce marquage permet de différencier le tissu tumoral avec une forte concentration de cellules en comparaison du tissu pulmonaire « sain ».

L'administration du traitement anti-PD1 chez les souris CPNPC montre une augmentation du signal lié à l'expression de TIM-3 au cours du temps chez les souris CPNPC de la tumeur (J7 post greffe) et n'ayant pas reçu le traitement. De plus, l'ensemble des coupes testées n'avaient pas montré de présence de TIM-3 pour les souris naïves de traitement. En revanche, les tumeurs étaient bien présentes avec une concentration cellulaire typiquement plus importante que le tissu pulmonaire « sain ». À S2 de traitements, certaines coupes semblaient présenter une expression de TIM-3, bien que le signal n'était localisé que sur certaines cellules. En revanche, à S3, le signal augmente sensiblement au niveau tumoral. À S4, le signal tumoral est le plus intense et est localisé dans ce qui semble être un infiltrat tumoral.

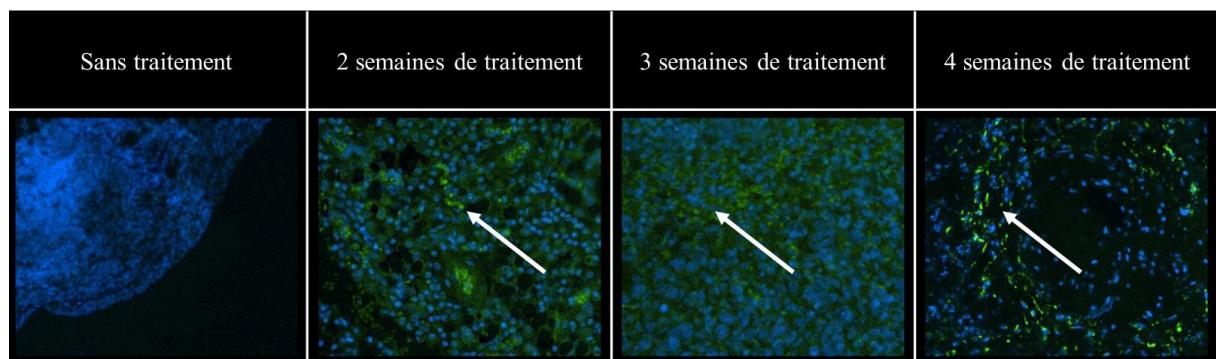


Figure 36 : Évolution qualitative de l'expression de TIM-3 chez la souris CPNPC traitée avec de l'anti-PD1. Les flèches blanches indiquent l'expression de TIM-3. Sauf pour l'image « Sans traitement » avec un grossissement de X5, les autres images sont au grossissement X10.

2.2. Mise en place d'une méthode de radiomarquage d'un anti-PDL1 murin et imagerie TEP-CT

Dans cette partie, nous allons voir la mise au point de la méthode de marquage au zirconium-89, les tests *in vitro*, l'imagerie TEP-CT et le design de l'étude

Radiomarquage au zirconium-89

La méthode de radiomarquage de l'anti-PDL1 se déroule en trois étapes : (1) la chélation et (2) le radiomarquage et (3) la purification. Elle est suivie par une étape de contrôle qualité du produit synthétisé (4)

(1) L'étape de chélation consiste en l'incubation à 37°C de l'anti-PDL1 (5,5 mg en moyenne) avec le p-NCS-Bz-DFO (déféroxamine modifiée) pour un ratio molaire de 1 pour 3. Le volume total attendu est d'environ 750 µL, dans le cas contraire, on ajoute du tampon phosphate (PBS). Le pH de la solution est 6. Avant incubation, il est nécessaire d'augmenter le pH de la solution contenant les anticorps en ajoutant 150 à 200 µL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 0,1 M. Le chélateur et l'anticorps sont liés par liaison covalente thioester (R-C(=O)-S-R). Après 30 min d'incubation à 37°C, la solution contenant l'anticorps chélaté est purifiée à l'aide d'une PD-10 (colonne d'exclusion). L'élution de la solution est réalisée à l'aide de l'acide gentisique 5 mg/mL et 0,25 M d'acétate de sodium. L'anticorps chélaté se retrouve à partir de 2 mL de solution éluée. L'élution avec de l'acide gentisique (joue le rôle d'antioxydant) diminue le pH de la solution chélatée à 5,5.

Afin de s'assurer de que la solution d'anticorps chélatés soit pure (ne présentant pas l'espèce chimique p-NCS-Bz-DFO), nous avons effectué un contrôle par chromatographie liquide haute performance (CLPH ou HPLC, UV 280 nm). On compare donc les chromatogrammes UV des anticorps chélatés au chromatogramme UV des anticorps natifs. On remarque que la solution

2. Matériels et méthodes

ne contient que les anticorps chélatés (Figure 37). Le temps de rétention de l'anticorps natif est de 6 min 30 sec.

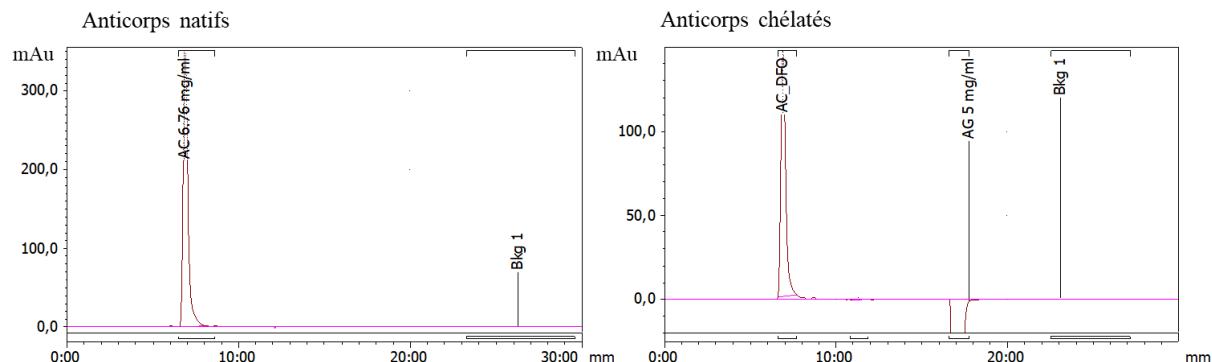


Figure 37 : Contrôle qualité de l'étape de chélation par HPLC.

(2) L'étape de radiomarquage consiste en l'incubation de l'anticorps chélaté avec le zirconium-89. Le zirconium-89 se présente sous forme liquide (oxalate de zirconium) avec un volume compris généralement entre 35 et 40 µL. Il est nécessaire d'ajouter de l'acide oxalique (1M) afin d'atteindre un volume final de 200 µL. Dans un 2nd temps, on neutralise le pH acide de l'oxalate de zirconium-89 avec 90 µL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2M. Dans un 3^{ème} temps, on ajoute de 1 mL d'HEPES à 0,5 M pour tamponner la solution. Enfin, dans 4^{ème} temps, on ajoute la solution d'anticorps chélatée pour un volume total de 710 µL. L'incubation dure en moyenne 1h30 et se réalise à 37°C sous agitation.

(3) L'étape de purification s'effectue à l'aide d'une colonne PD-10 pour séparer le [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 du zirconium-89 libre.

(4) L'étape de radiomarquage est suivie d'un contrôle de la pureté radiochimique (PRC) des fractions d'intérêt à l'aide d'une chromatographie sur couche mince (CCM) avec comme phase mobile de l'acide citrique et 20 mM de carbonate de sodium. Une Radio-HPLC est aussi réalisée afin de déterminer la concentration de [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 (Figure 38), elle permet également de confirmer le résultat de PRC obtenu par CCM.

2. Matériels et méthodes

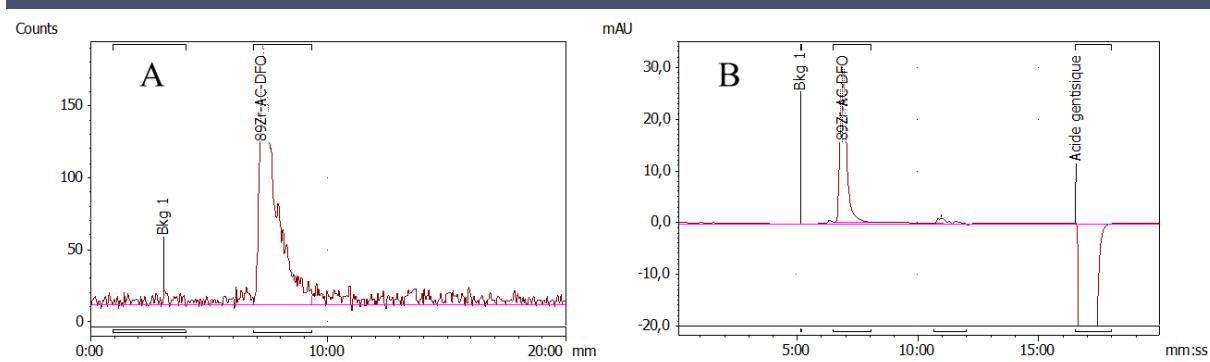


Figure 38 : Radio-HPLC contrôle permettant en fin de radiosynthèse. (A) représente le radio-chromatogramme, (B) chromatogramme UV

Test *in vitro* et tests de stabilité

Les différentes procédures de radiomarquage peuvent altérer la capacité de reconnaissance de l'anticorps à l'égard de sa cible. Il est donc nécessaire de contrôler son immunoréactivité (capacité de reconnaissance) et son affinité (ou *binding*, la force de reconnaissance). Afin de réaliser ces tests, les cellules CMT167 ont été sélectionnées. L'expression de PD-L1 a été validée par cytométrie de flux. De plus, les CMT167 seront utilisées pour l'induction du modèle tumorale.

L'étape d'immunoréactivité consiste en l'incubation de 2 nM du $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 sur des concentrations croissantes de cellules CMT167 allant de $0,125 \cdot 10^6$ à $1,5 \cdot 10^6$. A l'inverse, l'affinité est déterminée en utilisant des concentrations croissantes de $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 de 2,5 nM à 100 nM et une concentration fixe de cellules CMT167 ($1,5 \cdot 10^6$). Après 2h d'incubation et une faible agitation dans une étude à 37°C, les puits de cellules sont rincés 3 fois à l'aide d'une solution de 1%PBS/BSA (phosphate buffer solution/bovine serum albumine) puis détachés du puit à l'aide de trypsine/EDTA. Les cellules sont récupérées et la radioactivité est comptée à l'aide d'un compteur gamma durant 15 min.

Les tests de stabilité sont réalisés dans deux conditions : en présence de PBS et en présence de plasma. Dans un premier temps, environ 7 MBq de $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 pour volume de 500 μL sont incubés en présence de 100 μL de PBS et à 4°C. Un suivi par radio-HPLC est réalisé pour estimer la PRC à J1, J3 et J7. Dans un 2^{ème} temps, 4 MBq de $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 pour volume de 500 μL sont incubés en présence de 500 μL de plasma humain à 37 °C et maintenu sous agitation. Des tests par radio-HPLC à J7 sont réalisés pour déterminer la PRC. La PRC est indicateur de la stabilité en fonction du ratio anticorps radiomarqués et zirconium-89 libre. Plus la PRC du $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 est importante, plus le produit est stable.

2. Matériels et méthodes

Imagerie TEP-CT

Les images TEP-CT ont été acquises à l'aide du NanoScan PET/CT de MEDISO en corps entier. Les images CT ont été acquises durant 10 min avec tension de 35 kVp et un nombre de projection de 360. La taille des voxels étant de 251 x 251 x 251 µm. L'imagerie TEP a été acquise en statique durant 30 min, en liste mode et sur une fenêtre d'énergie de 400 à 600 keV. La reconstruction du signal s'est basée en utilisant le mode 3D de MEDISO (Tetra-Tomo3D Mediso) avec 4 itérations et 6 sous-ensembles. Les tailles des images étaient au départ de 406 x 406 x 377 (x,y,z) mais ont dû être cropées à la taille 200 x 200 x 200 (x,y,z) pour un confort d'utilisation et fluidité du traitement d'image. Des corrections comme une correction d'atténuation, une correction de dispersion, une correction de décroissance radioactives ont été appliquées aux données TEP-CT. Les souris étaient maintenues sous anesthésie avec de l'isoflurane (2,5 ~ 3%) durant l'acquisition.

Afin que les données de concentrations extraites des images TEP-CT correspondent aux concentrations réelles, un facteur de correction de 0,4 a été appliqué. En effet, les données sous caméra étaient surestimées par rapport aux concentrations mesurées à l'aide d'un compteur.

Design des études *in vivo*

La distribution du traceur et la spécificité de marquage ont été réalisées chez trois cohortes de souris (Figure 39) :

- Groupe A : 7 souris saines permettant d'étudier la distribution physiologique du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 et d'estimer la dosimétrie chez l'homme.
- Groupe B : 24 souris CPNPC permettant d'étudier la distribution tumorale du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 et d'estimer le meilleur temps d'imagerie après injection du traceur.
- Groupe C : 2 souris greffées permettant de réaliser l'étude de blocage.

En fin de suivi longitudinal, toutes les souris sont euthanasiées, les organes prélevés et comptés au compteur gamma.

Les deux groupes A et B de souris ont été injectées en intraveineuse avec des doses relativement similaires (groupe A : 742 kBq ± 45, groupe B : 737 kBq ± 98, t-test :P=0,98). La distribution du traceur a été évaluée à l'aide de l'imagerie TEP-CT au temps 24h, 48h, 72h et 168h. La distribution sanguine a été évaluée à l'aide de prélèvements sanguins à 1h, 3h, 24h, 48h, 72h et 168h. Certaines souris ont dû avoir des prélèvements sanguins et imageries à 144h car elles

2. Matériels et méthodes

présentaient une perte de poids importante (>20% du poids initial) et une dégradation de l'état général de la souris (recroquevillement, temps de réaction lent et respiration saccadée).

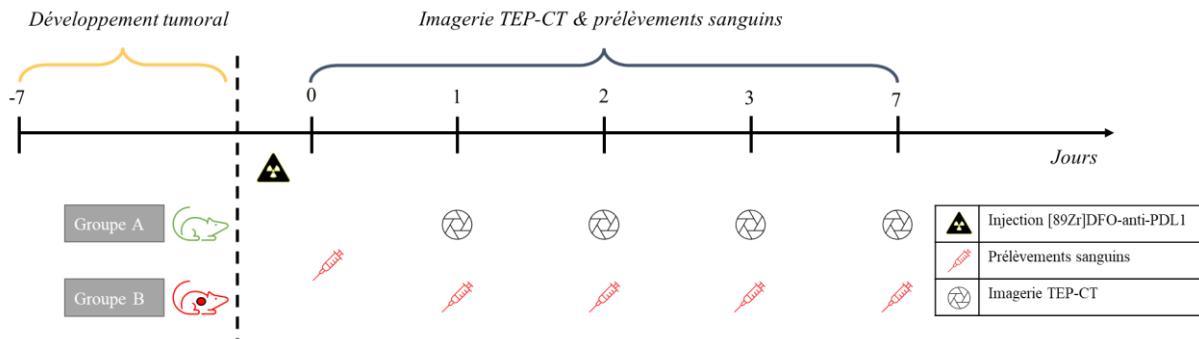


Figure 39: Schéma d'acquisition de données TEP-CT et prélèvements sanguins chez les groupes A & B

La cohorte C s'est vue co-injectée le traceur avec 500 µg d'anti-PDL1 froid (non radiomarqué) afin d'évaluer la spécificité du ciblage. Au bout d'une semaine, les souris ont été euthanasiées, les organes prélevés et comptés au compteur gamma.

Dosimétrie et pharmacocinétique

L'évaluation de la dosimétrie a été réalisée chez le groupe A. Les différentes acquisitions statiques à 24h, 48h, 72h et 168h ont permis de décrire la distribution du traceur au niveau des 5 organes d'intérêts (représentant plus de 70% de l'activité totale chez la souris) : Foie, cœur, poumon, os, reins. Les courbes temps-activités (TAC : *Time-activity Curve*) extraites ont été modélisées par approche de population. Le modèle à 1 compartiment a été utilisé pour décrire la distribution au niveau des organes et d'estimer l' $\text{ASC}_{0 \rightarrow \infty}$. La détermination de l'ASC s'est basée sur l'utilisation des *EBE*. En utilisant l'allométrie, l' $\text{ASC}_{0 \rightarrow \infty}$ a été extrapolée chez l'homme et une dose effective corps entier a été estimée. À l'aide des prélèvements sanguins, nous avons extrait les différentes paramètres PK chez les cohortes A & B. Nous avons également appliqué de la modélisation PK pour l'évaluation de la distribution du traceur et des sources de variabilités. Nous avons analysé la robustesse du modèle dans chaque org en comparant les valeurs d' $\text{AUC}_{0 \rightarrow 168\text{h}}$ issues de la méthode NCA.

Pour estimer la dosimétrie chez l'homme, nous avons utilisé IDAC-Dose 2.1. La donnée d'entrée nécessaire à l'estimation de la dosimétrie corps entier et par organe est **l'activité cumulée**. Pour calculer l'activité cumulée, il est primordial d'obtenir des données reflétant l'exposition de la cible (ou organe) au cours du temps. L'exposition peut s'apparenter à l'aire sous la courbe des données temps-activité (TAC : *Time-activity Curve*). À l'aide d'outil

2. Matériels et méthodes

mathématique comme l'approche compartimentale vue en amont, on peut décrire la cinétique de distribution de la radioactivité dans la cible ou l'organe.

Avant de procéder à l'application de modèle pharmacocinétique pour décrire les TACs, il est primordial : (1) de valider les valeurs des concentrations issues des ROI (région d'intérêt) si celles-ci proviennent d'images et (2) d'utiliser les données sans correction de la décroissance radioactive.

Après estimation des paramètres du modèle et une analyse de la concordance des données versus la prédition du modèle (exemple : prédictions individuelles versus observations et/ou VPC), on peut extraire le paramètre AUC_{∞} .

Afin d'obtenir l'activité cumulée depuis l'AUC, nous avons (1) pondérer la concentration par le poids de l'organe et (2) normaliser par la dose injectée. La 1^{ère} étape consiste en la transformation de la concentration par unité de temps et par volume en une concentration par unité de temps et par masse.

$$\frac{kBq \times t_{(h,min,sec)}}{Volume_{(mL,L)}} \rightarrow \frac{kBq \times t_{(h,min,sec)}}{Masse_{(g,kg)}}$$

Après cette étape, on devra diviser la valeur de l'activité par unité de masse, par la masse de l'organe. La 2^{ème} étape consiste à diviser l'activité par unité de temps ($kBq \cdot t$) par la dose injectée (kBq), on se retrouve ainsi avec activité cumulée en unité de temps (t). **L'activité cumulée** est donc la donnée d'entrée. Enfin, une dernière étape consiste à estimer l'activité cumulée chez l'homme et par organe, nous avons utilisé l'équation allométrique de McParland [207]. Celle-ci repose sur le calcul d'un facteur allométrique

$$\tilde{A}_{Organe,Humain} = \left(\frac{m_{Animal}}{m_{Humain}} \right)_{CE} \times \left(\frac{m_{Humain}}{m_{Animal}} \right)_{Org} \times \tilde{A}_{Organe,Animal}$$

Où \tilde{A} représente l'activité cumulée, CE représente le corps entier et Org représente l'organe.

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ⁸⁹Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

Ces travaux ont été acceptés pour publication dans le journal Frontiers in Medicine, Nuclear Medicine le 06/12/2021. Afin de simplifier la lecture de l'article, nous avons déplacé les résultats des données supplémentaires dans le texte principal excepté pour la Figure 3S.

Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ⁸⁹Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

Anis Krache^{1,2,5*}, Charlotte Fontan⁵, Carine Pestourie^{4,8}, Manuel Bardès^{3,7}, Yann Bouvet⁵, Pierre Payoux^{2,6}, Etienne Chatelut¹, Mélanie White-Koning^{1†}, Anne-Sophie Salabert^{2,6†}.

¹CRCT, UMR 1037, Université de Toulouse, Inserm, UPS, France

²ToNIC, Toulouse NeuroImaging Center, UMR 1214, Université de Toulouse, Inserm, UPS, France

³IRCM (Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier), UMR 1194 INSERM, Université de Montpellier and ICM, Montpellier, France

⁴CREFRE (Centre Régional d'Exploration fonctionnelle et Ressources Expérimentales) – Inserm UMS006, Plateforme GénoToul-Anexplo, Toulouse, France

⁵General-Electric - Zionexa, Targeting imaging and therapy, France

⁶Centre hospitalo-universitaire de Toulouse, France

⁷Département de Médecine Nucléaire, ICM (Institut du Cancer de Montpellier), Montpellier, France

⁸ENVT (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse), Toulouse, France

Correspondence:

Corresponding Author: anne-sophie.salabert@inserm.fr

[†]These authors have contributed equally to this work and share senior authorship.

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

Keywords: Anti-PDL1, Zirconium-89, PET, Dosimetry, Pharmacokinetics, Preclinical

Abstract

Anti-PDL1 is a monoclonal antibody targeting the programmed death-cell ligand (PD-L1) by blocking the programmed death-cell (PD-1)/PD-L1 axis. It restores the immune system response in several tumours such as Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). Anti-PDL1 or anti-PD1 treatments rely on PD-L1 tumoral expression assessed by immunohistochemistry on biopsy tissue. However, depending on biopsy extraction site, PD-L1 expression can vary greatly. Non-invasive imaging enables whole-body mapping of PD-L1 sites and could improve the assessment of tumoral PD-L1 expression. **Methods:** Pharmacokinetics (PK), biodistribution and dosimetry of a murine anti-PDL1 radiolabelled with zirconium-89, were evaluated in both healthy mice and immunocompetent mice with lung cancer. Preclinical Positron Emission Tomography (μPET) imaging was used to analyse $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ distribution in both groups of mice. Non-compartmental and compartmental PK analyses were performed in order to describe PK parameters and assess area under the concentration-time curve (AUC) for dosimetry evaluation in human. **Results:** Organ distribution was correctly estimated using PK modelling in both healthy mice and mice with lung cancer. Tumoral uptake occurred within 24h post-injection of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ and best imaging time was at 48h according to the signal-to-noise ratio and image quality. An *in vivo* blocking study confirmed that $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ specifically targeted PD-L1 in CMT167 lung tumours in mice. AUC in organs was estimated using a 1-compartment PK model and extrapolated to human (using allometric scaling) in order to estimate the radiation exposure in human. Human estimated effective dose was 131 $\mu\text{Sv}/\text{MBq}$. Conclusion: The predicted dosimetry was similar or lower than other antibodies radiolabelled with zirconium-89 for immunoPET imaging.

1 Introduction:

Lung cancer is the most common cause of death from cancer in the world with an estimated incidence of 2.09 million new cases and 1.76 million deaths in 2018 [37], [208]. There are two histological types of lung cancer in humans: Non-small cell lung cancer (NSCLC) in 80% of patients and small cell lung cancer in the remaining 20% [2]–[4]. In 70% of cases, lung cancer is diagnosed at an advanced stage [209]. The chances of overall survival at 5 years are considerably reduced depending on the stage of detection, ranging from 67% at stage I to 1% at stage IV [50]. New classes of immunotherapy based on immune checkpoint inhibitors targeting programmed cell-death ligand 1 (PD-L1) and programmed cell death 1 (PD-1) have

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

been shown to be efficient in NSCLC. Indeed, in lung cancers, tumour cells can overexpress PD-L1 which binds to PD-1 on cytotoxic T cells (CTL). This interaction blocks the CTL effector signal, limiting immune response and enabling tumoral growth and invasion. Immune checkpoint inhibitors of PD-1/PD-L1 axis (nivolumab, pembrolizumab or atezolizumab) represent a major advance in lung cancer treatment and have improved the overall survival of NSCLC patients. However, response rates for these treatments does not exceed 45% in first-line and 30% in second-line treatment [92], [210]–[212]. Moreover, resistance phenomena or hyper-progression under these treatments are increasingly described [213]. Identifying patients who could benefit from these therapies remains a challenge [145]. Immunohistochemistry tests on tumoral biopsy tissue, such as SP142 for atezolizumab (anti-PDL1) or 28-8 for nivolumab (anti-PD1), have been approved by health regulation authorities to determine PD-L1 expression prior to treatment to predict benefit for patients [214], [215]. However, some patients with low PD-L1 scores also show response under anti-PDL1 immunotherapy [146], [216]. Biopsy samples may present false negatives related to intra-tumoral heterogeneity of PD-L1 expression as well as heterogeneity between the primary and metastatic tumour sites [214], [217].

Positron Emission Tomography (PET) is a functional and non-invasive imaging modality based on the use of radiolabelled molecules (such as radiolabelled antibodies, metabolic tracers) targeting biomarkers. This imaging technique can be used to assess tumoral PD-L1 expression without being limited by the sampling issues involved in biopsy and help the clinician to decide whether a patient is eligible for anti-PD1 or anti-PDL1 treatment [218]–[220]. Immuno-¹⁸F-PET (using total or specific section of the radiolabelled antibody) could benefit from the specificity and selectivity of such molecules. The most common PET isotope in clinical diagnosis is the fluorine 18 [^{18}F] with a half-life of 109.7 minutes but it is not suitable for antibodies with long biological half-lives [221]. However, other more appropriate radioisotopes, such as zirconium-89 ($[^{89}\text{Zr}]$) with a physical half-life of 78.4 hours can be used [222]. $[^{89}\text{Zr}]$ decay proceeds via positron emission (23%, $E_{\beta\max} = 902 \text{ keV}$) and electron capture (77%). The two main γ radiation emissions are the 511 keV from positron annihilation and the 909 keV from the transition of ^{89}mY to ^{89}Y [223], [224].

The aim of the study was to evaluate the biodistribution of murine anti-PDL1 radiolabelled with $[^{89}\text{Zr}]$ in healthy and lung cancer grafted mice. The area under the concentration-time curve (AUC) was estimated using pharmacokinetic (PK) modelling in healthy mice organs.

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

Allometric scaling [225] was then used to estimate PK parameters in human (from the murine experimental data) and to calculate both human organ dose exposure and human effective dose.

2 Material and method:

All chemical compounds were purchased from Sigma-Aldrich (USA, Saint-Louis, Missouri) except where otherwise specified.

A) Radiosynthesis of $[^{89}\text{Zr}]DFO$ -anti-PDL1

The radiolabelling procedure was based on Vosjan et al [226]. 1) Chelation: between 5 and 5.5 mg of anti-PDL1 (Bio X Cell Cat# BE0101, RRID:AB_10949073, clone 10F.9G2, West Lebanon) in a 750 μL of phosphate-saline buffer (PSB) were mixed with 150 to 200 μL of 0.1 M sodium carbonate to buffer the solution at a pH between 8.5 and 9. A concentration of 40 nM of p-NCS-Bz-DFO (Macrocyclics, USA) diluted in DMSO were added to the antibody solution and incubated at 37°C for 30 to 45 min. The chelated antibodies were purified by elution with 5 mg/mL gentisic acid and 0.25 M sodium acetate solution on PD-10 size exclusion (GE healthcare, USA). 2) Radiolabelling: 200 μL of oxalic acid 1 M were added to 37 MBq of $[^{89}\text{Zr}]$ oxalate solution (20 μL) (Perkin-Elmer, USA), followed by 90 μL of sodium carbonate 2M solution. After waiting 3 min, 1 mL of 0.5 M HEPES followed by 710 μL of chelated antibody solution were added. After 90 min incubation at 37°C, the solution of p-NCS-Bz-DFO radiolabelled antibody was purified using the PD-10 column. Radiochemical purity was performed by radio-chromatogram (LabLogic, UK) using TLC (Thin-Layer Chromatography) strips (Biodes, USA) with citric acid at 20 mM and sodium carbonate at 0.1 M solution as mobile phase. Phosphate buffer with 150 mM NaCl with a 1 mL/min flow rate and size exclusion chromatography column were used for the analytical procedure (Bio-SEC A-300, Agilent, USA). For the *in vitro* stability assay, $[^{89}\text{Zr}]DFO$ -anti-PDL1 was incubated at 37°C in human plasma and at 4°C in PSB. Radio-HPLC was performed at 24h and 168h in the plasma and at 24h and 168h in the PSB to quantify the proportion of free $[^{89}\text{Zr}]$ and the $[^{89}\text{Zr}]DFO$ -anti-PDL1.

B) Cell culture

CMT167 (ECACC Cat# 10032302, RRID: CVCL_2405) cells were used to induce the lung cancer. CMT167 are highly metastatic murine lung cancer cells provided by Sigma-Aldrich and known to express PD-L1 protein on their surface [227]–[229]. The cells were maintained using culture Eagle's minimal essential medium (DMEM) and 10% Foetal bovine serum (FBS) in T75 flasks. They were incubated at 37°C and 5% CO₂. In the binding and immunoreactivity

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ⁸⁹Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

experiments, cells in the growth phase (confluence > 75%) were incubated in 6-well plates the day before the experiment.

C) Binding and immunoreactivity assay:

The binding and immunoreactivity experiments are based on the method of Lindmo *et al* [230]. For the *binding assay*, CMT167 cells $1.5 * 10^6$ per well in 2 mL of DMEM were rinsed twice with 1 mL 1% BSA/PBS before incubating with [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1. The concentrations used for total labelling ranged from 2.5 nM to 100 nM in 1% BSA/PBS solutions. For non-specific labelling an excess of 200-fold higher native antibody was added. After 2h incubation at 37°C and slight agitation, cells were rinsed 3 times with 1% BSA/PBS solution and then recovered with trypsin/EDTA (1 mL and 10 min incubation). To calculate the affinity constant (K_D), we used a nonlinear fitting curve on GraphPad with the module *One Site – specific binding*.

For the *immunoreactivity (IR) assay*, we used CMT 167 with a cell concentration ranging from $0.125 * 10^6$ cells to $1.5 * 10^6$ cells per well and antibody concentration of 2 nM for total binding. For non-specific *IR*, a 200-fold higher native antibody concentration was added. After 2h incubation at 37°C and slight agitation, cells were rinsed 3 times with 1% PBS/BSA solution and then recovered with trypsin/EDTA (1 mL and 10 min incubation time). Counting of trypsinized cells was performed using a gamma counter (Perkin Elmer, USA) for 15 min per tube.

D) Subjects/Experimental Animals

This study was conducted under acceptance of the protocol by the Ethics Committee (no. 22816-2019111216307851). Fourteen C57BL/6 mice (IMSR Cat# JAX:000664, RRID:IMSR_JAX:000664) aged 6 to 10 weeks and an average weight of 25 g were used. The tumour model was developed according to Li *et al* [228] by injecting intrapulmonary 10 000 to 15 000 CMT167 cells through the left thoracic cage under 3% isoflurane.

E) Immunohistochemical analysis of PD-L1

Ten days after lung cancer induction, mice were euthanised by cervical dislocation and lungs were harvested. Lungs (with tumour) were perfused with formaldehyde (37%) and embedded in paraffin. Specimens were sectioned at 5 µm and were dewaxed by heating for 10 min and using xylene. Sections were rehydrated using ethanol (100%). The sections were then incubated with a primary antibody, anti-PDL1 (PA5-20343, ThermoFisher) at 1:200 dilution (overnight) and revealed by DAB Kit (3,3'-Diaminobenzidine, VECTOR). Haematoxylin coloration was

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

added for nucleus coloration. Histological sections were scanned using Panoramic 250 slide scanner (3D HISTEC, Hungary).

F) Image acquisition

After one week of tumoral development, the mice were anaesthetised with isoflurane (4% for induction reduced to 2.5%) and intravenous (IV) injection (caudal or retro orbital) of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -anti-PDL1 was performed. For μTEP camera acquisition, the mice were kept under 2.5% isoflurane. The images were acquired using NanoScan PET/CT (MEDISO, Hungary). CT acquisitions were performed during 10 min (parameters: 35 kVp, 800 μA) followed by whole body static PET images (energy window: 400 ~ 600 KeV), during 30 min, in list mode and reconstructed using 3D mode (Tetra-Tomo3D Mediso) with 4 iterations and 6 subsets. The size of the images initially reconstructed (mm) was 406 * 406 * 377 (x,y,z). The voxel size (μm) was 251 * 251 * 251. Static PET imaging acquisition (30 min) of the mice were performed at several timepoints after injection of the $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -anti-PDL1 from day 1 to day 7. An attenuation correction, scatter correction, decay correction and random correction were used for PET acquisition. Four acquisitions were performed over 1 week at 24h, 48h, 72h and 168h after injection of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -anti-PDL1.

G) Ex vivo biodistribution study

Lung cancer grafted mice with blocking (n=2) received 500 μg cold dose of anti-PDL1 at the same time as tracer IV injection ($[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -anti-PDL1). Lung cancer tumoral non-blocking mice (n=4) and healthy non-blocking mice (n=7) received an IV injection of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -anti-PDL1 alone. Animals were euthanized by cervical dislocation at day 7 and organs as well as the tumour were harvested, weighed and counted in gamma counter (for 1 min) for $[^{89}\text{Zr}]$ activity (Hidex automatic gamma counter, LabLogic). These data were decay-corrected at the time of injection and background subtracted. The percentage of injected dose per gram (%ID/g) for each organ was computed by dividing these corrected data by the activity injected.

H) Image processing

Image processing was carried out with PMOD 3.9 software (LLC technology, Switzerland, RRID:SCR_016547). PET and CT DICOM were co-registered using the PFUSE module using rigid matching. Five organs of interest were identified (heart, lungs, kidneys, liver, bone) using five distinct volumes of interest (VOI) per organ of 1 mm³, non-overlapping and with a minimum distance of 1 mm between them (except for the bone where 3 VOI were considered). The remaining activity in the body was calculated by subtracting organ activity from the total

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an 89Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

body activity. This quantification method was inspired by Vicente et al [231]. The radioactive concentration in each organ was the average of the radioactive concentration in all the VOI (5 per organ, in MBq per cm³ given by PMOD 3.9). Henceforth we will refer to this method as the partial method.

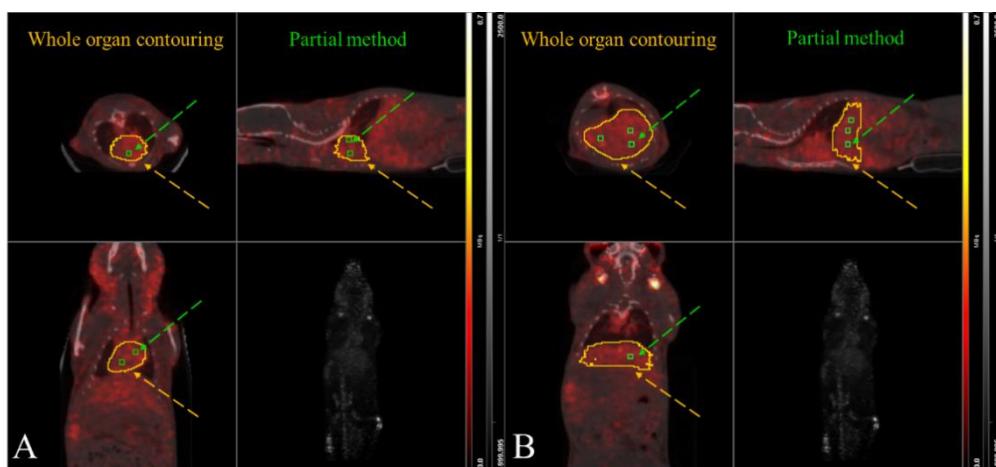
To validate the partial method, we compared it to the whole organ contouring method obtained with PET-CT images for the heart (n=6) and the liver (n=6). To assess the homogeneity of the organs, we extracted the average radioactive value per voxel and the coefficient of variation using “average statistic” in PMOD VOI statistic.

The bone VOI was drawn from femur epiphysis using 3 VOI. This region was chosen on purpose to overestimate the bone dosimetry. The tumour VOI was defined using the partial method. The number of VOI depends on tumour size (VOI between 1 and 3).

More details are given in the supplementary data: Figure S1 (PET method validation in healthy group), Figure S2 (Tumoral quantification using partial method), Table S5 (Detail of calculations for estimating the organ concentration) and Table S6 (final comparison and validation of the partial method).

PET method validation

5 VOI per organ were drawn according to the visual contouring under PET-CT image for the partial method (Figure S1). We compared this method to the whole organ contouring (Figure S1). To validate the method, we compared partial method concentration extracted from the liver and heart of healthy mice (n=3) to the whole organ contouring (Table 5S) at day 1. The difference between both methods were statistically not different ($P = 0.68$). Therefore, the partial method offers a suitable surrogate to quantify the concentration in the organs.



3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an 89Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

Figure S1: Organ segmentation and concentration extracted from the partial method. (A) heart concentration was estimated using whole organ contouring VOI (orange arrow) and partial method VOI (green arrow). (B) liver VOI representation.

Table 5S: Comparison between the partial method VOI versus the whole method organ contouring

Organ	Mice	Partial method					whole organ method	MEAN (CV%)	Full VOI
		VOI1	VOI2	VOI3	VOI4	VOI5			
Unit							MBq/mL		
Heart	ID 1	0.11	0.13	0.11	0.11	0.11	0.12 (±5.6)	0.092	
	ID 2	0.07	0.07	0.09	0.08	0.09	0.08 (±10)	0.090	
	ID 3	0.07	0.08	0.08	0.07	0.10	0.08 (±10)	0.091	
Liver	ID 1	0.079	0.101	0.116	0.111	0.108	0.10 (±10)	0.091	
	ID 2	0.104	0.085	0.097	0.078	0.083	0.089 (±9.9)	0.083	
	ID 3	0.108	0.086	0.095	0.097	0.108	0.099 (±7.4)	0.091	

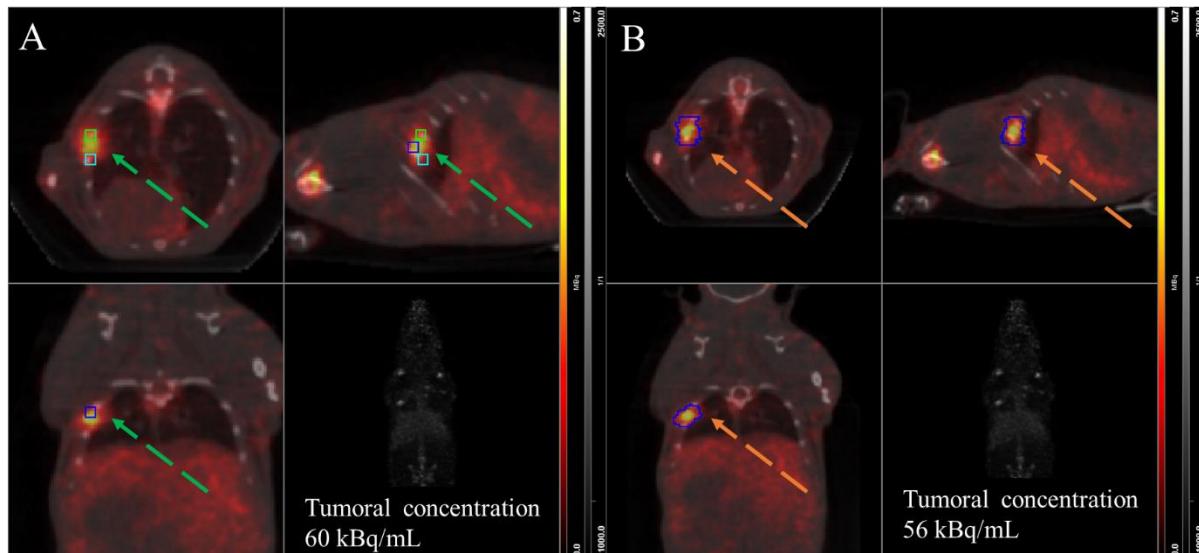
Table 5S provides an overview of the radioactive concentration calculation within the organ using the partial method and whole method contouring. CV: Coefficient of variation

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an 89Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

Table 6S: Concentration comparison between whole method contouring and partial method

Organ	Liver		Heart	
Method	Whole method contouring	Partial method	Whole method contouring	Partial method
Values (MBq/mL)	34.15	38.22	33.22	35.24
	30.21	34.27	32.86	32.56
	34.21	37.49	34.34	37.04
	30.79	32.44	30.13	31.18
	36.31	29.79	32.05	33.12
	30.59	32.62	24.32	22.54
P values (Wilcoxon-test)	0.48		0.86	

Table 6S compares extracted concentration from the partial method and the whole method contouring at day 1 and for 6 distinct mice. Non-parametric Wilcoxon-test was used to compare the average concentration extracted from both method and no statistical differences were found for the heart and the liver.



3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

Figure S2: Partial method and whole tumour contouring at day 2. (A) shows a PET-CT image of lung grafted mice. An average concentration of 60 kBq/mL ($\pm 4\%$) was estimated using partial method (green arrow). (B) whole tumoral contouring (orange arrow) with an estimated concentration of 56 kBq/mL.

I) Blood samples

In order to evaluate the pharmacokinetics of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$, blood samples of 50 μL from the cheek vein were taken at the following times after imaging : 1h , 3h, 24h, 48h, 72h and 168h. The samples were weighed and counted with a gamma counter (Hidex automatic gamma counter, LabLogic). Radioactive decay was automatically corrected by the software related to the injection time.

J) Pharmacokinetic analyses

Non-compartmental (NCA) and compartmental (CA) pharmacokinetic analyses were performed using Monolix/PKanalix software (Lixoft, France). For the NCA, the pharmacokinetic parameters were obtained using the log-linear trapezoidal method.

NCA pharmacokinetic analysis is a robust method for estimating the area under the concentration-time curve (AUC) using observed data. However, considering the lack of concentration data in order to estimate the terminal slope in some organs, the elimination phase may not be correctly described using this method. Therefore, we also used population pharmacokinetic (POPPK) modelling, which is a compartmental analysis (CA) method where the estimated values of AUC in each organ are based on population distributions and thus take into account inter-individual variability.

PK analyses were carried out for two purposes.

1) Blood

NCA was performed on blood samples in both healthy mice and mice with lung cancer to estimate and compare PK parameters.

For CA, 2-CMT models were tested with a first-order elimination (k) from the central compartment, a volume of distribution of the central compartment (V), a second compartment with intercompartmental clearance (Q), its own volume of distribution (V_2) and bolus administration to describe blood concentration of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$. Different error models

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

were tested: constant, proportional and combined. Model selection was based on goodness-of-fit plots, model stability and relative standard error (RSE%) of the estimated parameters.

2) Organs

We performed NCA to obtain the $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ in each organ and these values were compared in healthy and lung cancer grafted mice to assess biodistribution of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$. A 1-CMT (CA) model with a first-order absorption (k_a), a first-order elimination (k_e) and the volume of distribution (V) was used to describe the time-activity curve for each organ and to obtain an area under the curve (AUC) for both $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ and $\text{AUC}_{0 \text{ to } \infty}$. Before mouse to human extrapolation, the robustness of the 1-CMT organ model was tested by calculating the RMSE (root mean square error) between the CA $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ and the NCA $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$. From a pharmacokinetic perspective, the current model will capture the radioactive concentration within the organs and not the distribution of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$. (Examples of curve fitting and AUC estimation are shown in supplementary data Figure S4).

K) Dosimetry

Reference dosimetry is required for documenting the irradiation delivered by new radiopharmaceuticals before asking for institutional drug approval. According to the International Commission on Radiological Protection (ICRP) recommendations, pharmacokinetic parameters should be entered in anthropomorphic reference models. Reference models (e.g., ICRP 110 models in our study) provide a reference geometry, including a variety of organs with realistic shape, disposition, and composition. Sources (i.e., regions where activity can be measured, for example by quantitative imaging) are accounted for to provide the irradiation to all organs of the reference model. Results are therefore presented for all target organs/tissues that can be irradiated from the source organs/tissues where the radiopharmaceutical is uptaken [164].

$[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ concentrations in each organ were estimated with no decay-activity correction by the 1-CMT PK model for the $\text{AUC}_{0 \text{ to } \infty}$. We extrapolated the PK from mouse to human using the McParland equation [207]. Total activity in the rest of the body was calculated by removing the sum of MRT (mean residence time) in the five organs from the whole-body MRT in the mouse. Then the MRT in the mouse was extrapolated to obtain values in human.

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an 89Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

$$\tilde{A}_{organ,Human} = \left(\frac{m_{Animal}}{m_{Human}} \right)_{WB} \times \left(\frac{m_{Human}}{m_{Animal}} \right)_{Org} \times \tilde{A}_{Organ,Animal}$$

Where, WB is the whole body, Org is the organ, \tilde{A} is cumulated activity (kBq.h) and m is the mass in kg.

Thus, extrapolated human AUC _{0 to infinity} was used to estimate organ radiation exposure and effective dose using IDAC-Dose 2.1 software for adult male and according to ICRP 103 [170]. More details regarding calculations are provided as Supplementary data.

Table 1S: McParland allometric factor estimation

Organs	Mean organ human [male] weight (g)	Mean organ mice [male] weight (g)	Ratio [mice/human] Whole body (g/g)	Ratio [human/mice] organ (g/g)	Allometric scale factor
Heart	386	0.137	0.00035	2817	0.986
Bone (Endosteum)	580	0.096	0.00035	6041	2.114
Liver	2360	1.115	0.00035	2166	0.741
Kidney	422	0.334	0.00035	1263	0.442
Lung	1200	0.144	0.00035	8333	2.917
The rest of the body	65052	23.14	0.00035	2811	1.004

For an average male (70 kg) and average mice (25g)

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an 89Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

Table 2S: Human absorbed radiation estimation

Organs	Mean AUC infinite in mice (kBq.h/mL)	Organ weight (g)	Tissue density (g/mL)	Mean AUC infinite in mice (kBq.h/g)	Cumulated activity (kBq.h)	Mean residence time in mice (h)	Human Allometric scale factor	Human estimated activity (kBq.h)	Mean residence time in human (h)
Heart	1165.9	0.137	1.04	1121	153.8	0.21	0.986	160.3	0.204
Bone (Endosteum)	15510.3	0.096	1.4	11079	1068.9	1.44	2.114	526.5	3.046
Liver	2422.4	1.115	1.04	2329	2592.4	3.49	0.741	3678.3	2.588
Kidney	861.8	0.334	1.04	829	277.3	0.37	0.442	647.8	0.165
Lung	371.1	0.144	0.29	1254	181.9	0.26	2.917	65.9	0.715
The whole-body	1063	25	1	1063	26575	33	-	-	-
The rest of the body	-	-	1	-	-	27.23	1.004	-	27.28

Mean AUC_{infinite} in mice and organ weight are experimental data. The rest of the body MRT was calculated by subtracting the MRT in five organs from the whole-body MRT

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

Table 3S: Pharmacokinetic parameters of 1-CMT model in mice for AUC extrapolation to infinity

Organs	K _a (h ⁻¹)	RSE (%)	K _e (h ⁻¹)	RSE (%)	V (mL)	RSE (%)
Heart	0.028	6.4	0.157	14.9	2.2	18
Bone	0.0127	12.7	0.0188	4.6	1.84	8.3
Liver	0.0103	10.2	0.124	11.8	1.26	7.2
Kidney	0.0183	10.6	0.179	6.1	2.44	9.3
Lung	0.0228	14.2	0.155	7.7	6.91	7

L) Statistics

For comparisons of quantitative variable distributions, non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests were used (5% significance level) with R version 3.6.1 (RRID:SCR_000432). Figures were generated using GraphPad Prism version 8.3 (RRID:SCR_002798), Monolix version 2020 (Simulations Plus, RRID:SCR_003946) and PMOD 3.9.

3 Results:

A. Radiolabelling, binding and immunoreactivity:

Radiolabelling yield (n=7) was $46\% \pm 13\%$ for all radiolabelling assays. The best radilabelled [^{89}Zr]DFO-anti-PDL1 solutions were selected for *in vitro* and *in vivo* studies (n=3). In this subset, we obtained a RCP greater than 95% (radiochemical purity), a molar activity of 2.2 GBq/ μmol (± 0.15 GBq/ μmol), a volumetric activity of 6.6 MBq/mL (± 0.86 MBq/mL) and a concentration of 0.45 mg/mL (± 0.06 mg/mL). *In vitro* tests were performed on CMT167 cells expressing PD-L1 protein. An affinity constant (K_d) of 5.6 nM ($R^2=0.99$) and an immunoreactivity of 96% ($R^2=0.99$) were found (Figure 1). PSB *in vitro* stability assay revealed that the [^{89}Zr]DFO-anti-PDL1 was stable up to 168h with a radiochemical purity superior to

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

95%. RCP in plasma *in vitro* stability assay was superior to 95% at 24h and decreased to 75% at 168h.

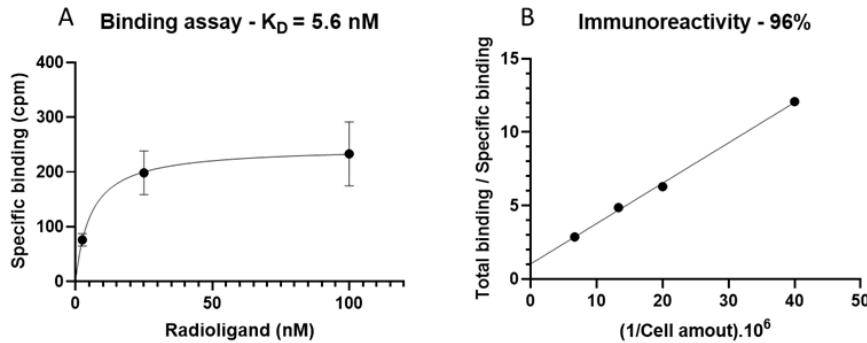


Figure 1: Binding and immunoreactivity assays. A) Binding assay was performed by subtracting Total binding and non-specific binding by using constant cell concentration and increasing $[^{89}\text{Zr}]DFO\text{-anti-PDL1}$ concentration, $K_D = 5.6 \text{ nM}$. Error bars represent standard errors. B) Immunoreactivity was performed using an increasing cell concentration and constant $[^{89}\text{Zr}]DFO\text{-anti-PDL1}$ concentration (2nM). Y intercept indicates the immunoreactive fraction, 96%.

B. Validation of PET method

On 6 healthy mice, the liver and the heart were used to validate the PET quantification using partial contouring method and whole-body contouring method. We found that the concentration in the organ was homogenous and comparable to the whole organ contouring method with no significant differences between both methods ($P=0.48$ for the liver and $P=0.86$ for the heart, Wilcoxon test). We found a coefficient of variation (CV) of 22% whereas the partial method gave a CV of 20%, suggesting that there the variation of the radioactivity in the organs is similar whichever contouring method is used.

C. Pharmacokinetic analyses of $[^{89}\text{Zr}]DFO\text{-anti-PDL1}$

In this study, average radiolabelled antibody dose injected per mouse was about 1.9 mg/kg and NCA analysis was used to compare the biodistribution of $[^{89}\text{Zr}]DFO\text{-anti-PDL1}$ in blood and organs in both healthy and lung cancer grafted mice.

1) Histological examination of PD-L1

PD-L1 expression was assessed by immunohistochemistry on histological slides as can be seen in Figures 4.A and 4.B. In Figure 4.A, we can distinguish the intensity of the PD-L1 expression

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

between the healthy lung (blue arrow) and in the tumoral cells (black arrows). The tumoral cells are discriminated by cell density. PD-L1 expression is well defined on the cell contours as shown in Figure 4.B. These results demonstrate that 10 days after tumoral induction, CMT167 cells express PD-L1.

2) *In vivo* PET-CT Biodistribution in healthy mice:

Seven mice with an average weight of $25\text{ g} \pm 0.7\text{ g}$ were IV injected with $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-Anti-PDL1 ($742\text{ kBq} \pm 38\text{ kBq}$). Longitudinal follow-up was performed over 1 week, and 5 organs were studied: kidneys, lungs, heart, liver, and bones (Figure 2.A).

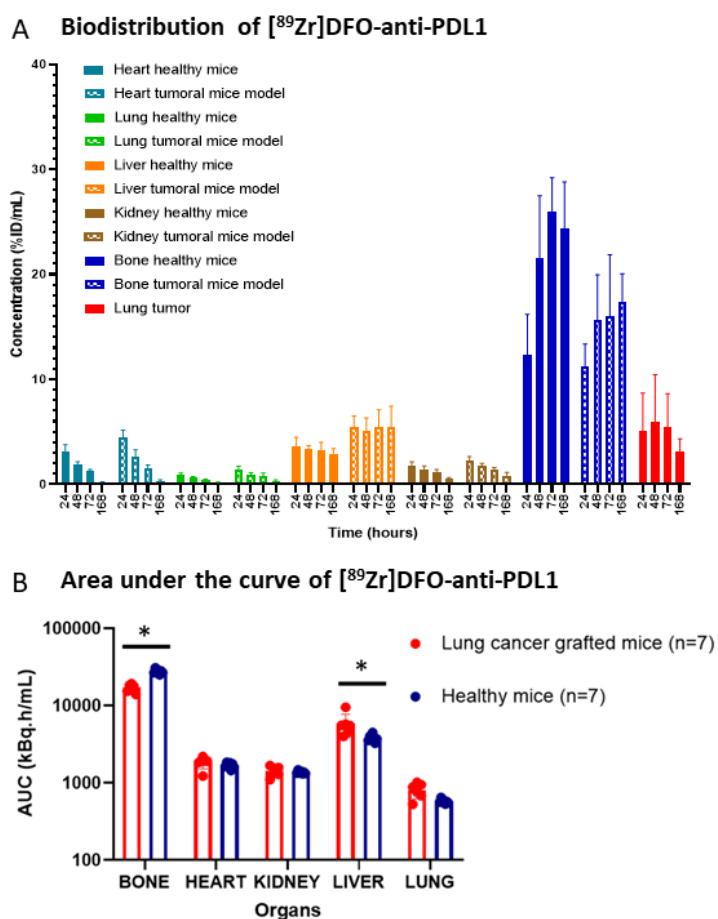


Figure 2: Biodistribution and area under the concentration curve of $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 in healthy and lung cancer grafted mice. A) Biodistribution of $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 in both healthy and lung cancer grafted mice. B) Area under the concentration curve up to 168h after injection (AUC₀ to 168h) for each organ in healthy and lung cancer grafted mice. Wilcoxon-Mann-Whitney test (*: p < 0.05)

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

Antibody uptake was lowest in the lungs ($\text{AUC}_{0 \text{ to } 168}$: $531 \text{ kBq.h/mL} \pm 28 \text{ kBq.h/mL}$) followed by kidneys ($\text{AUC}_{0 \text{ to } 168}$: $1,312 \text{ kBq.h/mL} \pm 100 \text{ kBq.h/mL}$), heart ($\text{AUC}_{0 \text{ to } 168}$: $1,528 \text{ kBq.h/mL} \pm 131 \text{ kBq.h/mL}$) and liver ($\text{AUC}_{0 \text{ to } 168}$: $3,714 \text{ kBq.h/mL} \pm 390 \text{ kBq.h/mL}$). The highest $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168}$ ($26,251 \text{ kBq.h/mL} \pm 2,501 \text{ kBq.h/mL}$) was found in the bone (located in the femoral epiphysis) (Figure 2.B).

3) *In vivo* PET-CT Biodistribution in lung cancer grafted mice:

Seven mice transplanted with tumour cells in the lung (left) were IV injected with $[^{89}\text{Zr}]DFO$ -anti-PDL1 ($690 \text{ kBq} \pm 33 \text{ kBq}$). As can be seen in the histological images (Figures 4.A & B), PD-L1 is expressed in the tumoral cells.

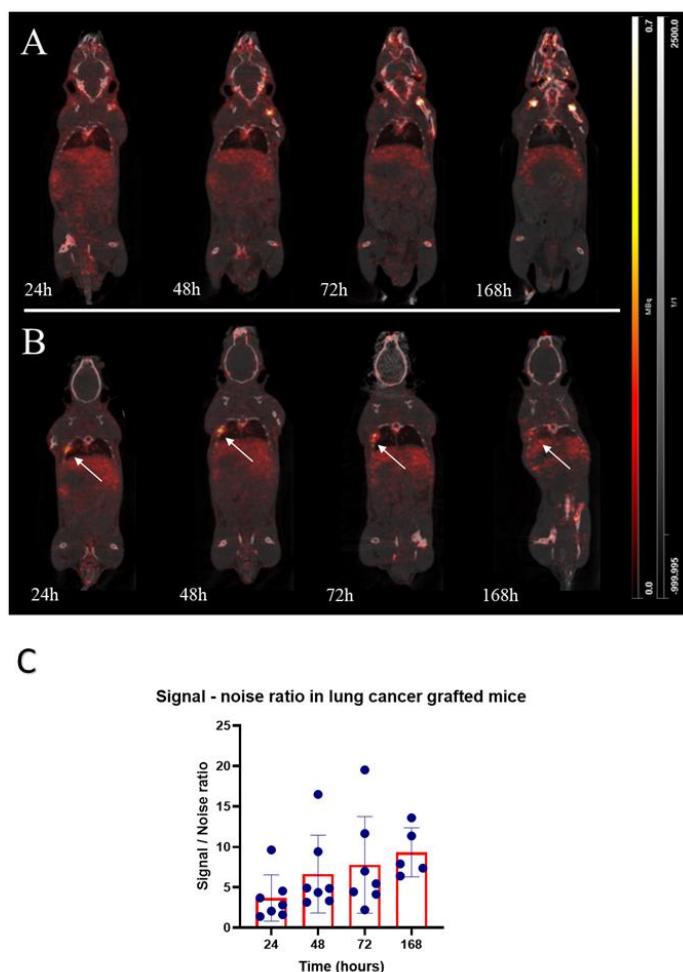


Figure 3: Preclinical imaging of $[^{89}\text{Zr}]DFO$ -anti-PDL1 in healthy and lung cancer grafted mice. A) Healthy mice after IV injection of $[^{89}\text{Zr}]DFO$ -anti-PDL1 at four times : 24h, 48h, 72h and 168h. B) Lung cancer grafted mice after IV injection of $[^{89}\text{Zr}]DFO$ -anti-PDL1 at four times : 24h, 48h, 72h and 168h. C) Signal to nose ratio (SNR, tumour concentration / lung concentration). Kruskal-Wallis test (*: $p < 0.05$).

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

The same time-activity curve profile was found in the five organs of interest for the grafted mice group compared to the healthy group. There were no significant differences in the AUC_{0 to 168} of organs such as the heart ($P=0.22$), lungs excluding the tumour injection site ($P=0.06$) and kidneys ($P=0.68$). However, bone AUC_{0 to 168} was greater in healthy mice (26,250 kBq.h/mL) than in transplanted mice (15,250 kBq.h/mL) ($P=0.03$), whereas liver AUC was higher in transplanted mice ($P=0.03$) (Figure 2.B). The tumour signal was visible after 24h in all transplanted mice (Figure 3.B). The best signal to noise ratio (SNR, tumour to healthy lung within the same mice) was at 168h (9.3 ± 3.0 , coefficient of variation (CV) was 36%) (Figure 3.C) however there was no significant difference ($P=0.98$) between this value and SNR at 48h (6.6 ± 4.8 , CV was 72%). The maximum tumour tracer concentration was found at 48 hours after [^{89}Zr]DFO-anti-PDL1 injection (41 kBq/mL ± 29 kBq/mL).

1) *Ex vivo* biodistribution and blocking study

Ex vivo studies were performed on 3 groups injected with [^{89}Zr]DFO-anti-PDL1. Figure 4.C shows the concentration of the [^{89}Zr]DFO-anti-PDL1 in the liver, the femoral bone and the lung tumour. When co-injected with 500 μg excess of anti-PDL1, tumoral concentration showed an almost 2-fold decrease (from 6.12%ID/g to 3.75%ID/g). However, liver concentration increased 3-fold in comparison to the non-blocking study (healthy or tumoral mice group) and bone concentration decreased from 11%ID/g to 8.5ID/g (in tumoral group without blocking and blocking study respectively)

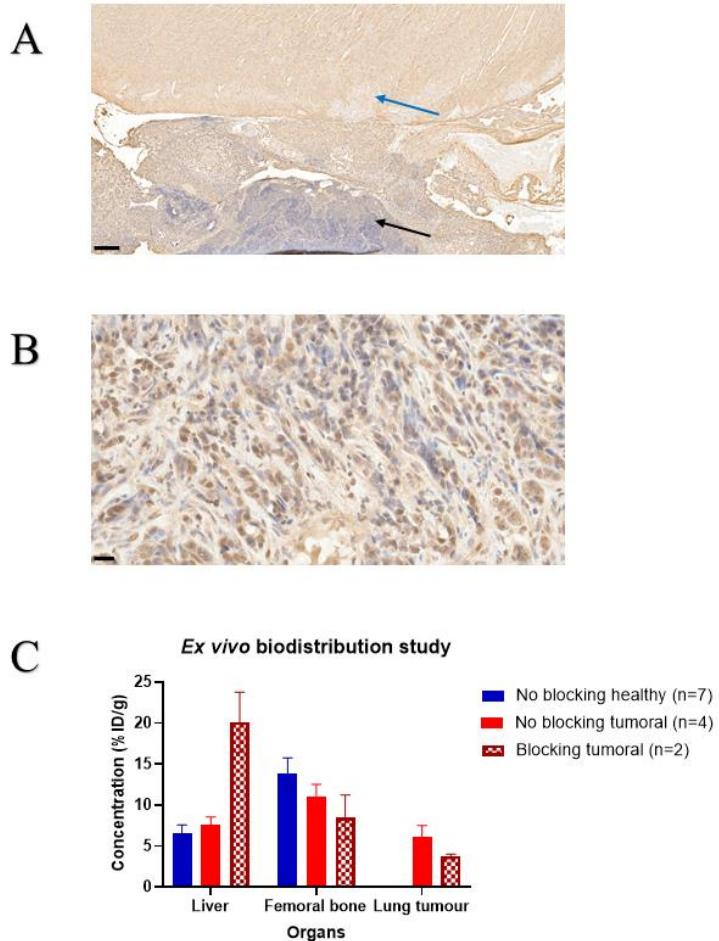


Figure 4: Histological expression of PD-L1 and Ex vivo biodistribution study. A) Histological slide (X5) of a lung cancer grafted mice 10 day after tumour induction. Blue arrows indicate the healthy lung tissue, black arrows indicate the tumoral tissue, black bar indicate the scale bar (200 μm). B) On the same histological slide (X40), expression of PD-L1 in revealed by DAB around tumoral cells, black bar indicate the scale bar (20 μm). C) Ex vivo biodistribution study in 3 groups: blocking tumoral group (co-injection of 500 μg of anti-PDL1), non-blocking healthy and tumoral group.

2) PK analysis of $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 in blood

a. Non Compartmental Analysis (NCA)

There was no difference in the injected activity between the tumoral group and the healthy group. Mean PK parameters were also similar, with no significant difference between groups for AUC, clearance, volume of distribution, and the MRT (Table 1). However, the biological half-life was significantly different in healthy and grafted mice, with $28.7\text{h} \pm 1$ and $38.5\text{h} \pm 10$ ($P=0.03$), respectively. Also, PK parameters in the tumoral group were more variable than in the healthy group (Table 1). The blood curve profile (Figure 5) is similar for both groups with

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

a rapid distribution phase from the first hours and a slower elimination phase reflecting a bi-compartmental model. There was also greater variability in the concentration profiles of the lung cancer grafted mice compared to the healthy mice.

Table 1: Blood PK parameters of healthy and lung cancer grafted mice (NCA) estimated with the trapezoidal method.

PK parameters	Healthy mice (n=7) (CV%)	Lung cancer grafted mice (n=7) (CV%)	P-Values (Wilcoxon)
Activity (kBq)	742.3 (5.1%)	689.9 (4.7%)	0.07
AUC (kBq.h/mL)	6935.9 (4.8%)	6551.4 (13.2%)	0.71
Cl (mL/h)	0.11 (6.5%)	0.10 (20.9%)	0.09
Biological T_{1/2} (h)	28.7 (4.0%)	38.5 (26.6%)	0.03
MRT (h)	36.7 (2.8%)	37.9 (10.0%)	0.46
Vd (mL)	4.4 (5.6%)	5.6 (31.1%)	0.71

AUC: Area under curve, Cl: Clearance, T_{1/2}: half-life time, MRT: Mean residence time, Vd: volume of distribution, CV(%): Coefficient of variation

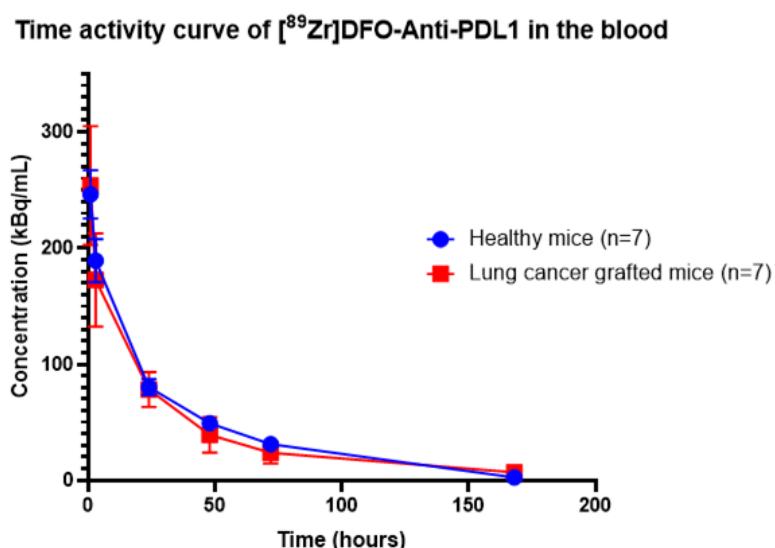


Figure 5: Time activity curve of $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 in both healthy mice and lung cancer grafted mice. Concentration values are decay corrected.

b. Compartmental Analysis (CA)

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an 89Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

The parameters of the 2-CMT model describe a bolus administration, first-order elimination (Cl), central compartment volume (V1) of distribution, peripheral compartment volume (V2) of distribution and inter-compartmental clearance (Q). The parameters of the model are given in supplementary data.

Table 4S: Blood PK parameters of healthy mice (CA) estimated from the 2-CMT model.

Parameter	Value	Units	R.S.E (%)	Shrinkage (%)
Clearance	0.1	mL/h	3.2	3.8
IIV of Clearance	7.4	CV%	32.4	-
Volume of central compartment (V1)	2.6	mL	3.3	2.8
IIV of V1	8.3	CV%	29.1	-
Inter-compartment clearance (Q)	0.3	mL/h	12.1	7.6
IIV of Q	30	CV%	29.8	-
Volume of peripheral compartment (V2)	2.3	mL	6.4	8.9
IIV of V2	12	CV%	50.6	-
Error model a	2.8	kBq/mL	18.7	-
AUC model-based	6795	kBq.h/mL	-	-
IIV of AUC model based	5.7	CV%	-	-

IIV: Inter-individual variability, error model a: constant model error, RSE: relative standard error

The 2-CMT model with constant error described the experimental well data according to the Visual Predictive Check (VPC) (Figure 6) and individual concentration prediction. Parameters are estimated with good precision according to RSE and low parameter shrinkage (<10%). We compared the model-estimated AUC to the NCA-calculated AUC and found no significant differences ($p=0.53$). Goodness-of-fit plots and VPC show a satisfactory fit of the model to the data. In addition, the error model does not show misspecifications according to the 90% prediction interval (Figure 6).

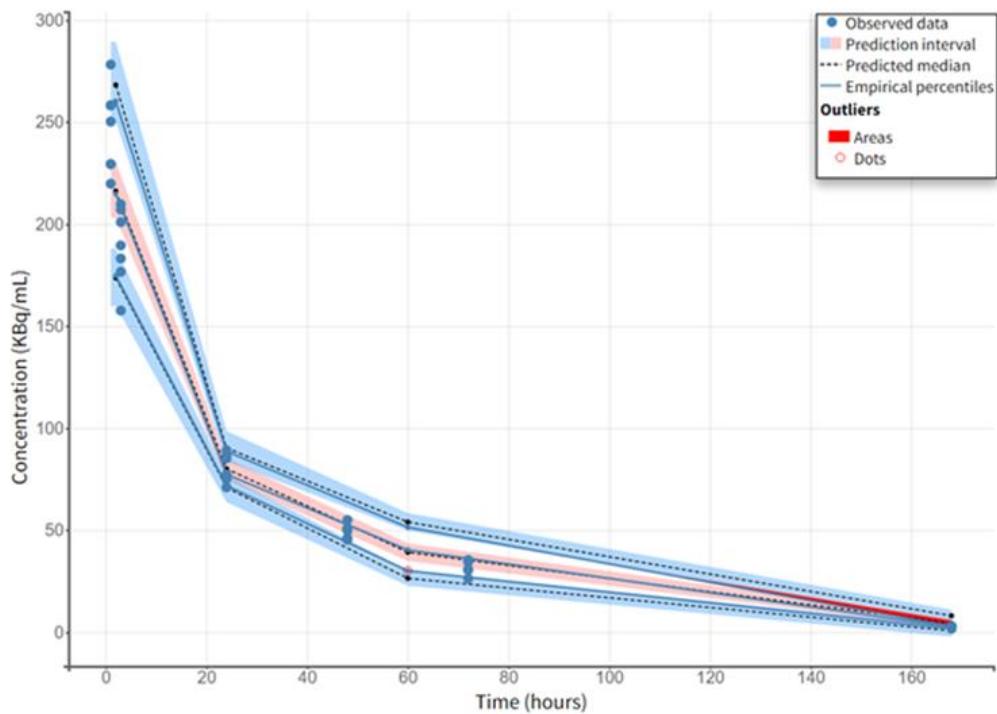


Figure 6: Visual predictive check of 2-CMT model of experimental blood data in healthy mice.

3) Healthy mice organ dosimetry of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ and extrapolated effective dose

We used a 1-CMT CA model with an uptake constant (k_a), a first-order elimination constant (k_e) and a volume of distribution (V) to describe the distribution kinetics of the tracer at the organ level in mice and compared it with NCA $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ estimation to validate its use for dosimetry calculation. The PK parameters were estimated with good precision ($\text{R.S.E} < 20\%$) and are given in supplementary data. The 1-CMT CA model was validated by calculating the RMSE (root mean square error) between the CA $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ estimate and the NCA $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ estimate (Table 2). The 1-CMT CA model correctly estimates $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ and will therefore be used to estimate $\text{AUC}_{0 \text{ to } \infty}$.

Table 2: Comparison between NCA and CA mean AUC estimations

Organs	NCA $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ (kBq.h/mL)	CA $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ (kBq.h/mL)	RMSE (%)
Heart	984	1160	15
Lung	321	365	12
Kidney	756	837	11
Liver	1899	2026	8
Bone	12353	12619	6

AUC: Area under curve, relative RMSE: root mean square error relative to the model (NCA) estimation

Human dosimetry was estimated by total organ exposure to infinity ($\text{AUC}_{0 \text{ to } \infty}$) using PK modelling (supplementary data). Estimated absorbed organ dose was performed using IDAC-Dose 2.1 in normal tissues, based on the mice $\text{AUC}_{0 \text{ to } \infty}$ of $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 (Table 3). The highest radiation exposure was found in the liver and in the gallbladder. According to ICRP 103, effective dose was 131 $\mu\text{Sv}/\text{MBq}$ ($\pm 2.76\%$).

Table 3: Human extrapolated dosimetry with $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 (IDAC-Dose) based on 7 healthy mice

Organs [mGy/MBq]	Adult Male	CV%
Adrenals	1.57E-01	4.81
Brain	8.99E-02	1.50
Breast	8.56E-02	1.76
Colon wall	1.02E-01	0.67
Endosteum (bone surface)	1.11E-01	0.73
ET region	8.18E-02	0.78
Eye lenses	6.24E-02	0.94
Gallbladder wall	2.07E-01	9.92

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

Heart wall	1.48E-01	5.61
Kidneys	1.44E-01	4.60
Liver	2.39E-01	12.3
Lung	1.51E-01	6.87
Lymphatic nodes	1.10E-01	0.69
Muscle	9.39E-02	1.56
Oesophagus	1.31E-01	3.25
Oral mucosa	9.38E-02	1.14
Pancreas	1.50E-01	4.87
Prostate	1.14E-01	2.75
Red (active) bone marrow	1.32E-01	0.92
Salivary glands	8.65E-02	1.26
Skin	6.55E-02	1.73
Small intestine wall	1.03E-01	1.22
Spleen	1.07E-01	0.73
Stomach wall	1.18E-01	3.84
Testes	8.77E-02	3.87
Thymus	1.11E-01	1.64
Thyroid	1.00E-01	0.71
Urinary bladder wall	1.05E-01	2.64
Effective dose 103 [mSv/MBq]	1.31E-01	2.76

Sv: Sievert, Bq: Becquerel, Gy: Gray, CV%: Coefficient of variation

4 Discussion:

The aim of our study was to evaluate the biodistribution of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -anti-PDL1 in healthy and lung cancer grafted immunocompetent mice and estimate human dosimetry by extrapolating the PK parameters in organs from mouse to human.

a) *In vitro* validation

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ in an orthotopic lung cancer murine model

An *in vitro* step was crucial to assess potential damage of the antibodies after the radiolabelling. An immunoreactivity of 96% was found indicating that the antibodies were not damaged by our radiolabelling process. Kikuchi *et al* [232] radiolabelled the same clone (10F.9G2) with $[^{89}\text{Zr}]$ in different conditions (*p*-NCS-DFO ratio of 5:1 and 4°C incubation versus a *p*-NCS-DFO ratio of 3:1 and 37°C incubation in our study) and found IRs between 55% to 70%. A second experiment was carried out to estimate the affinity of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ to its target ($\text{Kd}=5.6\text{ nM}$). The affinity was in line with the binding constants found for antibodies in the nanomolar range [233].

We were not able to find other studies to which our results regarding the affinity binding (clone 10F.9G2) could be compared. When tested in PSB, the $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ had an RCP greater than 95% at day 7 whereas RCP was only 75% in the plasma. So we can consider that plasma has an influence on the stability of the radiolabelled antibody. Even though this *in vitro* study in plasma is not strictly representative of the *in vivo* behaviour of the radiolabelled antibody because of the remaining blood activity in mice at day 7, we tried to find an alternative method to investigate possible enzymatic plasma degradation and the influence of the physicochemical plasma condition. Indeed, at day 7, the remaining blood activity in mice was about 2.3kBq/mL which is too low to be detected by gamma detector paired with HPLC and therefore too low to perform an *in vivo* stability study.

Concerning the degradation mechanism, Vugts *et al* (38) assessed the stability of different $[^{89}\text{Zr}]$ chelators in the plasma. Changing the chelator DFO (used in our study) by DFO* resulted in a radiochemical purity greater than 95% in the plasma (and RCP of 75% while using DFO). Furthermore, when Vugts *et al* tested the stability of the DFO with the NaCl 0.9%, they found an RCP of 50.4% at day 7. Based on these results, we suspect that $[^{89}\text{Zr}]$ is released from the chelator due to the physicochemical condition and not because of enzymatic metabolism.

b) Biodistribution of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ in healthy mice

The concentrations of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ found in the lung presented the lowest $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ (321 kBq.h/mL) reflecting a weak background noise on PET imaging. Organs such as the heart, the kidneys and the liver had between 4 to 10-fold higher $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ explained by their richer vascularisation.

High liver concentration over time could describe a non-specific clearance [179], [205], [234]. Non-specific clearance occurs through proteolytic degradation and pinocytosis leading to the

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an $[^{89}\text{Zr}]$ labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

degradation of the antibody into amino acids or peptides [235]. These peptides could contain $[^{89}\text{Zr}]$ and accumulate within the liver.

Renal elimination through glomerular filtration (cut-off 30 to 50 kDa) is insignificant due to high molecular weight (MW_{IgG} 150 kDa). Kidney signal is likely to correspond to free $[^{89}\text{Zr}]$ and/or $[^{89}\text{Zr}]DFO$ since antibodies are neither filtered nor secreted at the nephron level [236], [237]. One major limitation of our study is the absence of radiometabolism analysis in the blood and the organs. However, there are studies that explore the behaviour of $[^{89}\text{Zr}]$ labelled antibodies and their radiometabolites. Abou *et al* [238] investigated biodistribution of $[^{89}\text{Zr}]DFO$ and $[^{89}\text{Zr}]$ Phosphate in healthy mice. They noticed that $[^{89}\text{Zr}]DFO$ was totally cleared from the body after one day but $[^{89}\text{Zr}]$ Phosphate exhibited similar kidney and liver concentration levels as those found in our healthy mice. Therefore, the remaining concentration found in the liver and the kidneys is likely to be a product of the metabolism of the radiolabelled antibodies such as $[^{89}\text{Zr}]$ Phosphate. Holland et al [239] also investigated the biodistribution of the $[^{89}\text{Zr}]DFO$ in mice and revealed that after 1 min, the $[^{89}\text{Zr}]DFO$ was mainly located in the kidney and after 4 min, the $[^{89}\text{Zr}]DFO$ was majorly located in the bladder confirming the high renal clearance of the $[^{89}\text{Zr}]DFO$.

One of the major issues using the $[^{89}\text{Zr}]$ radiolabelled antibodies is the release of free $[^{89}\text{Zr}]$. The free $[^{89}\text{Zr}]$ will accumulate in bones (e.g epiphysis). The structure of DFO provides 6 coordination sites while 8 sites are required to form a stable complex, this can result in the release of $[^{89}\text{Zr}]$, which may subsequently accumulate in mineral bone [238]–[242]. In our study, the region of interest of the bones is positioned at the level of the femoral epiphysis. This organ had the highest $AUC_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ (on average, ten-fold higher than in the heart or kidney). At this age (6 to 8 weeks in our experiment) mice are still growing. As explained by Fergusson et al [243], the percentage of mineralization increases at the femoral epiphysis location, participating in bone remodelling and bone growth in mice, which explains the affinity of free $[^{89}\text{Zr}]$ for the bone.

In comparison, the remaining bone activity at 168h was around 24% of injected activity per gram (%ID/g) whereas Dan Li et al [244] found around 10%ID/g in the bone (mice aged 4 to 5 weeks). As our mice are immunocompetent, they could have a higher non-specific clearance resulting in more proteolytic activity of the antibody, which in turn could lead to more radiolabelled metabolite and higher bone uptake [179], [205], [234].

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

At day 7, the remaining blood activity was about 0.31%ID/mL corresponding to 2.3 kBq/mL. The gamma detector paired with the HPLC was not sensitive enough to quantify this radioactive concentration in the blood.

c) Biodistribution of $[^{89}\text{Zr}]DFO$ -anti-PDL1 in lung cancer grafted mice

The distribution of the tracer in transplanted mice followed the same progression as in healthy mice with respect to the following organs: bones, heart, liver, kidneys and lungs. The tumour uptake was visible 24 h after the injection and the maximum average concentration of $[^{89}\text{Zr}]DFO$ -anti-PDL1 was reached after 48 h. We were able to successfully target the tumour within 24h after injection and demonstrated that $[^{89}\text{Zr}]DFO$ -anti-PDL1 can be used for the non-invasive imaging of the CMT167 lung cancer tumour in a syngeneic mice model.

As demonstrated in the blocking study, adding 500 µg of cold anti-PDL1 halved the tumoral signal due to a competitive interaction between cold anti-PDL1 and radiolabelled anti-PDL1 on the tumoral cells. Other elements in our study support specific binding of anti-PDL1. For example, in the PK analysis, the half-life of $[^{89}\text{Zr}]DFO$ -anti-PDL1 was significantly higher in the LCG mice (38.5 h) compared to the healthy group (28 h) which seems to indicate that the difference could be due to the targeting of the tumour. These two results support the hypothesis that specific binding does occur. *In vitro* and *in vivo* results by Li et al [228] also showed that after 1 week of tumoral development PD-L1 is expressed in the same murine lung.

In the blocking study, liver concentration increases 3-fold in comparison to the non-blocking study. PD-L1 is ubiquitously expressed in the body (e.g spleen, liver or the bone marrow) [245]. With more than 500 µg ($> 20 \text{ mg/kg}$), specific sites could be saturated by the excess cold in favor of non-specific clearance conducted by the liver [246].

In contrast, femoral bone showed a lower uptake in the blocking group and could probably indicate PD-L1 expression at femoral level. As described by Li et al [228], bone marrow derived macrophage tend to express PD-L1 in the case of CMT167 lung cancer induced mice. In another study published by Wang et al [247], authors assessed the sensitivity of the PD-1 treatment (nivolumab) on CMT167 induced cancer (bone cancer associated) and PD-L1 was expressed at baseline (exosome serum). These findings suggest that a portion of bone uptake is related to the possible bone PD-L1 expression.

According to radioactive signal and SNR, the best imaging time is 48h after injection. No significant differences in tumoral uptake were found between 24h and 168h indicating that the

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ in an orthotopic lung cancer murine model

tumoral signal could be due to the specific targeting of the $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ and its internalization. Depending on the antibody internalization, $[^{89}\text{Zr}]$ remains trapped inside the cell after antibody internalization and degradation leading to an accumulation over time of the signal in the tumour or targeted cell [158], [220]. In 2020, Kurino et al [248], performed the biodistribution of the 10F.9G2, which is the same clone as in our study. They investigated the biodistribution and the radiometabolism of the antibody using Iodine-125 (covalent binding) and Indium-111 (radiolabelling by chelation as it is for $[^{89}\text{Zr}]$). They found a high rate of degradation linked to the expression of PD-L1 in organs such as spleen, liver and tumour. For Iodine-125, the radioisotope leaves the cell after antibody internalization and degradation whereas for Indium-111, the radioisotope stays in the cell after antibody internalization and degradation. Despite the clear limitation in the comparison (tumoral model, the dose and the radiolabelling method), Kurino et al, supported the underlying PK and metabolism of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$.

Other interactions such as enhanced permeability and retention effect (EPR) is known to drag macromolecules in the tumoral compartment which could lead to the retention of the tumoral signal and participate to the nonspecific signal [249], [250].

d) Pharmacokinetics and dosimetry of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$

PET imaging offers the possibility to assess the distribution of the studied molecule in various organs. Compared to standard preclinical experiments, access to imaging reduces the number of mice necessary and enables longitudinal data to be collected. The blood time-activity curves of the tracer in healthy and lung cancer grafted mice were similar. They describe a rapid distribution of the tracer followed by significant elimination. However, we found greater variability in the PK parameters within the tumoral group (Table 1). This variability could be due to the induced tumour and may affect the overall tumoral kinetics of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$. Depending on the expression of PD-L1, size of the tumour and injection site, $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ uptake could vary between subjects and may impact the volume of distribution.

The final blood pharmacokinetic model in healthy mice is a 2-CMT model and it concurs with other PK models for antibodies [176]. But, with few individuals ($n=7$), it is difficult to correctly estimate all parameters (such as IIV). In our case very low variability was visible in the dataset facilitating the overall estimation of the parameters.

We also used a 1-CMT model to calculate the AUC in the organs for dosimetry assessment. We were able to estimate with good precision the PK parameters (RSE < 20%) and RMSE was

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model

below 20% for $\text{AUC}_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ estimation. Therefore, we used this 1-CMT model to estimate AUC_{∞} to calculate organ AUC in mice and extrapolate the PK in human. Allometric scale factors between human and mice are not constant between organs according to McParland equation. For instance, kidney and liver have 2.3 and 1.4 respectively compared to bone and lung with 0.5 and 0.4 respectively. Therefore, this could explain the low radiation exposure in some organs (e.g., bone) even though their estimated AUC is high (supplementary data).

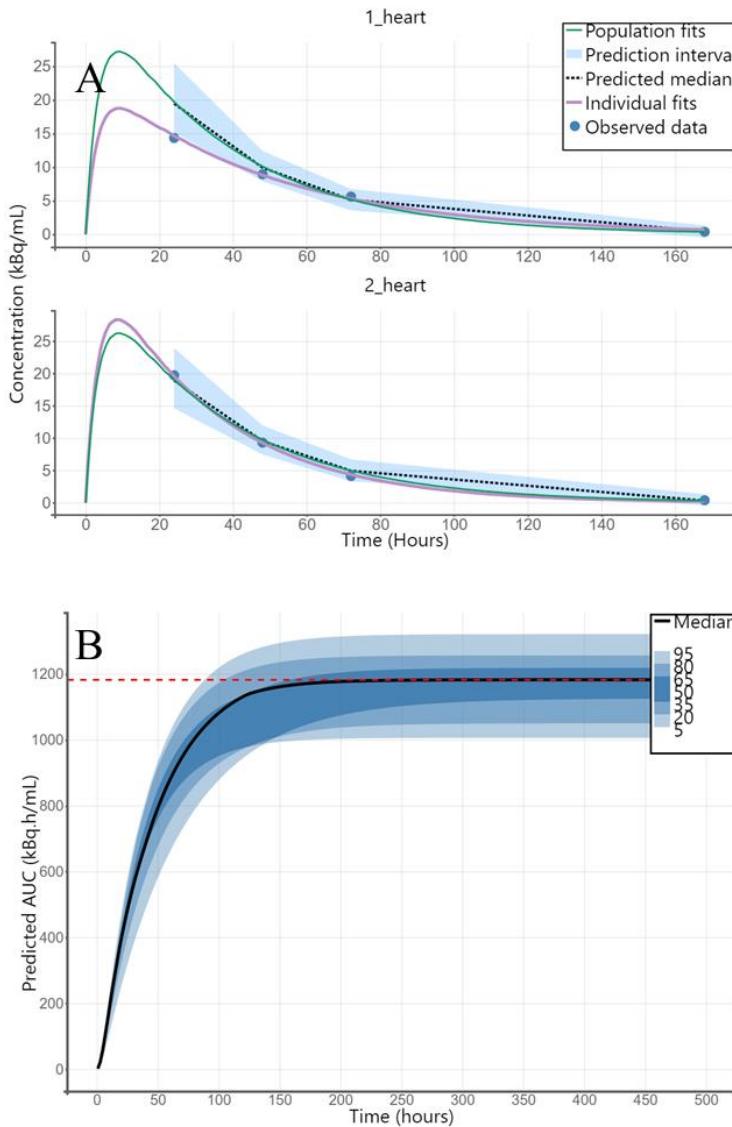


Figure S4: POP_PK curve fitting using 1-CMT model for dosimetry and AUC estimation. (A) the experimental data (blue dots) are correctly captured by the PK model (purple line). (B) the AUC is estimated using the PK parameters of the corresponding model. Black line represents the median whereas the blue areas represent the percentiles of the simulated data.

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -panitumumab in an orthotopic lung cancer murine model

Despite some limitations (differences between species in biotransformation, non-linear pharmacokinetic or alteration of physiological pathways) allometric scaling has been shown to be a reliable method to predict the main PK parameters (such as the clearance or the volume of distribution) in the human based on animal data [225]. In some cases, the dosimetry predicted from mice can be overestimated such as in the study by Bhattacharyaa et al [251], where an effective dose of $578 \mu\text{Sv}/\text{MBq}$ was found for the $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -panitumumab but was lower ($264 \mu\text{Sv}/\text{MBq}$) in the clinical investigation published by Lindenberg et al [252].

The extrapolated effective dose was $131 \mu\text{Sv}/\text{MBq}$. In comparison, $[^{18}\text{F}]$ FDG has an effective dose around $20 \mu\text{Sv}/\text{MBq}$ [253]. Despite this difference, effective dose was lower than expected in view of the gamma energy of $[^{89}\text{Zr}]$ ($E=910 \text{ keV}$) and existing literature. Indeed, Jagoda et al [233] performed a dosimetry evaluation in human from experimental mice biodistribution using avelumab (anti-PDL1) and found an effective dose of $363 \mu\text{Sv}/\text{MBq}$. The difference between our results and theirs could be explained by the respective *in vivo* models and specific activities. We used a fully immunocompetent lung cancer grafted model whereas Jagoda et al [233] used athymic mice (subcutaneous breast cancer model). Also, with a lower specific activity in our case, we have a competition between non-radiolabelled and radiolabelled antibodies leading to a faster elimination of our $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -anti-PDL1.

5 Conclusion

In this study, we were able to successfully radiolabel an anti-PDL1 with $[^{89}\text{Zr}]$ with no damage according to the immunoreactivity. The pharmacokinetics and biodistribution were explored in both healthy mice and lung cancer grafted immunocompetent mice. The best time for tumour imaging was 48h. Human radiation exposure was estimated using pharmacokinetic modelling with a human effective dose of $131 \mu\text{Sv}/\text{MBq}$. Radiolabelled antibodies could improve personalized medicine for PD-1/PD-L1 treatment by targeting tumoral PD-L1 expression. Data shared here could help further research to support the clinical development of this diagnostic biomarker.

6 Data Availability Statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to Anis Krache: anis.krache@inserm.fr

7 Ethics statement

All applicable international guidelines for the care and use of animals were followed. This study was conducted under acceptance of the protocol by the French Ethics Committee (no. 22816-2019111216307851).

8 Author contributions

A-SS, CF and MWK designed the project. AK, CF and A-SS contributed to the labelling process. CP contributed to the imaging acquisition. MB contributed to dosimetry calculation. AK was responsible for data analysis, imaging analysis and data interpretation. AK wrote the manuscript and CF, A-SS, MWK, EC and PP revised the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

9 Funding

This study was funded by the European Regional Development Fund (grant n°16015075/MP0014063) and Occitania Region ("Mutualised Platform" grant n°16015090) PIR² and Labex IRON (11-LABX-0018).

10 Conflict of interest

Employment: Charlotte Fontan and Yann Bouvet are employees of General Electric- Zionexa laboratory. All the rest of the author declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

11 Acknowledgement

We thank the CREFRE-Oncopole experimental zootechny and Non-Invasive Exploration teams -US006/CREFRE Inserm/UPS/ ENVT Anexplo platform, Toulouse for animal housing and technical assistance, Experimental Histopathology Facility of the INSERM/UPS US006/CREFRE Anexplo, Toulouse for technical assistance, the Culture Collections' catalogue (reference number 10032302-1VL) for providing the cells and IMAVITA (France) for their technical advice.

Supplementary material

Mice dosimetry estimation and human absorbed radiation estimation

3. Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model



Figure S3: Tumoral biodistribution of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-Anti-PDL1}$ 2 days after I.V caudal injection (0.7 MBq). Maximal Intensity projection (MIP) static PET image was generated using Mixing fusion mode.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

Travaux encore en cours, premier draft de l'article

Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model: Can we estimate the best imaging time?

Anis Krache^{1,2,3*}, Charlotte Fontan³, Yann Bouvet³, Pierre Payoux^{2,4}, Etienne Chatelut¹, Anne-Sophie Salabert^{2,4†}, Melanie White-Koning^{1†}.

¹CRCT, UMR 1037, Université de Toulouse, Inserm, UPS, France

²ToNIC, Toulouse NeuroImaging Center, UMR 1214, Université de Toulouse, Inserm, UPS, France

³General-Electric - Zionexa, Targeting imaging and therapy, France

⁴Centre hospitalo-universitaire de Toulouse, France

***Correspondence:**

Corresponding Author

melanie.white-koning@univ-tlse3.fr

[†]These authors have contributed equally to this work and share senior authorship.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

Keywords: Pharmacokinetic modelling, Preclinical, Anti-PDL1, Zirconium-89.

Abstract

Molecular imaging based on PET-CT with radiotracers such as [¹⁸F]FDG now plays a key role in the management of patients with cancer. For several types of tumours, the radiolabelling of PD-L1 antibody with zirconium-89 for immuno-PET imaging offers a suitable surrogate for PD-L1 expression visualisation and quantification across the body. However, the best imaging time after tracer injection must be defined based on the signal-to-noise ratio (SNR) and radioisotope period. **Method:** Murine anti-PDL1 was radiolabelled with zirconium-89. A total of 24 lung cancer grafted (LCG) mice and 7 healthy mice were injected with the [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1. Six blood samples and 4 PET-CT images were acquired over 1 week from each mouse. A 2-compartment (CMT) population pharmacokinetic (POP_PK) model and a 4-CMT model were applied to describe blood and organ distribution respectively. SNR was estimated using tumoral and lung concentration prediction from the 4-CMT model. **Results:** *In vivo* biodistribution of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 differed significantly ($P \leq 0.01$ for heart, bone, lung, liver and kidneys) between LCG and healthy mice. The 2-CMT model correctly described the blood distribution with a linear elimination. Half-life and volume of distribution were significantly greater in LCG in comparison to healthy mice ($P=0.001$ and $P<0.001$ respectively). The 4-CMT model estimated the main PK parameters within the tumour lung and lung. Tumoral NCA $AUC_{0 \rightarrow 168h}$ was correlated with tumour size ($P=0.028$) in LCG mice. Predicted SNR revealed an optimal imaging time around 125h after tracer injection. **Conclusion:** POP_PK modelling could provide a novel approach to estimate the best imaging time after tracer injection.

1. Introduction

With the recent understanding of the underlying pathway of the interaction between tumour cells and immune system, new therapies have emerged. After activation of the immune system, co-inhibitory molecules such as programmed death-1/programmed death ligand-1 (PD-1/PD-L1) named checkpoint inhibitors (CI) are naturally expressed to prevent the immune system runaway. However, cancer cells can overexpress these CI to stop or limit the immune system response against the tumour. During tumorigenesis, PD-1 signalling, driven primarily by adaptive expression of PD-L1 within the tumour, inactivates infiltrated T cells that recognize tumour-specific antigens, allowing tumour progression [2]. The blockage of PD-1/PD-L1

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

interaction with therapeutic antibodies resulted in the restoration of the immune system response.

Immune checkpoint inhibitors (ICI) are currently used as treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC), which represent 85% of lung cancer types [79]. Pembrolizumab (anti-PD1) was approved for patients with high PD-L1 expression (>50%) as first line of treatment in metastatic NSCLC. KEYNOTE-001 and KEYNOTE-010 clinical trials assessing pembrolizumab efficacy in NSCLC further validated this and showed an association between response to PD-1 blockade and PD-L1 expression, as patients with PD-L1 expression superior to 50% by immunohistochemistry (IHC) had a higher clinical benefit of anti-PD1 therapy relative compared to patients with lower PD-L1 expression [254]. The correlation of a higher PD-L1 expression to clinical response resulted in the approval of pembrolizumab for the treatment of first-line NSCLC in patients whose tumours expressed ≥50% PD-L1 by IHC [255]. To assess PD-L1 expression, SP142 or 22C3 PD-L1 immunohistochemical assays are performed before anti-PD1 or PD-L1 administration. Nevertheless, some patients with no PD-L1 expression still tend to respond to immune checkpoint blockers [146], [216]. Conversely, some patients with high PD-L1 expression demonstrated a lack of clinical benefits using anti PD-1/PD-L1 therapy [256]. These results suggest a possible limitation from the IHC assay to accurately estimate the PD-L1 expression levels in patients. The tests themselves are subjected to misspecification outcome and 37% of PD-L1 scoring could differ depending on the assay (22C3, 28-8, SP263 or SP142) [257]. PD-L1 expression is heterogeneous from site to site, resulting in different PD-L1 expression results obtained by IHC depending on the tissue biopsy sites. Lastly, changes over time in PD-L1 expression are known to be induced by treatments such as chemotherapy or radiotherapy. There is an increasing need to develop a new tool able to give a whole-body mapping of PD-L1 expression. Molecular imaging techniques such as immuno-positron emission tomography (immuno-PET) may provide a non-invasive tool to estimate whole-body PD-L1 expression. Based on the use of a highly specific antibody chelated with a radionuclide (such as zirconium-89), immune-PET can combine the specificity of the vector and the sensitivity of the technique allowing the assessment of antigen expression on tumoral tissues across the body [258]. Immuno-PET allows quantification and visualization of tracer uptake in the targeted organ or tumour after fixation and internalization of the radiolabelled antibody. This technique could predict efficacy of immunotherapy treatment by molecular imaging to personalize the patient treatment according to PD-L1 expression [259]. Zirconium-89 ($[^{89}\text{Zr}]$) is a suitable radioisotope for immune-PET imaging with a physical half-

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

life of 74.8h which is ideal for antibody biodistribution and compatible with the biological half-life [223]. Many chelators are currently available to radiolabel with zirconium-89 such as HOPO, DFO* but the most commonly used is DFO[260], [261].

Pharmacokinetic (PK) data are generally derived from blood samples after a period of time. From these data, PK parameters such as the clearance, the volume of distribution or the area under the curve can be estimated [262]. In imaging studies, standard uptake value (SUV) from the region of interest (ROI) are often used to study drug distribution. The use of PK modelling can enhance the global analysis by providing an estimation of transfer rates from different compartments, which can be used to understand the interaction between the organs and the systemic distribution. Moreover, PK modelling is able to quantify intra and inter-individual variability [263].

The aim of our work is to develop a pharmacokinetic model to describe blood, lung and tumoral distribution of the $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 in lung cancer grafted mice. Using this semi-mechanistic model, we aim to estimate the best signal to noise ratio, to study the effect of tumoral size on the tumoral constant rate transfer and to simulate tracer PK after a 2nd injection and its impact on the SNR.

2. Material and methods:

All chemical compounds were purchased from Sigma-Aldrich (USA, Saint-Louis, Missouri) except where otherwise specified.

A) Radiosynthesis of $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-Anti-PDL1

The radiolabelling procedure was based on Vosjan et al [226] and previously described in Krache et al. Briefly it is based on the incubation of the antibody with p-NCS-Bz-DFO (Marcocyclics, USA) a pH 8.5. After 30 min, the modified antibody is incubated with the zirconium-89 oxalate (PerkinElmer, Netherlands) at pH 7 during 1h30 at 37°C. Finally, the $[^{89}\text{Zr}]$ DFO-anti-PDL1 is purified using PD-10 (GE healthcare, USA) with gentesic acid.

B) Subjects/Experimental Animals

This study was conducted under acceptance of the protocol by the Ethics Committee (no. 22816-2019111216307851). Thirty-one C57BL/6 mice (6 to 10 weeks and an average weight of 25 g) were used (7 healthy mice and 24 LCG mice). The tumour model was developed according to Li et al [228] by injecting intrapulmonary 10 000 to 15 000 CMT 167 cells through

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

the left thoracic cage under 3% isoflurane in 24 mice. In the manuscript, lung grafted mice will be referred to as LCG mice (Figure 1.A).

C) Image acquisition

After one week of tumoral development, the mice were anaesthetised with isoflurane (4% for induction reduced to 2.5%) and injected intravenously (IV) with [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 (Figure 1.A). The images were acquired using NanoScan PET/CT (MEDISO, Hungary). CT acquisitions were performed during 10 min (parameters: 35 kVp, 800 μA) followed by whole-body static PET images (energy window: 400 ~ 600 KeV), during 30 min, in list mode and reconstructed using 3D mode (Tetra-Tomo3D Mediso). Static PET imaging acquisition (30 min) of the mice were performed at several timepoints after injection of the [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 at 24h, 48h, 72h and 168h. An attenuation correction, scatter correction, decay correction and random correction were used for PET acquisition.

D) Image processing

Image processing was carried out with PMOD 3.9 software (LLC technology, Switzerland). PET and CT DICOM were co-registered using the PFUSE module using rigid matching. Two organs of interest were identified (lung and tumour) using five distinct volume of interest (VOI) per organ of 1 mm³, non-overlapping and with a minimum distance of 1 mm between them for the lung and 3 VOI for the tumour. This method was previously validated and presented in Krache et al.

E) Blood samples

To evaluate blood pharmacokinetics of [⁸⁹Zr]DFO-Anti-PDL1, blood samples of 50μL were harvested from the cheek vein at the following times after injection : 1h , 3h, 24h, 48h, 72h, 144h and 168h. The samples were weighed and counted with a gamma counter (Hidex automatic gamma counter, LabLogic) and radioactive decay was corrected by the software.

F) Pharmacokinetic analyses

Non-compartmental (NCA) and compartmental (CA) pharmacokinetic analyses were performed using Monolix/PKanalix/Simulix software (Lixoft, France). The evaluation of the pharmacokinetic parameters by NCA was carried out using the log-linear trapezoidal method. Blood PK analysis will be performed on all 31 mice (7 healthy mice and 24 LCG mice). For

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

tumour and lung PK analysis, only 23 LCG mice were used because 1 mouse presented a total lung tumour invasion, making it impossible to select region of interest in the lung.

1. Non compartmental analysis

a. Blood:

NCA was performed on blood samples in both healthy and LCG mice to estimate and compare PK parameters. Estimated PK values from this NCA will be used as initial parameters for the CA modelling.

b. Organs

As a first analysis, NCA in organs was performed to estimate PK parameters which will be used as initial values for the CA modelling. The second objective was to obtain the $AUC_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ in the lung, the tumour, and the blood. These values were compared to the corresponding $AUC_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ values obtained with the CA using normalized root mean square error (NRMSE) to assess model robustness.

2. Compartmental analysis

The CA modelling aimed to describe the biodistribution of the [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 in the blood, the lung and the tumour. Each organ had its own observations, structural model, error model (constant, proportional or combined) and covariate model. Model selection was based on goodness-of-fit plots, model stability, relative standard error (RSE%) of the estimated parameters and Bayesian information criterion corrected (BICc).

a. Blood

In order to describe the concentration of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 in the blood, a 2-Compartment (CMT) models was tested with a central compartment with a volume of distribution of the central compartment (V) and first-order elimination (k_e), a second compartment with intercompartmental clearance (Q), its own volume of distribution (V_2) and bolus administration. Weight and specific activity were tested as covariates on healthy and LCG group whereas tumoral size was tested only on the LCG group.

b. Organ

For the tumour, CA was based on testing different models such as a target mediated drug-disposition model (inspired from Lindauer et al [264]) or a 1-CMT and/or 2-CMT model with an extravascular administration. After structural model testing, different error models were tested and compared as specified above. [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 lung distribution was

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

represented by a 2-CMT model with extravascular administration. Specific activity, tumour size and body weight were tested as covariates on all parameters. However, specific activity was missing for a subgroup of LCG mice ($n=4$). Hence, specific activity was tested apart on another dataset.

c. Multicompartmental model

A multicompartmental model (multi-CMT) was developed in the current study for two purposes: 1) to estimate the constant transfer rates between the blood compartment and the organs of interest, 2) to estimate the best imaging time based on the signal to noise ratio (SNR). The multi-CMT model is based on a “mammillary” model (Figure 1.B) with a central compartment where $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -anti-PDL1 is IV injected, eliminated and distributed to the other compartments (Tumour and lung). Initial parameters values for the multi-CMT model were generated from individual organ parameters as described above.

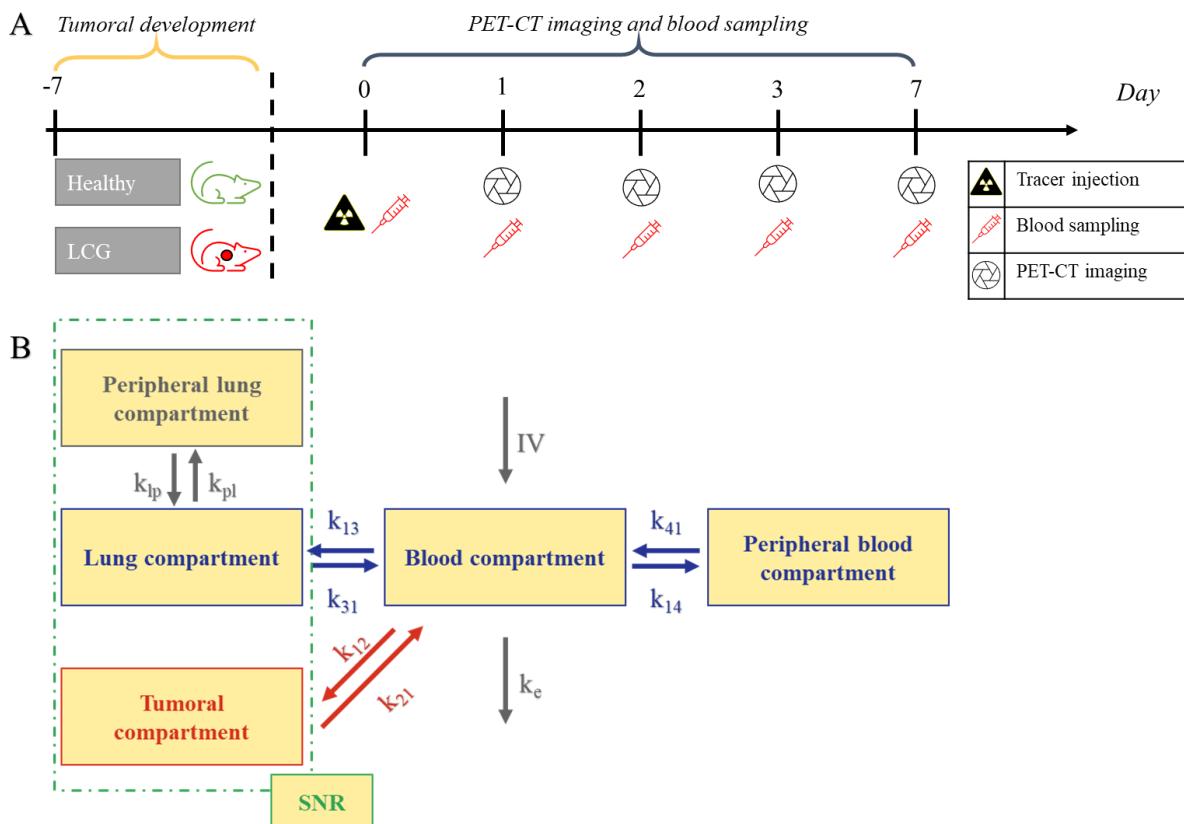


Figure 1: In vivo protocol and the multicompartmental model describing the biodistribution of the $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -anti-PDL1 in the LCG mice. (A) represents the in vivo protocol used in the current study for the healthy and LCG group mice. (B) represents the multi-CMT model where blood compartment receives an IV radioactive dose that distributes to physiological

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

compartments and tumoral compartment. Constant rate transfer such as k_e , k_{14} , k_{41} , k_{lp} and k_{pl} are fixed in the final model. SNR is calculated by dividing the predicted concentration in the tumour by the predicted concentration in the lung.

3. Statistics

For comparisons of means of quantitative variables, Student's t-test were used when distributions were Gaussian. Otherwise, distributions were compared using non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests (5% significance level) with R version 3.6.1. Figures were generated using GraphPad Prism version 8.3, Monolix version 2020, PMOD 3.9 and RStudio (ggplot package).

3. Results

1) Preclinical study: Injected dose and specific activities

In the current study, 24 lung cancer grafted mice (LCG) were used for preclinical imaging and PK exploration and 7 healthy mice as controls. The mean radioactive dose of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 received was respectively 737.2 kBq and 742.3 kBq in the LCG and in the healthy group ([697.9 ; 776.5] and [708.7 ; 775.9]). Hence there was no significant difference in radioactive dose received between healthy and LCG groups. LCG group received 4 different batches of [⁸⁹Zr]DFO-Anti-PDL1 with different specific activities (SA) ranging from 13.7 to 23.8 MBq/mg in comparison with the healthy group with a SA of 13.9 MBq/mg. Due to an analytical error (HPLC), the 4th batch SA was not correctly estimated (3 mice in the LCG group). Hence, only LCG group batch 1 to 3 will be compared.

2) Biodistribution of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 in healthy and LCG mice

The data shown in Figure 2 represent the concentration within the organs, with figure 2.B comparing this concentration between groups with similar SA. The highest area under the concentration curve (AUC) was located in the bone region of interest, with notable differences in the concentration levels between the healthy mice and the grafted mice (Figure 2.C). Interestingly, the other organs under study show a higher AUC in the LCG compared to the healthy mice. The tumoral AUC shows large variability (Coefficient of variation: 51%) and reaches the C_{max} at 48h.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

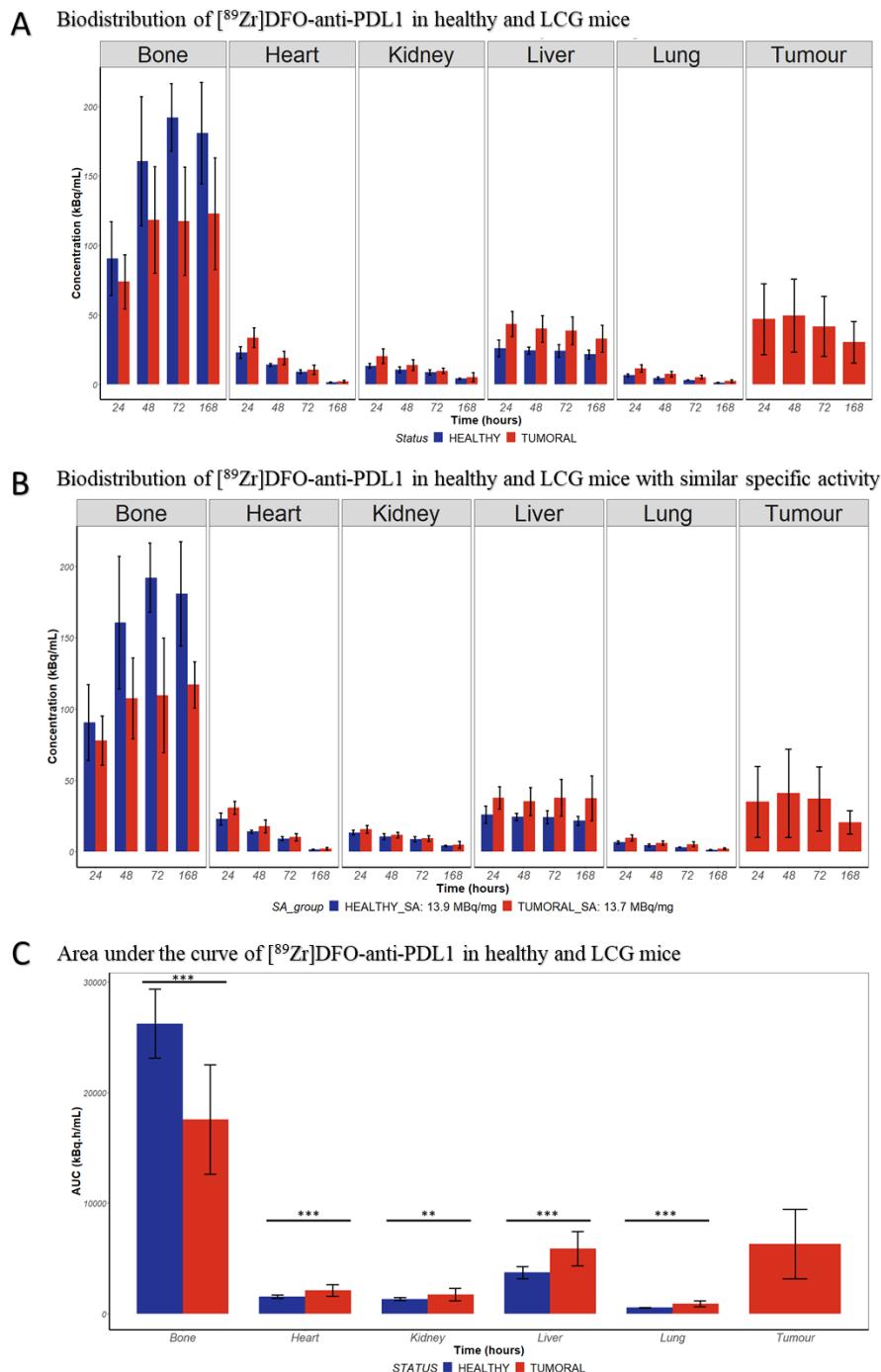


Figure 2: Biodistribution of the [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 in healthy and LCG group. (A) represents the biodistribution of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 with data pooled irrespective of the specific activity ($n=19$). (B) represents the biodistribution of the [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 in healthy ($n=7$) and LCG ($n=7$) group with similar specific activity. (C) represents the Area under the curve (AUC) 0 to 168h of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 in 5 organs of interest ($n=19$). Blue bars represent the healthy group whereas red bars represent the LCG group. Error bars are standard deviation. (**): $p<0.01$, (***): $p < 0.005$, t-test.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

Organ exposure was assessed by calculating the $AUC_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ using NCA method. The highest exposure was found in the bone, followed by the liver, the heart, the kidney, and the lung. All organ exposures presented statistically significant differences. LCG lung ($890 \text{ kBq.h/mL} \pm 267$) was statistically different ($P=0.0015$) in comparison to the healthy group ($531 \text{ kBq.h/mL} \pm 32$). Tumoral exposition to [^{89}Zr]DFO-anti-PDL1 was 2nd in terms of $AUC_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ after the bone.

3) Non-compartmental pharmacokinetic of [^{89}Zr]DFO-anti-PDL1

In the current study, some mice died during the experiment and only the 144h imaging time was performed. Of the total of 24 mice, only 19 reached the 168h imaging time and comparison of $AUC_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ values will be performed only on this subgroup of mice.

a) In the blood

The blood distribution of [^{89}Zr]DFO-anti-PDL1 is shown in Figure 3. The plot in each group seems to describe a 2-CMT profile with a rapid distribution phase and an elimination phase. As can be seen in Figure 3.B, which shows the time activity curves according to specific activity, the blood radioactive curve does not seem to be affected by the radiosynthesis parameter. All the kinetic profiles seem similar. However, in the LCG group, the later observation points present a higher variability in comparison to the healthy group (Figure 3.A). Interestingly, the 144h timepoint in the LCG group seems to concur with a change in the elimination phase that could reflect a faster elimination.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

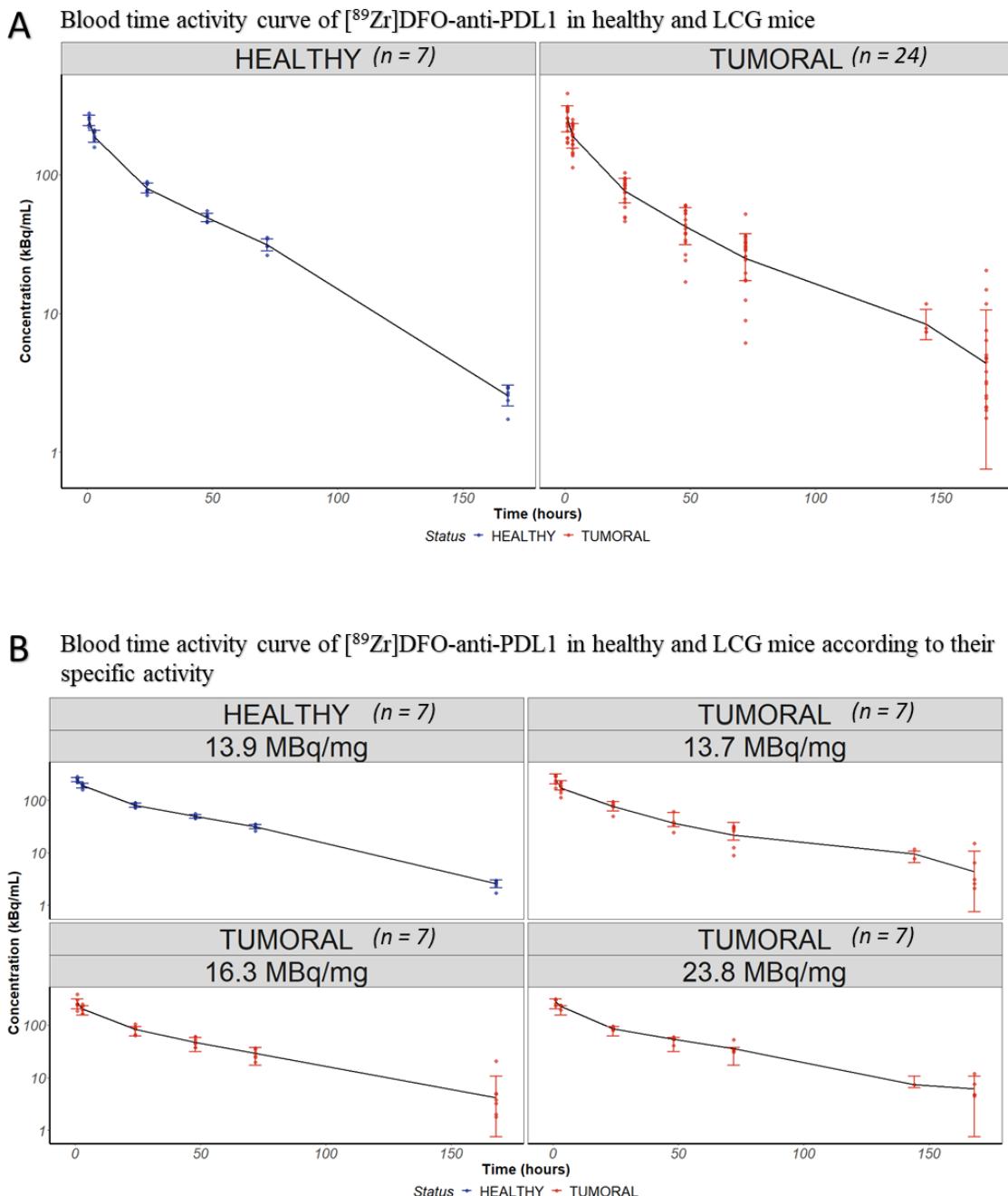


Figure 3: Blood time activity curve (TAC) of $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO-anti-PDL1}$ in healthy and LCG group. (A) represents blood TAC in the pooled data set. (B) represent blood TAC in healthy and LCG group according to their specific activity. Blue dots represent the healthy group whereas red dots represent the LCG group. Error bars are standard deviation.

The pharmacokinetic parameters from the NCA are summarized in Table 1. Except for the biological half-life ($P=0.001$) and volume of distribution ($P<0.001$), PK parameter estimates were similar in both groups. When comparing groups with the same SA, only the biological half-life was statistically different ($P=0.03$, data not shown here).

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

Table 1: Non compartmental analysis of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 in the blood.

PK parameters	Healthy mice (n=7)	LCG mice (n=19)	p-values
	(CV%)	(CV%)	
AUC _{0 to 168h} (kBq.h/mL)	6935.9 (6%)	6949.7 (22.9%)	^a 0.97
Clearance (mL/h)	0.1 (8.5%)	0.1 (21.6%)	^b 0.37
T _{1/2} (h)	28.7 (5%)	37.8 (31.3%)	^b 0.001
MRT (h)	36.7 (3.8%)	37.8 (13%)	^a 0.98
VD (mL)	4.4 (7.5%)	5.6 (25.2%)	< ^b 0.001
Radioactive dose (kBq)	742.3 (6.1%)	737.2 (13.3%)	^a 0.98

^(a)T-test, ^(b)Wilcoxon-test, CV: Coefficient of variation

b) In the organs

AUC_{0 to 168h} was calculated using the NCA log-linear method. In the LCG group, AUC_{0 to 168h} presented more variability than the healthy group and except for bone AUC_{0 to 168h}, all organs AUC_{0 to 168h} were higher in the LCG group. Tumoral AUC_{0 to 168h} was statistically correlated to tumour size extracted from CT images (P=0.028, Pearson correlation coefficient, supplementary data).

4) Compartmental pharmacokinetic of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1

PK modelling were performed to describe the distribution within the blood compartment, the lung, and the tumour. Multicompartmental modelling was performed using the transfer constants found in the individual compartmental models of the blood, the lung, and the tumour compartment as initial values in the single global model.

a) In the blood

Several models were compared for the PK modelling in the blood. A 2-CMT model with a linear elimination with a combined error model correctly captured the data. Since different radioactive doses were used, a non-linear elimination (Michaelis-Menten) plus a linear elimination were used to describe the data but this did not improve the objective function value (OFV).

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

Different covariate models were tested to investigate the influence of the status (tumoral or healthy), tumour size and specific activity (SA) on the PK parameters. First, the SA covariate (excluding the 4th subgroup of LCG mice) was investigated on the clearance (CL) and the volume of distribution (VD), but this did not significantly decrease the OFV. According to the NCA results, the VD presented some differences between the two groups, but the status (tumoral or healthy) did not significantly decrease the OF. The CT images allowed us to measure the tumour size (in mm³) in the LCG mice and investigate the impact on blood PK parameters. However, no correlation was found between the tumour size and the PK parameters such as the CL or the VD.

b) In the organs

The tumoral model:

The 1-CMT model with a proportional error correctly captured the tumoral data despite the large variability found in the data (Supplementary data). Other models were tested such as a 2-CMT model, a 1-CMT model with internalization or a model based on Lindauer et al [264]. Tumour size was tested as a covariate on the k_a (absorption constant). Although this did not significantly decrease the objective function, the standard deviation of random effect of the k_a parameter went from 41% to 28% when the tumoral size was added. Hence, tumour size was added as a covariate in the final model.

The lung model:

A 2-CMT model with a linear absorption and elimination captured the data well. A 1-CMT model was also investigated but failed to correctly predict the elimination phase in the lung.

Robustness of PK models:

To assess the robustness of organ PK model, normalized root mean square error (NRMSE) was used to compare between $AUC_{0 \text{ to } 168\text{h}}$ calculated from NCA and CA in the lung and the tumour. We found an NRMSE of 11.8% and 11.5% for lung and tumour respectively.

The multi-CMT model:

A multi-CMT model, represented in Figure 1, was built to describe and predict the biodistribution of the [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 within the LCG mice. This model was also used to estimate the best imaging time after the radiotracer injection. In our case, the best imaging time depends on the best signal-to-noise ratio (SNR) and the physical half-life of the radionuclide.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

SNR estimation was based on a function where the predicted tumoral concentration is divided by the predicted lung concentration as described below.

$$SNR = \frac{C_{predicted-tumour}}{C_{predicted-lung}}$$

According to the VPC, the multi-CMT model correctly described the data within the 3 compartments of interest (Figure 4). All the compartments are linked together through constant rate transfers (h^{-1}). To correctly estimate the main PK parameters, the following parameters had to be fixed to avoid overparameterization (k_{14} & k_{41} (peripheral blood), k_{pl} & k_{lp} (peripheral lung), k_e and V_3).

The multi-CMT model also included the estimation of the influence of the tumour size on the tumoral uptake ($\beta_{k12_Tumoral\ size}$) which improved the objective function ($\Delta\text{BICc} = 5.9$) and explained 6% of the inter-individual variability (IIV) of k_{12} . This configuration was not overparametrized according to the eigenvalues (Eigen = 98) estimated from the Fisher-matrix on Monolix. All PK parameters are summarized in Table 2.

.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

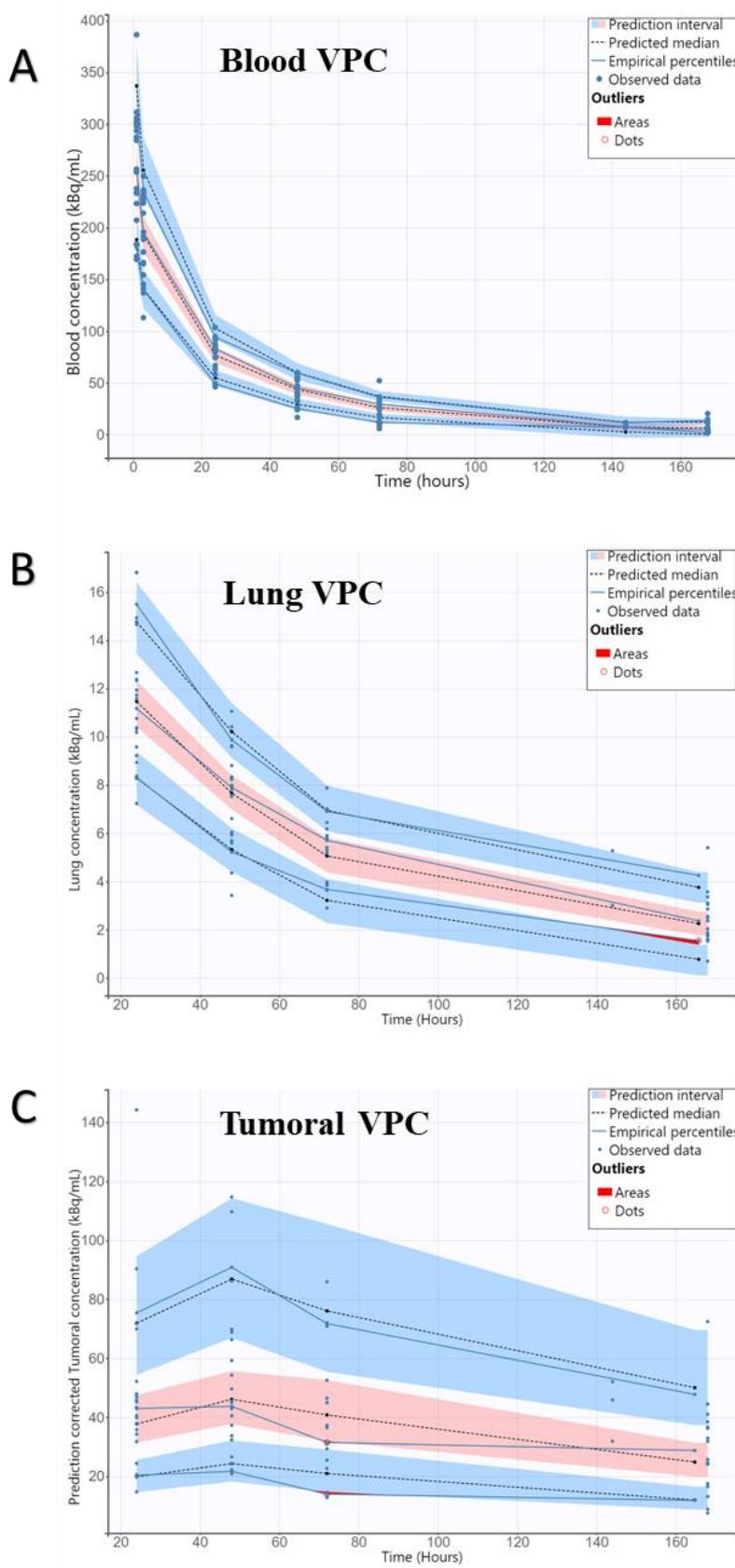


Figure 4: Visual predictive check ($n=500$ simulation) of the multi-CMT model in the blood, the lung, and the tumour. (A) represents the blood VPC, (B) represents the lung VPC and (C) represents the tumoral predicted corrected VPC. All the VPC were acquired after the estimation of PK parameters. Blue dots represent experimental data, blue lines represent empirical percentiles, blue areas represent the 90th and 5th predicted percentile, rose areas represent the 50th percentile, red areas represent the outlier areas and dashed black lines represent predicted median.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

Table 2: All PK parameters estimated from the multi-CMT model.

PK parameters	VALUE	Unit	STOCH. APPROX.	
			SE	RSE (%)
Fixed Effects				
k₁₂ pop	0.0013	h ⁻¹	0.00026	20.3
β k₁₂-Tumoral size	52.64	-	23.41	44.5
k₂₁ pop	0.0057	h ⁻¹	0.00043	7.54
k₁₃ pop	0.0069	h ⁻¹	0.0018	26.3
k₃₁ pop	0.031	h ⁻¹	0.012	38.3
k₁₄ pop	0.061	h ⁻¹	Fixed	
k₄₁ pop	0.083	h ⁻¹	Fixed	
k_{p1} pop	0.04	h ⁻¹	Fixed	
k_{p1} pop	0.0084	h ⁻¹	Fixed	
k_e pop	0.02	h ⁻¹	Fixed	
V pop Central	2.43	mL	0.075	3.08
V₂ pop Tumoral	0.59	mL	0.1	17.4
V₃ pop Lung	2.78	mL	Fixed	
Standard Deviation of the Random Effects				
ω k₁₂	0.46		0.074	16.1
ω k₂₁	0.2		0.14	73.7
ω k₁₃	0.14		0.037	26.3
ω k₃₁	0.15		0.11	71.2
ω V	0.13		0.023	17.3
ω V₂	0.061		0.045	74.8

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

Error Model Parameters			
a central	4	0.61	15.1
b central	0.072	0.012	17.0
b tumour	0.19	0.023	11.9
a lung	1.03	0.099	9.62

ω : Standard deviation of the random effect (interindividual variability), a : constant error model, b : proportional error model, β : correlation between PK parameter and covariate, SE: Standard error, RSE: Relative standard error.

SNR output & Simulation:

The calculation of the SNR is based on the predicted concentrations from the tumour and the contralateral lung. Figure 5.A describes the prediction made by the model for the SNR estimation. A large variability is observed, and it is due to the heterogeneous distribution in the tumour. Based on the SNR estimation, the best imaging time should be at 124h or within the time range of 115h and 135h (based on the median estimation). In the future, [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 could be used to monitor PD-L1 expression and will be injected at least twice. We performed a simulation of a 2nd injection in Figure 5.B. After the 2nd injection (similar dose), the SNR will probably decrease.

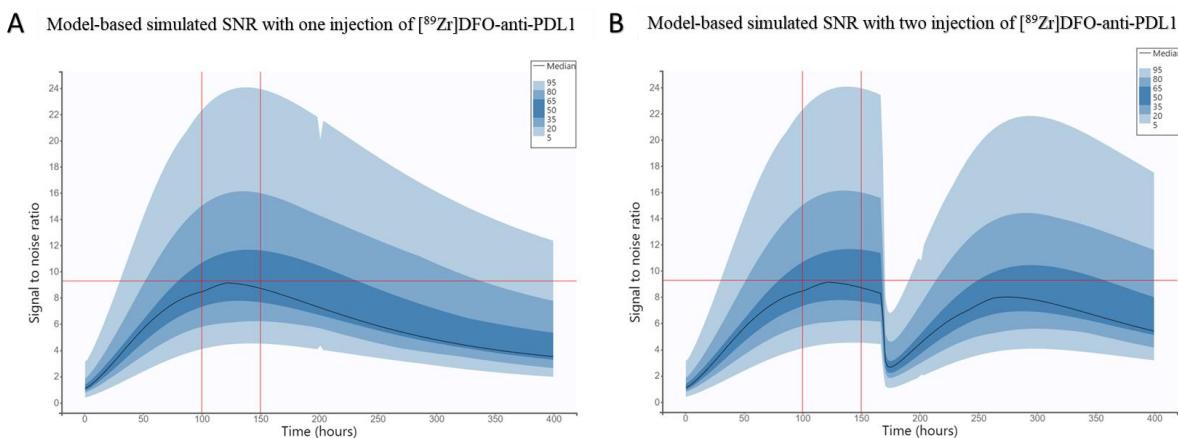


Figure 5: Model-based simulated SNR of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 based on 23 subjects. (A) represents the predicted SNR from the administrated dose and (B) represents the predicted SNR after a 2nd injection at day 7. Black line represents the predicted SNR median whereas blue areas represent the SNR distribution.

4. Discussion

In the current study, we investigated the PK parameters of a radiolabelled murine anti-PDL1 with zirconium-89 in healthy and LCG mice. The aim of this work was to develop a PK model to describe *in vivo* biodistribution through constant transfer rates to estimate the best imaging acquisition times.

In the healthy group, bone and liver organs were highly exposed to the [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1. Bone AUC_{0 to 168h} is highly related to the free zirconium-89 released from the chelator or from antibody metabolism. PD-L1 could be expressed in bone, especially at the femoral region. As described by Li et al [228], bone marrow derived macrophage tend to express PD-L1 in the case of CMT167 lung cancer induced mice but the basal level (control) PD-L1 expression is low. This suggested that a partial bone uptake is associated to the possible expression of PD-L1.

High liver concentration over time could describe a non-specific clearance [179], [205], [234]. Non-specific clearance occurs through proteolytic degradation and pinocytosis leading to the degradation of the antibody into amino acids or peptides [235]. These peptides could contain [⁸⁹Zr] and accumulate within the liver. Interestingly, PD-L1 is expressed in the non-parenchymal liver cells and could participate in the specific clearance of the anti-PDL1 [245]. Monoclonal antibody distribution is often limited to the vascular and interstitial space because of their size and polarity [236]. Their distribution and diffusion happens through the convective transport in vascular endothelial cell membrane [265]. This explains the higher concentration in the liver associated with fenestrated and discontinuous capillary endothelia.

Comparison between healthy and LCG lung AUC_{0 to 168h} happens to be significantly different ($P<0.001$). LCG lung region was extracted from the opposite injected lung. The higher uptake in the contralateral lung could be explained by microlesions that were not detectable using CT due to their size. However, *ex vivo* experiments demonstrated that when counted with gamma counter, we were able to detect radioactivity in these microlesions. These findings could highlight one of the limitations of *in vivo* PET imaging in our model.

In the LCG group, tumour AUC_{0 to 168h} value was the highest one after the bone but the coefficient of variation was 50%. This variability could be linked to PD-L1 expression (size of the tumour, expression intensity) and the tumour injection site. For instance, some tumours located at the junction between the ribcage and the lung tend to have a higher uptake (for example: 97 kBq/mL) than the ones located in the lung (for example: 30 kBq/mL). Lung cancer PD-L1 expression is heterogeneous and could impact the uptake of the tracer [266]. As can be

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

seen in Figure 1-S (Supplementary data), tumoral AUC_{0 to 168h} increases with tumour size. It is known that PD-L1 promotes tumoral growth [267]. Thus, we could hypothesize that there is a correlation between PD-L1 expression, tumour size and [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 uptake. After binding to PD-L1, [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 could be internalized and catabolized through lysosomal degradation as an antibody-antigen complex [220], [268]. Hence, [⁸⁹Zr] will be trapped in tumoral cells and participate to the tumoral signal [269].

Overall, biodistribution of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 could be different from the native anti-PDL1 because of the electric charge (i.e. [⁸⁹Zr]⁴⁺). For example, changing the isoelectric point by adding a positive charge lead to an increase of plasma clearance and resulted in higher volume of distribution [176].

Pharmacokinetics:

NCA: In terms of AUC, CL and MRT, there were no statistical differences between healthy and LCG mice. However, the biological $t_{1/2}$ and VD were statistically significantly different ($P<0.001$). These differences could be explained by the fixation of the antibodies to its target (PD-L1) expressed by the tumour cells. Enhanced permeability and retention (EPR) effect could also play a key role in the retention of the antibodies through the junction and vascularization of the tumour tissue and participating to the non-specific uptake [249], [250].

CA: In the blood, the 2-CMT model was able to correctly capture the experimental data in both healthy and LCG group. All fixed effects were estimated with a RSE% < 10%. The PK model was unable to estimate correctly the standard deviation of random effect (SDRE or IIV) on k_{12} and k_{21} of the peripheral compartment with an RSE% of 57.9% and 96.1% respectively. In clinical studies of patients under atezolizumab (anti-PDL1, Genentech, Roche), a 2-CMT PK model with linear elimination was used with a combined model error [202]. Stroh et al [201] reported the use of the body weight as covariate on the clearance however in our case, it did not significantly improve the model. Healthy or tumoral status as categorical covariate was statistically correlated ($P=0.03$) to the elimination (on k_e parameter) but it failed to significantly improve the BICc so was not included in the final model.

10F.9G2 (murine anti-PDL1) demonstrated a non-linear PK from dose 2 μg to 200 μg as reported by Kurino et al [248] with CL varying from 1.1 mL/h to 0.1 mL/h respectively. In our study, we found a CL in LCG group of 0.1 mL/h for dose between 41 to 53 μg . This suggests that in the current configuration, the PK of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 is considered linear.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

Specific activity is the amount of radioactivity per unit of weight [270]. The specific activity can vary with ongoing radiosynthesis and lead to different values. In the case of a non-linear PK, the same radioactive dose with different specific activity could impact the PK profiles, particularly in the case of antibodies. Moreover, specific activity could also impact tumour uptake as demonstrated by Sharma et al [271]. Authors have performed the radiosynthesis with zirconium-89 using 5 different DFO molar equivalent (chelator to antibody) and found that with 60 to 200 molar equivalents, a significant reduction in tumour uptake was observed. In our study, since all the radiosynthesis led to a different SA value (13.7 GBq/g to 23.5 GBq/g), we wanted to investigate the influence of SA on the PK parameter and tumoral biodistribution. No statistical correlation was found between SA and PK parameters.

One of the aims of the study was to estimate the highest signal-to-noise ratio (SNR). The SNR could be used as a parameter to estimate the best time for image acquisitions after tracer injection. It can be calculated using experimental data but due to sampling limitations (i.e. number of images taken), the optimal SNR may actually be after the last image taken or between two imaging time points such as 72h and 168h. Best imaging time must also rely on the image quality and, by extension, the number of radioactive counts in the tissue. In this condition, the closer the image time is realised to that of the physical decay period, the better signal will be. For this purpose, we decided to develop a semi-mechanistical model that describes tracer distribution in the lung (as the background signal) and the tumour (as the signal). Furthermore, we used a POP_PK approach to understand the possible sources of variability such as the tumoral size.

The complexity of the multi-compartmental model was mostly related to the number of PK parameters and their variability. To facilitate model construction, organ PK parameters were first estimated in organ specific models, and the estimated parameter values obtained were used as initial values for the multi-CMT model. Unfortunately, antibody concentration values from blood samples were not available for analysis. This additional information could have strengthened our estimations. The large number of parameters in this model meant we had to fix some PK parameters and focus on estimating the main ones such as the constant rate from the blood to the tumour and to the lung. The only covariate significant in our model was tumour size on k_{12} (tumoral uptake). None of the other covariables tested such as the weight or SA (excluding 4th group) improved the objective function. A limitation of our model is the small number of mice included in the study.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

According to the SNR estimation from the multi-CMT model, best imaging time after tracer injection should be at 125h or approximately 5 days. The SNR is highly variable with an interval of 4 to 24. We think that this variability is mainly related to the tumoral data and hence explains these results. Simulations were performed in the case of a second injection 7 days after the first injection. The choice to have carried out a simulation 7 days after the 1st injection stems from the experimental data which are the short life span of the mice, indicating an important tumour and MET dynamics.

After a second injection, we can clearly see a drop in the SNR explained by a rapid distribution in the lung. Furthermore, the median of SNR could be lower. Thus, a decrease of the SNR is expected (from 9.6 to approximately 8). However, these simulation needs to be validated by experimental data.

5. Conclusion

In the current work, we propose a rational way to estimate imaging time after tracer injection based on PK modelling. The PK parameters extracted from the multi-CMT model describe the distribution of tracer in LCG group and helped to estimate the best imagine time after tracer injection (125h).

6. Data Availability Statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to Melanie White-Koning: melanie.white-koning@univ-tlse3.fr

7. Ethics statement

All applicable international guidelines for the care and use of animals were followed. This study was conducted under acceptance of the protocol by the French Ethics Committee (no. 22816-2019111216307851).

8. Author contributions

A-SS, CF and MWK designed the project. AK, CF and A-SS contributed to the labelling process. AK, MWK were responsible for data analysis, imaging analysis and data interpretation. AK wrote the manuscript and CF, A-SS, MWK, EC and PP revised the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

9. Funding

This study was funded by the European Regional Development Fund (grant n°16015075/MP0014063) and Occitania Region ("Mutualised Platform" grant n°16015090) PIR² and Labex IRON (11-LABX-0018).

10. Conflict of interest

Employment: Charlotte Fontan and Yann Bouvet are employees of General Electric- Zionexa laboratory. All the rest of the author declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

11. Acknowledgement

We thank the CREFRE-Oncopole experimental zootechny and Non-Invasive Exploration teams -US006/CREFRE Inserm/UPS/ ENVT Anexplo platform, Toulouse for animal housing and technical assistance, the Culture Collections' catalogue (reference number 10032302-1VL) for providing the cells and IMAVITA (France) for their technical advice.

Supplementary data

Table 1-S: summary of all radiosynthesis properties for *in vitro* and *in vivo* assays of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1.

Radiolabelling parameters	Values (units)	CV
Concentration	0.435 (mg/mL)	13%
Specific activity	11.1 GBq/g	10%
Volumetric activity	5 GBq/L	17%
Radiolabelling yield	55.50%	31%
Radiochemical purity	>95%	-

CV: Coefficient of variation

Table 2-S: Comparison of the area under the curve to 168h of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 between healthy and LCG group

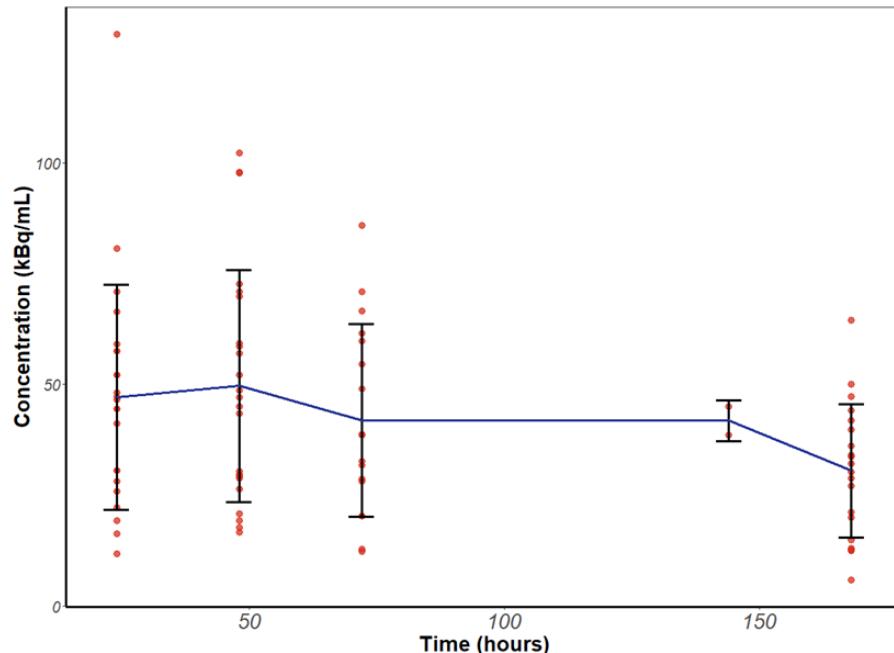
Groups	Healthy mice (n=7) (kBq.h/mL (CV%))	LCG mice (n=19) (kBq.h/mL (CV%))	p-values
Bone	26251 (12%)	17558 (28%)	< 0.001

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

Heart	1528 (11%)	2100 (26%)	< 0.001
Kidney	1311 (10%)	1736 (33%)	0.002
Liver	3714 (15%)	5880 (26%)	< 0.001
Lung	531 (6%)	890 (30%)	< 0.001
Tumour	-	6303 (50%)	-

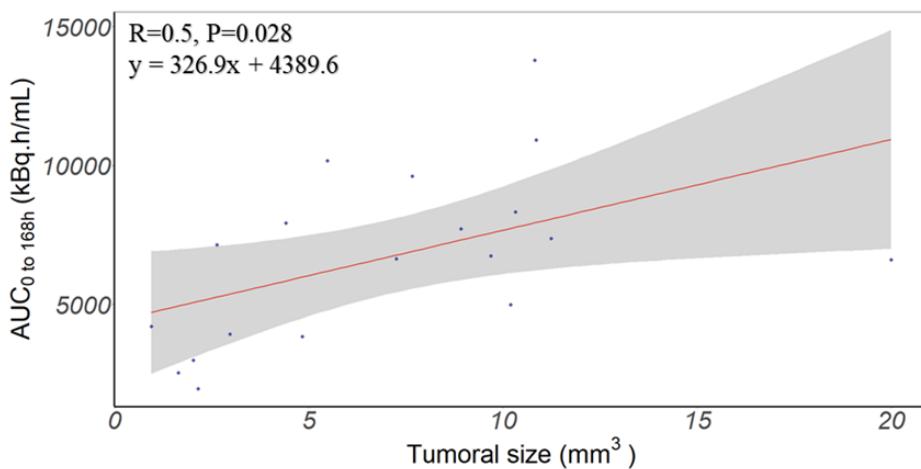
CV: Coefficient of variation

A Biodistribution of [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 in the CMT167 tumour



B

Correlation between tumoral area under the curve and tumoral size



4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

Figure 1-S: Biodistribution of [^{89}Zr]DFO-anti-PDL1 in the CMT167 tumour. (A) Data were acquired at 24h, 48h, 72h, 144h, 168h. The blue line represents the mean concentration, and the red dots represents the experimental data extracted from PET-CT images. (B) represents the correlation between tumoral AUC_{0 to 168h} calculated from NCA method and tumoral size. ($P = 0.028$, Pearson correlation). Error bars are the standard deviation

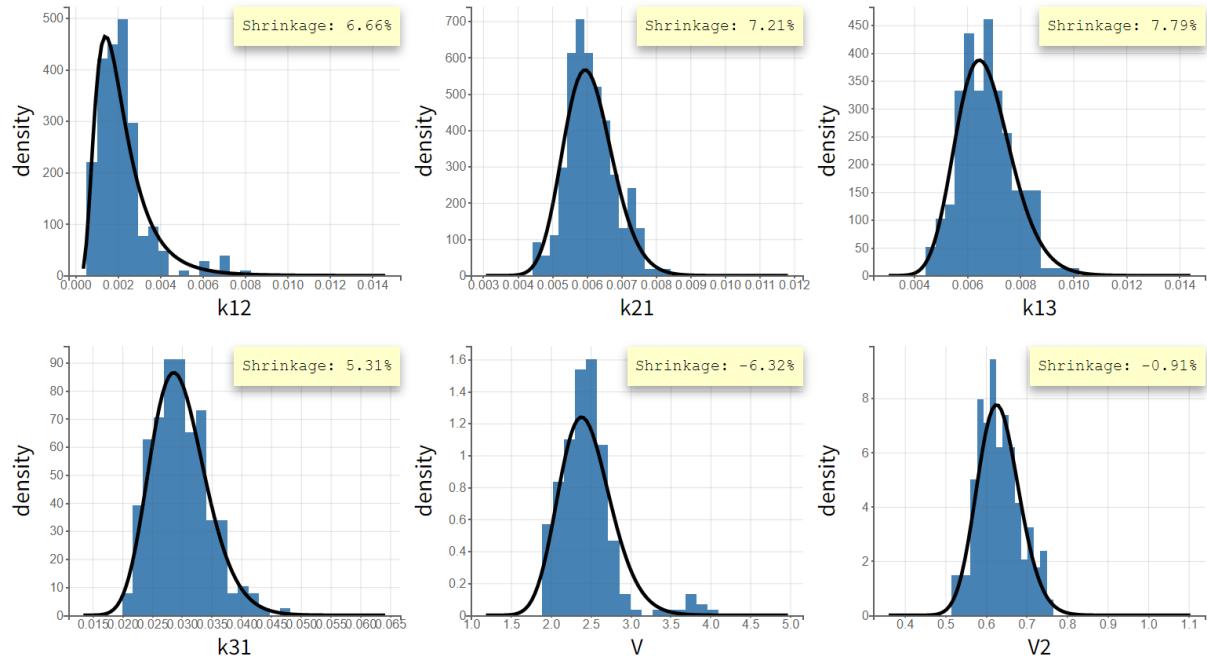


Figure 2-S: Distribution of the individual parameters. Blue histograms represent the empirical distribution (individual estimates from the condition distribution) whereas the black line represent the theoretical distribution.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

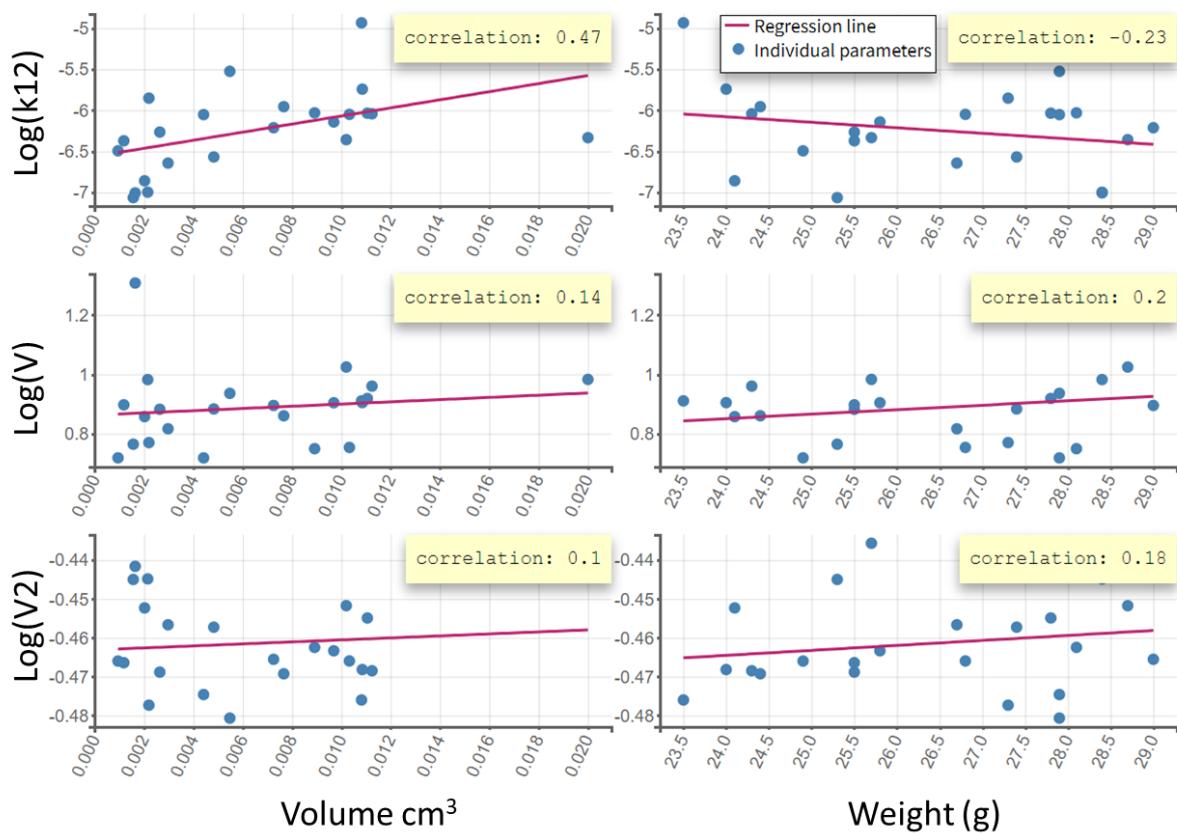


Figure 3-S: Correlation between individual parameters and covariate. Volume represents individual tumoral volume and Weight represent individual mouse weight.

4. Pharmacokinetic modelling of a radiolabelled anti-PDL1 with zirconium-89 in a syngenic lung cancer mice model

Multi-compartmental model on Monolix

[LONGITUDINAL]

input = {k12, k21, k13, k31, k14, k41, kpl, klp, k, V, V2, V3}

PK:

compartment(cmt=1, amount = Aa, volume = V) ;*Central*

peripheral(k12, k21, amount = Ab, volume = V2) ;*Tumoral*

peripheral(k13, k31, amount = Ac, volume = V3) ;*Lung*

peripheral(k14, k41, amount = Ad) ;*Peripheral*

elimination(cmt=1, k)

iv(cmt=1)

EQUATION:

t_0 = 0;Initial condition

ddt_Aa = (-(k12+k13+k14+k)*Aa) + k21*Ab + k31*Ac + k41*Ad ;*Central compartment*

ddt_Ab = k12*Aa - k21*Ab;*Tumoral*

ddt_Ad = k14*Aa - k41*Ad;*Peripheral*

ddt_Ac = k13*Aa + klp*Alp - k31*Ac - kpl*Ac;*Lung*

ddt_Alp = kpl*Ac - klp*Alp;*Peripheral lung*

;Concentration conversation

Ca = Aa/V

Cb = Ab/V2

Cc = Ac/V3

;AUC estimation

ddt_AUCA = Ca;*Central*

ddt_AUCb = Cb;*Tumoral*

ddt_AUCc = Cc;*Lung*

SNR = Cb/Cc

OUTPUT:

output = {Ca, Cb, Cc}

table = {AUCA, AUCb, AUCc, SNR}

C. Discussion générale

Ces travaux de thèse s'articulent autour de l'imagerie de PD-L1 à l'aide d'anticorps radiomarqués au zirconium-89, l'étude de ses propriétés pharmacocinétiques, de sa distribution, de sa spécificité de ciblage et de l'estimation de sa dosimétrie corps entier. Ce type de traceur permettrait d'offrir aux cliniciens une réponse quant à l'expression corps entier de PD-L1 avant l'administration de l'immunothérapie par anti-PD1 (nivolumab, pembrolizumab) ou anti-PDL1(atezolizumab, durvalumab, avelumab).

L'imagerie de PD-L1 à l'aide de l'immuno-TEP semble montrer de bons résultats dans la littérature, cependant, la détermination du temps d'imagerie après injection du traceur est généralement réalisée de façon empirique ou ne se base que sur la concentration maximale tumorale. C'est dans cette optique, que nous avons développé un modèle de pharmacocinétique de population permettant d'estimer le meilleur temps d'imagerie basé sur le rapport signal-sur-bruit.

Afin de répondre à nos objectifs, nous avons développé un modèle murin syngénique de CPNPC et validé l'expression de PD-L1 sur des coupes pulmonaires. De plus, le modèle préclinique devait avoir la capacité de présenter des formes de résistances. L'un des biomarqueurs étudiés est le TIM-3. Dans un deuxième temps, nous avons mis en place une méthode de radiomarquage d'un anti-PDL1 au zirconium-89. Le choix de ce dernier repose sur une période physique compatible avec la période biologique des anticorps (IgG). Cette étape de radiomarquage a été suivie d'une série de tests *in vitro* afin de vérifier l'intégrité du traceur avant l'étape *in vivo*. Afin d'analyser la distribution du traceur chez les souris saines et CPNPC, nous avons utilisé de la modélisation PK pour estimer les différents paramètres PK au niveau sanguin et au niveau des organes. L'application de la modélisation et des équations allométriques nous a ensuite permis d'estimer une dosimétrie chez l'homme. Enfin, nous avons développé un modèle multi-compartimental afin d'estimer le meilleur temps d'imagerie.

Les études en immuno-oncologie nécessitent l'utilisation de modèles précliniques spécifiques pour répondre aux différentes problématiques. Le standard dans l'industrie pharmaceutique repose sur l'utilisation de modèles xénogreffes de cellules cancéreuses humaines [272]. Cependant, ce type de modèle requiert des souris dépourvues de système immunitaire, celui-ci étant pourtant essentiel pour le développement des traitements par immunothérapie. De plus, il est nécessaire que le modèle préclinique possède un système immunitaire qui évolue en fonction

Discussion générale

de la tumeur et de l'expression des biomarqueurs ou des CI. On s'est donc orienté vers le modèle syngénique. Ce type de modèle préclinique permet de conserver un système immunitaire fonctionnel en utilisant des cellules appartenant à l'espèce de l'hôte [273]. Sur la totalité des souris utilisées pour le développement du modèle préclinique seulement 2 souris (étude de survie) n'avaient pas développé de tumeur. Le modèle utilisé présente deux avantages majeurs : la facilité d'induction de la tumeur et son taux faible de mortalité à l'injection.

En revanche, comme vu sur la Figure 32, deux formes de lésions sont retrouvées et peuvent être à l'origine de la variabilité PK du traceur (voir plus bas). L'autre inconvénient est l'évolution très rapide de la tumeur observée en *ex-vivo*. A partir de la 2^{ème} semaine (post-injection des cellules tumorales), l'état général des souris se dégrade en commençant par une perte de poids. Cette évolution rapide présente un inconvénient majeur si un suivi longitudinal d'une durée plus longue est prévu.

Les différents tests IHC et IF ont montré que le modèle préclinique était intéressant dans l'étude de l'apparition des phénomènes de résistances (évolution positive de TIM-3) et qu'il exprimait PD-L1. Ces observations ont également été reportées par Li et al et Koyama et al. Bien que les résultats de TIM-3 soient préliminaires, une étude de l'évolution de TIM-3 sans traitement serait nécessaire pour confirmer que l'évolution observée (Figure 36) est bien due à l'administration du traitement et non une évolution naturelle du MET.

La 2^{ème} partie des travaux de cette thèse se sont concentrés sur l'imagerie de PD-L1 dans un modèle murin syngénique de CPNPC à l'aide d'un anti-PDL1 radiomarqué (immuno-TEP). Bien que ce type d'application existe, à notre connaissance, c'est la 1^{ère} fois que l'imagerie de PD-L1 est menée dans le même type de modèle préclinique.

Cette imagerie passe par le radiomarquage des anticorps. Il peut être réalisé à l'aide de différentes techniques comme le marquage par liaison covalente entre l'anticorps et le radionucléide ou par l'intermédiaire de chélateurs [274], [275]. Le zirconium-89 se présente sous forme d'un ion qui nécessite 8 liaisons de coordination afin d'être stable. Dans le cas du zirconium-89 le chélateur plus couramment utilisé est le p-NCS-Bz-DFO dérivé de la déféroxamine. Or, il dispose de 6 liaisons non-covalentes alors que le $[^{89}\text{Zr}]$ en nécessite 8 pour être stabilisé. Ceci conduit à une diminution de la stabilité et un relargage du $[^{89}\text{Zr}]$ libre. Ce dernier se lie au niveau de la surface des os, contribuant à une irradiation du tissu hématopoïétique radiosensible [238].

Discussion générale

D'autres chélateurs comme le DFO* ou le HOPO présentent des stabilités *in vitro* et *in vivo* supérieur au DFO comme l'ont montré les études précliniques de Raavé et al [276] ou Déri et al [261]. Les expériences menées par Raavé et al, ont montré une diminution deux fois plus importante de la captation osseuse à 168h en utilisant le DFO*.

Nos études de stabilité dans le plasma ont révélé une PRC de 75% à 168h et ces résultats sont similaires à ceux retrouvés par Vugts et al [277]. En revanche, la modification du chélateur par le DFO* s'est montré plus stable dans le plasma que le DFO avec une PRC de 96%. Il devient donc clair que l'utilisation du p-NCS-Bz-DFO présente des limites en termes de stabilité qui peuvent augmenter la dose reçue au niveau des os et donc de la moelle hématopoïétique, particulièrement radiosensible. L'utilisation de ce type de chélateur est donc une piste d'amélioration afin de diminuer la dosimétrie de cet examen.

Afin d'imager l'expression de PD-L1 chez la souris, nous avons utilisé un anticorps murin (clone 10F.9G2). Son marquage au zirconium-89 a été réalisé à l'aide de la méthode déjà établie par Vosjan [226] avec un ratio chélateur/anticorps de 3 :1. Cependant, les rendements des synthèses ont présenté une grande variabilité et ce, bien que les conditions d'utilisation aient été similaires. Afin de comprendre ce phénomène, Sharma et al [271] ont investigué l'impact du nombre d'équivalent molaire de chélation sur la radiosynthèse. On remarque que pour un ratio de 5 :1, le rendement est plus faible (environ de 55%) en comparaison d'un ratio plus important de 20 :1 (environ 80%). Plus encore, le ratio 5 :1 présente une plus grande variabilité que le ratio 20 :1. En revanche, plus le nombre de chélateurs augmente, plus la constante d'affinité ou KD semble diminuée (0,29 à 0,39 nM pour les ratios 5 :1 et 20 :1 respectivement) ainsi que l'immunoréactivité (IR). Ceci s'explique par l'encombrement stérique que génère la présence des chélateurs autours de l'anticorps. Des ratios plus importants comme 60 :1 ou 200 :1 semblent également impacter significativement la fixation *in vivo* du traceur à sa cible, en divisant le signal tumoral de moitié.

Dans l'objectif de tester l'intégrité du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1, des tests de *binding*, d'IR et de stabilité ont été menés. Nous avons utilisé pour cela des cellules CMT167. L'intérêt d'utiliser des cellules CMT167 est de démontrer la capacité de fixation du traceur *in vitro* avant le passage *in vivo* sur les mêmes cellules inductrices du CPNPC dans le modèle murin. De plus, la cytométrie a révélé une expression hétérogène de PD-L1, ce dernier étant exprimé chez environ 20% des cellules tumorales. Ces résultats sont confirmés par Li et al où les auteurs retrouvent une faible expression de PD-L1 *in vitro*. La conséquence de cette faible expression et de son hétérogénéité peut se répercuter sur l'estimation du KD comme le montre la Figure 1.A de

Discussion générale

l'article 1. L'une des solutions aurait été d'augmenter l'expression de PD-L1 à l'aide de l'INF- γ afin de limiter les phénomènes d'expression de PD-L1. En effet, comme démontré par Li et al, l'expression de l'acide ribonucléique message (ARNm) est 50 fois supérieure avec l'INF- γ que chez les cellules sans INF- γ .

À notre connaissance, seul Kikuchi et al [232] ont présenté des résultats d'immunoréactivité après radiomarquage de l'anti-PDL1 (10F.9G2) au zirconium-89. Nous avons retrouvé une IR de 96% dans notre étude en comparaison d'une IR comprise entre 55 et 70% par Kikuchi et al. Cette différence peut s'expliquer par l'équivalent en chélateur plus élevé avec un ratio de 5:1.

Les résultats de *binding* et d'IR ont permis de conclure que l'anticorps n'était pas endommagé par l'étape de radiosynthèse. Ces tests ont été complétés par des tests de stabilité dans le plasma et dans le PBS. A J7, les PRC étaient respectivement supérieur à 95% dans le PBS et de 75% dans plasma. Deux hypothèses sont alors envisagées pour expliquer la différence de stabilité dans le plasma et dans le PBS : l'une serait liée à la dégradation enzymatique plasmatique et l'autre aux conditions physicochimiques participant la dégradation du traceur.

Vugts et al [277] ont mené des expériences *in vitro* de stabilité dans le plasma. Ils ont retrouvé une PRC dans le plasma autours des 70% en utilisant le DFO. En permutant de chélateur (avec un plus stable), le DFO* présente une PRC > 95% invalidant l'hypothèse de dégradation enzymatique. En revanche, dans une solution physiologique (NaCl 0,9%), on retrouve une PRC de 90% et de 50% à J7 pour le DFO* et DFO respectivement. Il semblerait que la stabilité du traceur soit donc liée aux conditions physicochimiques.

Une fois l'étape *in vitro* validée, le [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 a été injecté chez les souris saines dans le but d'évaluer sa distribution, sa dosimétrie et d'estimer les paramètres PK. Enfin, le [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 a montré sa capacité à cibler l'expression de PD-L1 *in vivo*.

Le foie est le 2^{ème} organe (après les os) à présenter une accumulation importante du traceur chez la souris saine. Comme pour une majorité d'anticorps monoclonaux radiomarqués, le foie reste l'organe majoritaire de l'accumulation des anticorps radiomarqués [248], [256], [278]. Cette accumulation physiologique est due à la vascularisation importante du foie. Ce dernier participe également à la clairance non-spécifique d'une grande partie des anticorps monoclonaux. Cependant, PD-L1 est exprimé dans les cellules hépatiques non-parenchymateuses et les cellules de Kupffer [279], [280]. Cela serait à l'origine d'une augmentation du signal hépatique à la suite de la fixation du traceur et participer à la clairance spécifique du traceur [234]. Cela

Discussion générale

présente donc un impact non négligeable sur la dosimétrie du traceur en comparaison avec d'autres anticorps marqués au [⁸⁹Zr] et ayant d'autres cibles que le PD-L1.

La distribution rénale est quant à elle plus faible en raison de l'incapacité des reins à filtrer les anticorps à cause de leur taille/poids (seuil entre 30 et 50 kDa). En revanche, le signal au niveau des reins n'est pas nul car ces derniers peuvent représenter le lieu d'élimination du [⁸⁹Zr] libre ou sa forme complexée au DFO. Des études menées par Holland et al montrent précisément que le [⁸⁹Zr]DFO est éliminé par voie rénale [281]. Il semblerait donc que des produits de dégradation comme le [⁸⁹Zr]DFO soient générés après administration du traceur. Afin de confirmer cette hypothèse, des analyses des urines sur les radiométabolites doivent être réalisées pour confirmer cela.

L'expression de PD-L1 au niveau pulmonaire est faible chez la souris saine ce qui explique le faible signal du traceur au niveau de cette région d'intérêt [245]. On retrouve ce faible signal dans des études préclinique comme celle de Truillet et al ou Ehlerding et al [282], [283]. Le signal au niveau pulmonaire contribue à un faible bruit-de-fond (BDF) idéal pour déceler des signaux provenant de la tumeur primaire ou de sites métastatiques. En revanche, l'expression basale de PD-L1 chez l'homme est plus importante et la translation des résultats précliniques peuvent présenter des différences.

Enfin, la distribution du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 nécessiterait une analyse plus poussée sur les différents métabolites radioactifs afin d'apporter plus de précisions sur les mécanismes sous-jacents de cette distribution au niveau des organes. En effet, les résultats observés au niveau des organes ne sont que le reflet de signaux radioactifs et non de l'anti-PDL1. Ces signaux peuvent être liés à un métabolite ou au [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1.

Parmi les organes d'intérêts, les os reflètent l'exposition la plus importante. Pour des raisons de considérations dosimétriques, nous avons positionné la région d'intérêt au niveau de l'épiphyse fémorale et ce, dans le but de surestimer la dosimétrie. Le [⁸⁹Zr] libre se fixe généralement dans cette région car il présente des analogies avec les minéraux qui constituent le tissu osseux. On peut donc considérer cette région comme le reflet du métabolisme des anticorps. En effet, la dégradation des anticorps dans le sang (séparation du [⁸⁹Zr] de son chélateur) ou dans les organes (exemple : le foie) peut libérer le [⁸⁹Zr], qui se fixera en suite au niveau de l'épiphyse fémoral. La région de l'épiphyse fémoral regroupe différentes cellules du tissus osseux notamment les ostéoclastes, responsable de la résorption osseuse ou les ostéoblastes responsables de la fabrication osseuse.

Discussion générale

Les investigations de Abou et al [238] décrivent le tropisme du [⁸⁹Zr] pour les os après injection du radionucléide chez la souris. Il faut néanmoins nuancer cela étant donné qu'une fois internaliser, les anticorps peuvent être dégradés et libérés le [⁸⁹Zr] [185]. Ce dernier étant chargé positivement, il peut se retrouver piéger dans les différents tissus [232], [269]. L'épiphyse fémorale est également le siège d'un remodelage osseux assez important, particulièrement durant la tranche d'âge des souris sélectionnées (4 à 6 semaines). Ceci conduirait à un besoin plus important en minéraux dont le zirconium-89 libre. Les expériences menées par Ferguson et al [243] semblent étayer cette réflexion étant donné que sur la période 0 à 20 semaine, la minéralisation osseuse est croissance (45 à 62%).

Bien que les os représentent le 1^{er} tissu en termes d'exposition, il reflète dans une majeure partie la fixation du [⁸⁹Zr] libre. Cette fixation peut en effet être amplifiée par l'âge des souris. En revanche, l'extrapolation de cette exposition chez l'homme peut présenter un biais majeur étant donné qu'à l'âge adulte, la croissance osseuse est moindre chez l'homme. Ainsi, la fixation du [⁸⁹Zr] ne se verrait pas amplifier et découlerait d'une exposition moins importante.

Les études distribution du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 se sont conclues avec l'estimation de la dose effective corps entier. Avec une dosimétrie de 132 µSv/MBq, le [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 présente à notre connaissance la valeur de dosimétrie la plus faible par rapport à d'autres anticorps anti-PDL1. Parmi ces anticorps, on retrouve l'avelumab marqué au zirconium-89 avec une dosimétrie de 363 µSv/MBq [233]. Pour expliquer la différence entre les valeurs de dosimétrie, l'hypothèse serait que l'utilisation d'un modèle immunocompétent aurait une CL plus importante. En effet, dans notre étude le modèle murin est pleinement immunocompétent et les cellules immunitaires circulantes pourraient participer à l'élimination du traceur.

Néanmoins, il est nécessaire de pondérer les résultats de dosimétrie. En comparaison avec le [¹⁸F]FDG, la dosimétrie du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 reste 6 fois plus importante . La dose effective de 132 µSv/MBq reste un frein conséquent à son utilisation en clinique. Cependant, des optimisations au niveau de la radiosynthèse pourraient diminuer la dosimétrie. En changeant par un chélateur plus stable comme le DFO*, le [⁸⁹Zr] libre aurait une fixation osseuse moins importante et par conséquent une dosimétrie plus basse.

Comme vu précédemment, l'extrapolation de la souris vers l'homme est sujette à différents biais. Ces derniers peuvent être l'expression de la cible, les capacités métaboliques ou encore le flux sanguin. Ces caractéristiques peuvent conduire à une estimation erronée de la dosimétrie. L'étude du [⁸⁹Zr]DFO-panitumumab illustre parfaitement les limitations de l'allométrie avec

Discussion générale

une prédition à partir de la souris de la dosimétrie chez l'homme autour de 587 µSv/MBq alors qu'avec les données cliniques, la dosimétrie est 2 fois moins importante [251], [252]. D'autres voies peuvent être envisagées pour évaluer la dosimétrie chez l'homme comme la pharmacocinétique basée sur la physiologie ou PBPK. Celle-ci permettrait de prendre en considération les différences physiologiques, l'expression de cible endogène ou l'influence du FcRn pouvant influencer la PK.

Chez toutes les souris CPNPC, le [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 a été en mesure de cibler la tumeur dès 24h et atteignant une concentration maximale au bout de 48h. Combinés aux résultats de l'étude de blocage, nous avons réussi à visualiser l'expression de PD-L1 chez la souris CPNPC à l'aide du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1. De plus, l'exposition tumorale au traceur est statistiquement ($P=0,028$) corrélée à la taille tumorale. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de nouveaux sites de liaisons disponibles proportionnels à la taille de la tumeur.

En complément de l'imagerie, nous avons évalué la pharmacocinétique du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 chez la souris saine et la souris CPNPC. Chez les souris saines, le VD était de 4,4 mL ± 0,3 soit, 2,4 fois plus important que le volume vasculaire chez la souris (~2,5 mL). Cela peut impliquer une distribution du traceur dans des tissus plus profonds ou une fixation à des cibles présentes dans l'organisme. En effet cela s'explique par l'expression ubiquitaire de PD-L1 chez la souris comme démontré dans la revue de Keir et al [245]. Chez les souris CPNPC, le VD était de 5,6 mL ± 1,4. La raison de cette augmentation est liée à la présence de sites de fixations exprimés par la tumeur.

À notre connaissance, seuls Kurino et al [248] semblent avoir évalué la PK du 10F.9G2. Les auteurs ont trouvé une CL dose-dépendante (PK non-linéaire) chez la souris. En revanche, pour une dose de 200 µg, la $CL_{200\mu g}$ (0.09 mL/h) est similaire à la valeur de $CL_{50\mu g}$ (0.1 mL/h) qu'on retrouve dans notre étude. On peut donc en déduire que pour une dose supérieure ou égale à 50 µg la PK du traceur est linéaire. Ceci nous a permis de sélectionner le type d'élimination du modèle PK.

Dans une deuxième analyse, nous avons appliqué l'approche par population pour étudier l'impact des différentes covariables comme le poids, le statut tumoral ou encore l'activité spécifique (AS). Le modèle à 2-CMT avec une élimination linéaire (1er ordre) est celui qui décrit le mieux les données expérimentales. Ce type de modèle est régulièrement retrouvé dans la littérature pour décrire la distribution des ACM à forte dose. Nous avons évalué l'impact des covariables sur les paramètres PK comme le statut tumoral sur le V1 sans amélioration de la

Discussion générale

fonction objective. Étonnamment, les différences qu'on retrouve avec l'approche NCA ne sont pas retrouvées avec l'approche CA. En effet, il arrive que l'approche NCA donne une surestimation de la variabilité interindividuelle.

Les différentes valeurs de l'activité spécifique ont été incluses dans le modèle avec covariables pour tester leur impact sur les paramètres PK mais cela n'a pas amélioré la fonction objective. L'ajout d'un chélateur ainsi que d'un radionucléide (comme le $[^{89}\text{Zr}]^{4+}$) modifient la charge isoélectrique générale ou le poids moléculaire de l'anticorps et cela peut se répercuter sur sa capacité de distribution ou d'élimination. Li et al [284] ont étudié à l'aide de l'approche PK l'influence du poids moléculaire sur la CL. Ils constatent que la CL diminue en fonction de la taille. Ces considérations peuvent impacter le temps de résidence de la molécule et être à l'origine d'une dosimétrie plus importante. La charge peut également altérer la PK du traceur en augmentant la CL, le VD et la disposition tumorale [285]. C'est ce que montre l'étude de Hong et al [286] où les auteurs ont augmenté le potentiel isoélectrique d'une IgG ce qui a entraîné une augmentation du CL et du VD.

Enfin, l'évaluation du SNB se base sur le rapport entre la concentration tumorale divisée par la concentration pulmonaire qui correspond au bruit de fond. La concentration pulmonaire est estimée sur le poumon controlatéral à l'injection des cellules, par conséquent, chaque souris est son propre témoin. Afin d'évaluer le meilleur temps d'imagerie et par conséquent, le meilleur SNB, nous nous sommes basés sur l'approche PK. Cette approche a consisté dans le développement d'un modèle multi-CMT. Celui-ci décrit la distribution du traceur dans le compartiment systémique et les compartiments périphériques (pulmonaire et tumoral).

La Figure 1 de l'article n°2 représente le modèle structurel. Le choix du modèle tumoral s'est basé sur le modèle à 1-CMT. Ce dernier présentait le meilleur compromis en termes de précision d'estimation des paramètres, du BICc et de GOF. Il existe des modèles TMDD permettant de décrire à l'aide d'équations mathématiques, la distribution, l'internalisation et l'élimination du traceur au niveau tumoral. Nous nous sommes basés sur les travaux de Lindauer et al [264], où les auteurs ont développé un modèle PK mécanistique pour la PK/PD d'un anti-PD1. Cependant, le modèle était sur-paramétrisé et n'améliorait pas le *fit* global des données par rapport au 1-CMT. Nous sommes restés sur le modèle structural à 1-CMT pour décrire les concentrations tumorales.

Le SNB est la résultante du ratio des prédictions des concentrations tumorales et concentrations pulmonaires le modèle PK (multi-CMT). La Figure 7 de l'article n°2 indique un meilleur temps

Discussion générale

d'imagerie à 125h par rapport à la médiane de prédiction du SNB (droite noire). De manière générale, le temps d'imagerie préconisé pour les ACM radiomarqué est supérieur à 72h [156]. Cette période est compatible avec la distribution lente du traceur afin qu'il atteigne sa cible après divers passages dans la circulation systémique.

Le traceur ayant pour objectif le suivi de l'expression de PD-L1, une simulation d'une 2^{ème} dose a été réalisée à J7. Cette simulation avait pour but d'estimer l'impact d'une 2^{ème} injection sur le SNB. Le choix d'avoir réalisé une simulation 7 jours après la 1^{ère} injection découle des données expérimentales que sont l'évolution de TIM-3 mais également la faible durée de vie des souris, indiquant une importante dynamique tumorale et du MET.

À notre connaissance, nous n'avons pas retrouvé de méthodologie similaire pour estimer le SNB basée sur l'approche par population. Cette approche présente certains avantages étant donné qu'elle ne requiert que peu d'observations par souris et prend en considération la variabilité interindividuelle des différents paramètres PK.

D'autres paramètres pourraient être pris en compte comme le taux d'expression de PD-L1 par cellules, l'internalisation du traceur, l'élimination du radionucléide ou encore le KD. Cela aurait pour but d'affiner le modèle et de proposer des simulations basées sur le taux d'expression de PD-L1 par exemple. Il existe également des modèles QSP (*Quantitative system pharmacology*) avec une approche mécanistique. En revanche, ces modèles requièrent un nombre important de données et une grande majorité des paramètres sont fixés (non estimables).

D. Conclusion et perspectives

Ces travaux de thèse s'intéressent à la mise en place du marquage de PD-L1 chez la souris CPNPC à l'aide d'un PD-L1 marqué au zirconium-89.

Nous avons réussi dans un premier temps à mettre en place et caractériser un modèle murin de CPNPC. Ce modèle exprime bien PD-L1 et répond aux traitements par immunothérapie. Afin de pouvoir visualiser la tumeur et l'expression de PD-L1, nous avons réussi à radiomarquer l'anti-PDL1 avec une PRC > 95% et un rendement de marquage de 55%. Les tests *in vitro* ont révélé un KD de 5,4 nM et un IR de 96%, validant l'intégrité du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1.

À l'aide de l'administration du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1, nous avons été en mesure de cibler spécifiquement l'expression de PD-L1 chez la souris CPNPC. L'application de la modélisation pharmacocinétique a permis de déterminer les paramètres clés au niveau des organes et de les extrapolier, à l'aide d'équations allométriques chez l'homme pour estimer une dosimétrie de 132 µSv/MBq. Cette dosimétrie élevée présente un frein majeur à l'utilisation en clinique du traceur et nécessite des optimisations afin de la diminuer.

La mise en place d'un modèle PK multi-compartimental nous a permis de décrire la biodistribution du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 chez la souris CPNPC et de prédire un meilleur temps d'imagerie basé sur le SNB. Le meilleur temps d'imagerie serait estimé à 125h après l'injection du [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1.

Enfin, il serait intéressant d'évaluer l'expression de TIM-3 à l'aide d'un anti-TIM3 radiomarqué au zirconium-89 afin de proposer un outil diagnostic d'échappement thérapeutique sous immunothérapie.

Références bibliographiques

- [1] S. L. Topalian *et al.*, « Five-Year Survival and Correlates Among Patients With Advanced Melanoma, Renal Cell Carcinoma, or Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Nivolumab », *JAMA Oncol.*, vol. 5, n° 10, p. 1411-1420, oct. 2019, doi: 10.1001/jamaoncol.2019.2187.
- [2] R. S. Herbst, D. Morgensztern, et C. Boshoff, « The biology and management of non-small cell lung cancer », *Nature*, vol. 553, n° 7689, p. 446-454, janv. 2018, doi: 10.1038/nature25183.
- [3] M. Onaitis et J. Hanna, « Cell of origin of lung cancer », *J. Carcinog.*, vol. 12, n° 1, p. 6, 2013, doi: 10.4103/1477-3163.109033.
- [4] K. D. Sutherland et A. Berns, « Cell of origin of lung cancer », *Mol. Oncol.*, vol. 4, n° 5, p. 397-403, oct. 2010, doi: 10.1016/j.molonc.2010.05.002.
- [5] R. Govindan *et al.*, « Changing Epidemiology of Small-Cell Lung Cancer in the United States Over the Last 30 Years: Analysis of the Surveillance, Epidemiologic, and End Results Database », *J. Clin. Oncol.*, vol. 24, n° 28, p. 4539-4544, oct. 2006, doi: 10.1200/JCO.2005.04.4859.
- [6] J. Polański, M. Chabowski, B. Jankowska-Polańska, D. Janczak, et J. Rosinczuk, « Histological subtype of lung cancer affects acceptance of illness, severity of pain, and quality of life », *J. Pain Res.*, vol. Volume 11, p. 727-733, avr. 2018, doi: 10.2147/JPR.S155121.
- [7] J.-P. Sculier, « Nonsmall cell lung cancer », *Eur. Respir. Rev.*, vol. 22, n° 127, p. 33-36, mars 2013, doi: 10.1183/09059180.00007012.
- [8] K. Inamura, « Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification », *Front. Oncol.*, vol. 7, p. 193, août 2017, doi: 10.3389/fonc.2017.00193.
- [9] « Cancer du Poumon non à petites-cellules - Guide pour les patients. ESMO ».
- [10] P. C. Hoffman, A. M. Mauer, et E. E. Vokes, « Lung cancer. », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 355, n° 9202, p. 479-485, févr. 2000, doi: 10.1016/S0140-6736(00)82038-3.
- [11] L. M. Solis *et al.*, « Histologic patterns and molecular characteristics of lung adenocarcinoma associated with clinical outcome », *Cancer*, vol. 118, n° 11, p. 2889-2899, juin 2012, doi: 10.1002/cncr.26584.
- [12] C. Fillmore Brainson et C. F. Kim, « Lung Cancer Stem Cells », in *Cancer Stem Cells*, Elsevier, 2016, p. 149-175. doi: 10.1016/B978-0-12-803892-5.00006-1.
- [13] M. D'Arcangelo et F. Cappuzzo, « K-Ras Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: Prognostic and Predictive Value », *ISRN Mol. Biol.*, vol. 2012, p. 1-8, 2012, doi: 10.5402/2012/837306.
- [14] I. Rouquette-Lassalle, « SYMPOSIUM Actualités en pathologie pulmonaire tumorale », p. 7, 2015.
- [15] P. Goldstraw *et al.*, « The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer », *J. Thorac. Oncol.*, vol. 11, n° 1, p. 39-51, janv. 2016, doi: 10.1016/j.jtho.2015.09.009.
- [16] S. S. Hecht, « Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, n° 10, p. 733-744, déc. 2003, doi: 10.1038/nrc1190.
- [17] C. I. Amos, W. Xu, et M. R. Spitz, « Is There a Genetic Basis for Lung Cancer Susceptibility? », in *Chemoprevention of Cancer*, vol. 151, H.-J. Senn, A. Costa, et V. C. Jordan, Éd. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999, p. 3-12. doi: 10.1007/978-3-642-59945-3_1.
- [18] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « Hallmarks of Cancer: The Next Generation », *Cell*, vol. 144, n° 5, p. 646-674, mars 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Références bibliographiques

- [19] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « The Hallmarks of Cancer », *Cell*, vol. 100, n° 1, p. 57-70, janv. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [20] E. K. Rowinsky, « The erbB Family: Targets for Therapeutic Development Against Cancer and Therapeutic Strategies Using Monoclonal Antibodies and Tyrosine Kinase Inhibitors », *Annu. Rev. Med.*, vol. 55, n° 1, p. 433-457, févr. 2004, doi: 10.1146/annurev.med.55.091902.104433.
- [21] Y. Sekido, K. M. Fong, et J. D. Minna, « Molecular Genetics of Lung Cancer », *Annu. Rev. Med.*, vol. 54, n° 1, p. 73-87, févr. 2003, doi: 10.1146/annurev.med.54.101601.152202.
- [22] W. A. Franklin, R. Veve, F. R. Hirsch, B. A. Helfrich, et P. A. Bunn, « Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy », *Semin. Oncol.*, vol. 29, n° 1, p. 3-14, févr. 2002, doi: 10.1053/sonc.2002.31520.
- [23] H. Shigematsu et A. F. Gazdar, « Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signalling pathway in lung cancers », *Int. J. Cancer*, vol. 118, n° 2, p. 257-262, janv. 2006, doi: 10.1002/ijc.21496.
- [24] J. Downward, « Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, n° 1, p. 11-22, janv. 2003, doi: 10.1038/nrc969.
- [25] S. Rodenhuis *et al.*, « Incidence and Possible Clinical Significance of K-ras Oncogene Activation in Adenocarcinoma of the Human Lung », p. 4.
- [26] Y. Samuels, « High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers », *Science*, vol. 304, n° 5670, p. 554-554, avr. 2004, doi: 10.1126/science.1096502.
- [27] T. Saijo *et al.*, « Eg5 expression is closely correlated with the response of advanced non-small cell lung cancer to antimitotic agents combined with platinum chemotherapy », *Lung Cancer*, vol. 54, n° 2, p. 217-225, nov. 2006, doi: 10.1016/j.lungcan.2006.06.018.
- [28] I. Vivanco et C. L. Sawyers, « The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, n° 7, p. 489-501, juill. 2002, doi: 10.1038/nrc839.
- [29] K. H. Vousden et X. Lu, « Live or let die: the cell's response to p53 », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, n° 8, p. 594-604, août 2002, doi: 10.1038/nrc864.
- [30] D. L. Gibbons, L. A. Byers, et J. M. Kurie, « Smoking, p53 Mutation, and Lung Cancer », *Mol. Cancer Res.*, vol. 12, n° 1, p. 3-13, janv. 2014, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0539.
- [31] The Cancer Genome Atlas Research Network, « Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers », *Nature*, vol. 489, n° 7417, p. 519-525, sept. 2012, doi: 10.1038/nature11404.
- [32] L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, et A. Jemal, « Global cancer statistics, 2012: Global Cancer Statistics, 2012 », *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 65, n° 2, p. 87-108, mars 2015, doi: 10.3322/caac.21262.
- [33] A. Jemal *et al.*, « Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2005, Featuring Trends in Lung Cancer, Tobacco Use, and Tobacco Control », *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 100, n° 23, p. 1672-1694, déc. 2008, doi: 10.1093/jnci/djn389.
- [34] J. Ferlay *et al.*, « Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012 », *Int. J. Cancer*, vol. 136, n° 5, p. E359-E386, mars 2015, doi: 10.1002/ijc.29210.
- [35] L. A. Torre, R. L. Siegel, et A. Jemal, « Lung Cancer Statistics », in *Lung Cancer and Personalized Medicine*, vol. 893, A. Ahmad et S. Gadgeel, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2016, p. 1-19. doi: 10.1007/978-3-319-24223-1_1.
- [36] D. R. Youlden, S. M. Cramb, et P. D. Baade, « The International Epidemiology of Lung Cancer: Geographical Distribution and Secular Trends », *J. Thorac. Oncol.*, vol. 3, n° 8, p. 819-831, août 2008, doi: 10.1097/JTO.0b013e31818020eb.

Références bibliographiques

- [37] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, et A. Jemal, « Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries », *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, n° 6, p. 394-424, nov. 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [38] « Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 – Tumeurs solides », p. 372.
- [39] E. Quoix et E. Lemarié, « Épidémiologie du cancer bronchique primitif: aspects classiques et nouveautés », *Rev. Mal. Respir.*, vol. 28, n° 8, p. 1048-1058, oct. 2011, doi: 10.1016/j.rmr.2010.12.015.
- [40] D. M. Jackman et B. E. Johnson, « Small-cell lung cancer. », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 366, n° 9494, p. 1385-1396, oct. 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)67569-1.
- [41] C. J. Beadsmoore et N. J. Screaton, « Classification, staging and prognosis of lung cancer », *Eur. J. Radiol.*, vol. 45, n° 1, p. 8-17, janv. 2003, doi: 10.1016/S0720-048X(02)00287-5.
- [42] H. Sakurai, H. Asamura, S. Watanabe, K. Suzuki, et R. Tsuchiya, « Clinicopathologic features of peripheral squamous cell carcinoma of the lung », *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 78, n° 1, p. 222-227, juill. 2004, doi: 10.1016/j.athoracsur.2004.01.029.
- [43] D. Planchard, Y. Loriot, A. Goubar, F. Commo, et J.-C. Soria, « Differential Expression of Biomarkers in Men and Women », *Semin. Oncol.*, vol. 36, n° 6, p. 553-565, déc. 2009, doi: 10.1053/j.seminoncol.2009.09.004.
- [44] J. D. Patel, « Lung Cancer in Women », *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, n° 14, p. 3212-3218, mai 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.11.486.
- [45] S. Kligerman et C. White, « Epidemiology of Lung Cancer in Women: Risk Factors, Survival, and Screening », *Am. J. Roentgenol.*, vol. 196, n° 2, p. 287-295, févr. 2011, doi: 10.2214/AJR.10.5412.
- [46] C. Allemani *et al.*, « Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries », *The Lancet*, vol. 391, n° 10125, p. 1023-1075, mars 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
- [47] « SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2014 », *Howlader N Noone AM Krapcho M Mill. Bish. K Kosary CL Yu M Ruhl J Tatalovich Z Mariotto Lewis DR Chen HS Feuer EJ Cronin KA Eds SEER Cancer Stat. Rev. 1975-2014 Natl. Cancer Inst. Bethesda MD Httpsseercancergovcsr19752014 Based Novemb. 2016 SEER Data Submiss. Posted SEER Web Site April 2017.*
- [48] R. D. Neal, F. Sun, J. D. Emery, et M. E. Callister, « Lung cancer », *BMJ*, p. l1725, juin 2019, doi: 10.1136/bmj.l1725.
- [49] S. G. Spiro et G. A. Silvestri, « One Hundred Years of Lung Cancer », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 172, n° 5, p. 523-529, sept. 2005, doi: 10.1164/rccm.200504-531OE.
- [50] I. Maghfoor et M. C. Perry, « Lung Cancer », *Ann. Saudi Med.*, vol. 25, n° 1, p. 1-12, janv. 2005, doi: 10.5144/0256-4947.2005.1.
- [51] M. A. Beckles, S. G. Spiro, G. L. Colice, et R. M. Rudd, « Initial Evaluation of the Patient With Lung Cancer* », *Chest*, vol. 123, n° 1, p. 97S-104S, janv. 2003, doi: 10.1378/chest.123.1_suppl.97S.
- [52] « Pretreatment Evaluation of Non-Small-cell Lung Cancer », vol. 156, p. 13, 1997.
- [53] G. Buccheri, « Lung cancer: clinical presentation and specialist referral time », *Eur. Respir. J.*, vol. 24, n° 6, p. 898-904, déc. 2004, doi: 10.1183/09031936.04.00113603.
- [54] N. C. Purandare et V. Rangarajan, « Imaging of lung cancer: Implications on staging and management », *Indian J. Radiol. Imaging*, vol. 25, n° 02, p. 109-120, avr. 2015, doi: 10.4103/0971-3026.155831.

Références bibliographiques

- [55] G. Ferretti, A. Jankowski, A. Calizzano, D. Moro-Sibilot, et J. P. Vuillez, « Imagerie radiologique et TEP Scanner dans les cancers du poumon », *J. Radiol.*, vol. 89, n° 3, p. 387-402, mars 2008, doi: 10.1016/S0221-0363(08)89016-6.
- [56] « Standards, Options et Recommandations pour le traitement péri-opératoire des patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules résécable d'emblée, opérables (mise à jour) », *Rev. Mal. Respir.*, vol. 24, n° 8, Part 1, p. 1050-1064, oct. 2007, doi: 10.1016/S0761-8425(07)92769-2.
- [57] A. Kandathil, F. U. Kay, Y. M. Butt, J. W. Wachsmann, et R. M. Subramaniam, « Role of FDG PET/CT in the Eighth Edition of TNM Staging of Non-Small Cell Lung Cancer », *RadioGraphics*, vol. 38, n° 7, p. 2134-2149, nov. 2018, doi: 10.1148/rg.2018180060.
- [58] F. R. Hirsch *et al.*, « Lung cancer: current therapies and new targeted treatments », *The Lancet*, vol. 389, n° 10066, p. 299-311, janv. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)30958-8.
- [59] N. Hanna *et al.*, « Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update », *BOTTOM LINE*, p. 34.
- [60] S. S. Ramalingam *et al.*, « Pemetrexed, Bevacizumab, or the Combination As Maintenance Therapy for Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer: ECOG-ACRIN 5508 », *J. Clin. Oncol.*, vol. 37, n° 26, p. 2360-2367, sept. 2019, doi: 10.1200/JCO.19.01006.
- [61] M. G. Kris *et al.*, « Using Multiplexed Assays of Oncogenic Drivers in Lung Cancers to Select Targeted Drugs », *JAMA*, vol. 311, n° 19, p. 1998, mai 2014, doi: 10.1001/jama.2014.3741.
- [62] M. G. Kris *et al.*, « Efficacy of Gefitinib, an Inhibitor of the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase, in Symptomatic Patients With Non-Small Cell Lung CancerA Randomized Trial », *JAMA*, vol. 290, n° 16, p. 2149-2158, oct. 2003, doi: 10.1001/jama.290.16.2149.
- [63] T. S. Mok *et al.*, « Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, n° 10, p. 947-957, sept. 2009, doi: 10.1056/NEJMoa0810699.
- [64] K. (Kenneth M.) Murphy et C. Weaver, *Janeway's immunobiology*, Ninth edition. New York, NY, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2017.
- [65] J. C. Sun et L. L. Lanier, « Natural killer cells remember: An evolutionary bridge between innate and adaptive immunity?: Highlights », *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, n° 8, p. 2059-2064, août 2009, doi: 10.1002/eji.200939435.
- [66] M.-L. Alegre, K. A. Frauwirth, et C. B. Thompson, « T-cell regulation by CD28 and CTLA-4 », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 1, n° 3, p. 220-228, déc. 2001, doi: 10.1038/35105024.
- [67] T. Lindstein, C. H. June, J. A. Ledbetter, G. Stella, et C. B. Thompson, « Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. », *Science*, vol. 244, n° 4902, p. 339-343, avr. 1989, doi: 10.1126/science.2540528.
- [68] D. J. Lenschow, T. L. Walunas, et J. A. Bluestone, « CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 14, n° 1, p. 233-258, avr. 1996, doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.233.
- [69] L. H. Boise *et al.*, « bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. », *Cell*, vol. 74, n° 4, p. 597-608, août 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90508-n.
- [70] G. Suntharalingam *et al.*, « Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. », *N. Engl. J. Med.*, vol. 355, n° 10, p. 1018-1028, sept. 2006, doi: 10.1056/NEJMoa063842.

Références bibliographiques

- [71] P. S. Linsley et P. Golstein, « Lymphocyte activation: T-cell regulation by CTLA-4. », *Curr. Biol. CB*, vol. 6, n° 4, p. 398-400, avr. 1996, doi: 10.1016/s0960-9822(02)00506-7.
- [72] Y. Agata *et al.*, « Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes », *Int. Immunol.*, vol. 8, n° 5, p. 765-772, 1996, doi: 10.1093/intimm/8.5.765.
- [73] H. Dong *et al.*, « Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion », *Nat. Med.*, vol. 8, n° 8, p. 793-800, août 2002, doi: 10.1038/nm730.
- [74] J. M. Taube *et al.*, « Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. », *Sci. Transl. Med.*, vol. 4, n° 127, p. 127ra37, mars 2012, doi: 10.1126/scitranslmed.3003689.
- [75] Y. Han, D. Liu, et L. Li, « PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer », p. 16.
- [76] K. C. Ohaegbulam, A. Assal, E. Lazar-Molnar, Y. Yao, et X. Zang, « Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. », *Trends Mol. Med.*, vol. 21, n° 1, p. 24-33, janv. 2015, doi: 10.1016/j.molmed.2014.10.009.
- [77] F. Tang et P. Zheng, « Tumor cells versus host immune cells: whose PD-L1 contributes to PD-1/PD-L1 blockade mediated cancer immunotherapy? », *Cell Biosci.*, vol. 8, p. 34, mai 2018, doi: 10.1186/s13578-018-0232-4.
- [78] H. R. Kim *et al.*, « PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients », *Sci. Rep.*, vol. 6, n° 1, p. 36956, nov. 2016, doi: 10.1038/srep36956.
- [79] C. Rolfo *et al.*, « Immunotherapy in NSCLC: A Promising and Revolutionary Weapon », in *Immunotherapy*, vol. 995, A. Naing et J. Hajjar, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2017, p. 97-125. doi: 10.1007/978-3-319-53156-4_5.
- [80] S. Oomizu *et al.*, « Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner », *Clin. Immunol.*, vol. 143, n° 1, p. 51-58, avr. 2012, doi: 10.1016/j.clim.2012.01.004.
- [81] C. Granier *et al.*, « Tim-3 Expression on Tumor-Infiltrating PD-1⁺ CD8⁺ T Cells Correlates with Poor Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma », *Cancer Res.*, vol. 77, n° 5, p. 1075-1082, mars 2017, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0274.
- [82] K. Sakuishi *et al.*, « TIM3⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer », *OncoImmunology*, vol. 2, n° 4, p. e23849, avr. 2013, doi: 10.4161/onci.23849.
- [83] Y. Wolf, A. C. Anderson, et V. K. Kuchroo, « TIM3 comes of age as an inhibitory receptor », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, n° 3, p. 173-185, mars 2020, doi: 10.1038/s41577-019-0224-6.
- [84] A. Murtaza *et al.*, « Discovery of TSR-022, a novel, potent anti-human TIM-3 therapeutic antibody », 2016, doi: 10.1016/S0959-8049(16)32903-3.
- [85] F. S. Hodi *et al.*, « Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, n° 8, p. 711-723, août 2010, doi: 10.1056/NEJMoa1003466.
- [86] W. Zou et L. Chen, « Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, n° 6, p. 467-477, juin 2008, doi: 10.1038/nri2326.
- [87] J. Konishi, K. Yamazaki, M. Azuma, I. Kinoshita, H. Dosaka-Akita, et M. Nishimura, « B7-H1 Expression on Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Its Relationship with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their PD-1 Expression », *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, n° 15, p. 5094-5100, août 2004, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0428.

Références bibliographiques

- [88] J. Cai, D. Wang, G. Zhang, et X. Guo, « The Role Of PD-1/PD-L1 Axis In Treg Development And Function: Implications For Cancer Immunotherapy », *OncoTargets Ther.*, vol. 12, p. 8437-8445, oct. 2019, doi: 10.2147/OTT.S221340.
- [89] S. L. Topalian *et al.*, « Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, n° 26, p. 2443-2454, juin 2012, doi: 10.1056/NEJMoa1200690.
- [90] K. E. Pauken et E. J. Wherry, « Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer », *Trends Immunol.*, vol. 36, n° 4, p. 265-276, avr. 2015, doi: 10.1016/j.it.2015.02.008.
- [91] J. M. Chinai, M. Janakiram, F. Chen, W. Chen, M. Kaplan, et X. Zang, « New immunotherapies targeting the PD-1 pathway », *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 36, n° 9, p. 587-595, sept. 2015, doi: 10.1016/j.tips.2015.06.005.
- [92] M. Reck *et al.*, « Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 375, n° 19, p. 1823-1833, nov. 2016, doi: 10.1056/NEJMoa1606774.
- [93] Y. G. Najjar et J. M. Kirkwood, « Pembrolizumab: Pharmacology and Therapeutics Review », *Pharmacol. Ther.*, vol. 10, n° 5, p. 3.
- [94] E. B. Garon *et al.*, « Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, n° 21, p. 2018-2028, mai 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1501824.
- [95] R. Hui *et al.*, « Long-term OS for patients with advanced NSCLC enrolled in the KEYNOTE-001 study of pembrolizumab (pembro). », *J. Clin. Oncol.*, vol. 34, n° 15_suppl, p. 9026-9026, mai 2016, doi: 10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.9026.
- [96] S. M. Lim, M. H. Hong, et H. R. Kim, « Immunotherapy for Non-small Cell Lung Cancer: Current Landscape and Future Perspectives », *Immune Netw.*, vol. 20, n° 1, p. e10, 2020, doi: 10.4110/in.2020.20.e10.
- [97] J. Christiansen et A. K. Rajasekaran, « Biological impediments to monoclonal antibody-based cancer immunotherapy », *Mol Cancer Ther*, p. 10, 2004.
- [98] G. Vidarsson, G. Dekkers, et T. Rispens, « IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions », *Front. Immunol.*, vol. 5, p. 520, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
- [99] A. P. L. Mb, G. Singh, et C. P. Mrcp, « Therapeutic monoclonal antibodies in oncology », vol. 98, p. 7, 2005.
- [100] M. Suzuki, C. Kato, et A. Kato, « Therapeutic antibodies: their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies », *J. Toxicol. Pathol.*, vol. 28, n° 3, p. 133-139, 2015, doi: 10.1293/tox.2015-0031.
- [101] F. Cavallo, R. A. Calogero, et G. Forni, « Are oncoantigens suitable targets for anti-tumour therapy? », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, n° 9, p. 707-713, sept. 2007, doi: 10.1038/nrc2208.
- [102] I. Zafir-Lavie, Y. Michaeli, et Y. Reiter, « Novel antibodies as anticancer agents. », *Oncogene*, vol. 26, n° 25, p. 3714-3733, mai 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210372.
- [103] M. A. Socinski *et al.*, « Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC », *N. Engl. J. Med.*, vol. 378, n° 24, p. 2288-2301, juin 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1716948.
- [104] H. West *et al.*, « Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial », *Lancet Oncol.*, vol. 20, n° 7, p. 924-937, juill. 2019, doi: 10.1016/S1470-2045(19)30167-6.

Références bibliographiques

- [105] L. Paz-Ares *et al.*, « Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 379, n° 21, p. 2040-2051, nov. 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1810865.
- [106] L. Gandhi *et al.*, « Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 378, n° 22, p. 2078-2092, mai 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1801005.
- [107] M. Reck *et al.*, « Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater », *J. Clin. Oncol.*, vol. 37, n° 7, p. 537-546, mars 2019, doi: 10.1200/JCO.18.00149.
- [108] F. Wang, S. Wang, et Q. Zhou, « The Resistance Mechanisms of Lung Cancer Immunotherapy », *Front. Oncol.*, vol. 10, p. 568059, oct. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.568059.
- [109] P. Sharma, S. Hu-Lieskov, J. A. Wargo, et A. Ribas, « Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy », *Cell*, vol. 168, n° 4, p. 707-723, févr. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017.
- [110] L. C. Plataniatis, « Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, n° 5, p. 375-386, mai 2005, doi: 10.1038/nri1604.
- [111] J. L. Bencic *et al.*, « Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade », *Cell*, vol. 167, n° 6, p. 1540-1554.e12, déc. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.11.022.
- [112] M. M. Gubin *et al.*, « Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens », *Nature*, vol. 515, n° 7528, p. 577-581, nov. 2014, doi: 10.1038/nature13988.
- [113] F. M. Marincola, E. M. Jaffee, D. J. Hicklin, et S. Ferrone, « Escape of Human Solid Tumors from T-Cell Recognition: Molecular Mechanisms and Functional Significance », in *Advances in Immunology*, vol. 74, F. J. Dixon, Éd. Academic Press, 1999, p. 181-273. doi: 10.1016/S0065-2776(08)60911-6.
- [114] A. Sucker *et al.*, « Genetic Evolution of T-cell Resistance in the Course of Melanoma Progression », *Clin. Cancer Res.*, vol. 20, n° 24, p. 6593-6604, déc. 2014, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0567.
- [115] J. Schachter *et al.*, « Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006) », *The Lancet*, vol. 390, n° 10105, p. 1853-1862, oct. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(17)31601-X.
- [116] C. M. Fares, E. M. Van Allen, C. G. Drake, J. P. Allison, et S. Hu-Lieskov, « Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade: Why Does Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Not Work for All Patients? », *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book*, n° 39, p. 147-164, mai 2019, doi: 10.1200/EDBK_240837.
- [117] Y. K. Chae, M. S. Oh, et F. J. Giles, « Molecular Biomarkers of Primary and Acquired Resistance to T-Cell-Mediated Immunotherapy in Cancer: Landscape, Clinical Implications, and Future Directions », *The Oncologist*, vol. 23, n° 4, p. 410-421, avr. 2018, doi: 10.1634/theoncologist.2017-0354.
- [118] N. A. Rizvi *et al.*, « Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer », *Science*, vol. 348, n° 6230, p. 124-128, avr. 2015, doi: 10.1126/science.aaa1348.
- [119] H. Rizvi *et al.*, « Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing », *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, n° 7, p. 633-641, mars 2018, doi: 10.1200/JCO.2017.75.3384.

Références bibliographiques

- [120] N. McGranahan *et al.*, « Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade », *Science*, vol. 351, n° 6280, p. 1463-1469, mars 2016, doi: 10.1126/science.aaf1490.
- [121] B. Meléndez, C. Van Campenhout, S. Rorive, M. Remmeliink, I. Salmon, et N. D'Haene, « Methods of measurement for tumor mutational burden in tumor tissue », *Transl. Lung Cancer Res.*, vol. 7, n° 5, p. 661-667, déc. 2018, doi: 10.21037/tlcr.2018.08.02.
- [122] Y. Owada-Ozaki *et al.*, « Prognostic Impact of Tumor Mutation Burden in Patients With Completely Resected Non-Small Cell Lung Cancer: Brief Report », *J. Thorac. Oncol.*, vol. 13, n° 8, p. 1217-1221, août 2018, doi: 10.1016/j.jtho.2018.04.003.
- [123] J. Zhang, Y. Yan, J. Li, R. Adhikari, et L. Fu, « PD-1/PD-L1 Based Combinational Cancer Therapy: Icing on the Cake », *Front. Pharmacol.*, vol. 11, p. 722, mai 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00722.
- [124] B. Chen *et al.*, « Prognostic value of the common tumour-infiltrating lymphocyte subtypes for patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis », *PLoS ONE*, vol. 15, n° 11, p. e0242173, nov. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0242173.
- [125] T. F. Gajewski, H. Schreiber, et Y.-X. Fu, « Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment », *Nat. Immunol.*, vol. 14, n° 10, p. 1014-1022, oct. 2013, doi: 10.1038/ni.2703.
- [126] H.-J. Kim et H. Cantor, « CD4 T-cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful », *Cancer Immunol. Res.*, vol. 2, n° 2, p. 91-98, févr. 2014, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0216.
- [127] J. Galon et D. Bruni, « Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 18, n° 3, p. 197-218, mars 2019, doi: 10.1038/s41573-018-0007-y.
- [128] B. Huard, M. Tournier, T. Hercend, F. Triebel, et F. Faure, « Lymphocyte-activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4+ T lymphocytes », *Eur. J. Immunol.*, vol. 24, n° 12, p. 3216-3221, déc. 1994, doi: 10.1002/eji.1830241246.
- [129] T. Okazaki *et al.*, « PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice », *J. Exp. Med.*, vol. 208, n° 2, p. 395-407, févr. 2011, doi: 10.1084/jem.20100466.
- [130] S. Koyama *et al.*, « Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints », *Nat. Commun.*, vol. 7, n° 1, p. 10501, déc. 2016, doi: 10.1038/ncomms10501.
- [131] J. Fourcade *et al.*, « PD-1 and Tim-3 Regulate the Expansion of Tumor Antigen-Specific CD8⁺ T Cells Induced by Melanoma Vaccines », *Cancer Res.*, vol. 74, n° 4, p. 1045-1055, févr. 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2908.
- [132] Y. He, J. Cao, C. Zhao, X. Li, C. Zhou, et F. Hirsch, « TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy », *OncoTargets Ther.*, vol. Volume 11, p. 7005-7009, oct. 2018, doi: 10.2147/OTT.S170385.
- [133] K. Sakuishi, L. Apetoh, J. M. Sullivan, B. R. Blazar, V. K. Kuchroo, et A. C. Anderson, « Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity », *J. Exp. Med.*, vol. 207, n° 10, p. 2187-2194, sept. 2010, doi: 10.1084/jem.20100643.
- [134] FDA, « In vitro companion diagnostic devices - Guidance for industry and Food and Drug Administration Staff », FDA, USA, août 2014. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/media/81309/download>
- [135] J. Jørgensen et H. Winther, « The Development of the HercepTest - From Bench to Bedside », 2010, p. 43-60. doi: 10.1201/9780429066504-3.

Références bibliographiques

- [136] D. J. Slamon *et al.*, « Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2 », *N. Engl. J. Med.*, vol. 344, n° 11, p. 783-792, mars 2001, doi: 10.1056/NEJM200103153441101.
- [137] A. T. Shaw *et al.*, « Ceritinib in ALK -Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, n° 13, p. 1189-1197, mars 2014, doi: 10.1056/NEJMoa1311107.
- [138] E. L. Kwak *et al.*, « Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, n° 18, p. 1693-1703, oct. 2010, doi: 10.1056/NEJMoa1006448.
- [139] R. Van Heertum, R. Scarimbolo, R. Ford, E. Berdugo, et J. M. O'Neal, « Companion diagnostics and molecular imaging-enhanced approaches for oncology clinical trials », *Drug Des. Devel. Ther.*, p. 5215, sept. 2015, doi: 10.2147/DDDT.S87561.
- [140] D. A. Mankoff, « A Definition of Molecular Imaging », *J. Nucl. Med.*, vol. 48, n° 6, p. 18N, juin 2007, [En ligne]. Disponible sur: <http://jnm.snmjournals.org/content/48/6/18N.abstract>
- [141] G. Omami, D. Tamimi, et B. F. Branstetter, « Basic principles and applications of 18F-FDG-PET/CT in oral and maxillofacial imaging: A pictorial essay », p. 8.
- [142] Société Française de Médecine Nucléaire et Imagerie Moléculaire (SFMN), « Guide pour la rédaction de protocoles pour la Tomographie par Emission de Positions (TEP) au [18F]-Fluorodésoxyglucose (18F-FDG) en Oncologie », oct. 2016. [En ligne]. Disponible sur: www.sfmn.org
- [143] P. Mergenthaler, U. Lindauer, G. A. Dienel, et A. Meisel, « Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function », *Trends Neurosci.*, vol. 36, n° 10, p. 587-597, oct. 2013, doi: 10.1016/j.tins.2013.07.001.
- [144] M. P. Bordone *et al.*, « The energetic brain – A review from students to students », *J. Neurochem.*, vol. 151, n° 2, p. 139-165, 2019, doi: 10.1111/jnc.14829.
- [145] F. Bensch *et al.*, « 89Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer », *Nat. Med.*, vol. 24, n° 12, p. 1852-1858, déc. 2018, doi: 10.1038/s41591-018-0255-8.
- [146] A. V. Balar *et al.*, « Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial », *The Lancet*, vol. 389, n° 10064, p. 67-76, janv. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)32455-2.
- [147] J. A. Rehman *et al.*, « Quantitative and pathologist-read comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer », *Mod. Pathol.*, vol. 30, n° 3, p. 340-349, mars 2017, doi: 10.1038/modpathol.2016.186.
- [148] T. J. Gniadek, Q. K. Li, E. Tully, S. Chatterjee, S. Nimmagadda, et E. Gabrielson, « Heterogeneous expression of PD-L1 in pulmonary squamous cell carcinoma and adenocarcinoma: implications for assessment by small biopsy », *Mod. Pathol.*, vol. 30, n° 4, p. 530-538, avr. 2017, doi: 10.1038/modpathol.2016.213.
- [149] M. F. Sanmamed et L. Chen, « Inducible Expression of B7-H1 (PD-L1) and Its Selective Role in Tumor Site Immune Modulation », *Cancer J.*, vol. 20, n° 4, p. 256-261, juill. 2014, doi: 10.1097/PPO.0000000000000061.
- [150] E. S. Ward, « Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans », *Int. Immunol.*, vol. 15, n° 2, p. 187-195, févr. 2003, doi: 10.1093/intimm/dxg018.
- [151] W. Wei, Z. T. Rosenkrans, J. Liu, G. Huang, Q.-Y. Luo, et W. Cai, « ImmunoPET: Concept, Design, and Applications », *Chem. Rev.*, vol. 120, n° 8, p. 3787-3851, avr. 2020, doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00738.

Références bibliographiques

- [152] S. I. Rudnick *et al.*, « Influence of Affinity and Antigen Internalization on the Uptake and Penetration of Anti-HER2 Antibodies in Solid Tumors », *Cancer Res.*, vol. 71, n° 6, p. 2250-2259, mars 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2277.
- [153] C. P. Graff et K. D. Wittrup, « Theoretical Analysis of Antibody Targeting of Tumor Spheroids: Importance of Dosage for Penetration, and Affinity for Retention », p. 10.
- [154] G. M. Thurber, M. M. Schmidt, et K. D. Wittrup, « Antibody tumor penetration: Transport opposed by systemic and antigen-mediated clearance », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, n° 12, p. 1421-1434, sept. 2008, doi: 10.1016/j.addr.2008.04.012.
- [155] K. D. Wittrup, G. M. Thurber, M. M. Schmidt, et J. J. Rhoden, « Practical Theoretic Guidance for the Design of Tumor-Targeting Agents », in *Methods in Enzymology*, vol. 503, Elsevier, 2012, p. 255-268. doi: 10.1016/B978-0-12-396962-0.00010-0.
- [156] L. M. Carter, S. Poty, S. K. Sharma, et J. S. Lewis, « Preclinical optimization of antibody-based radiopharmaceuticals for cancer imaging and radionuclide therapy-Model, vector, and radionuclide selection », *J. Label. Compd. Radiopharm.*, vol. 61, n° 9, p. 611-635, juill. 2018, doi: 10.1002/jlcr.3612.
- [157] Y. Zhang, H. Hong, et W. Cai, « PET Tracers Based on Zirconium-89 », *Curr. Radiopharm.*, vol. 4, n° 2, p. 131-139, avr. 2011, doi: 10.2174/1874471011104020131.
- [158] F. T. Lee et A. M. Scott, « Immuno-PET for tumor targeting. », *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 44, n° 8, p. 1282-1283, août 2003.
- [159] C. J. Anderson et R. Ferdani, « Copper-64 Radiopharmaceuticals for PET Imaging of Cancer: Advances in Preclinical and Clinical Research », *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 24, n° 4, p. 379-393, août 2009, doi: 10.1089/cbr.2009.0674.
- [160] D. W. McCarthy *et al.*, « Efficient production of high specific activity ^{64}Cu using a biomedical cyclotron », *Nucl. Med. Biol.*, vol. 24, n° 1, p. 35-43, janv. 1997, doi: 10.1016/S0969-8051(96)00157-6.
- [161] T. T. Pham *et al.*, « Iodine-124 Based Dual Positron Emission Tomography and Fluorescent Labeling Reagents for *In Vivo* Cell Tracking », *Bioconjug. Chem.*, vol. 31, n° 4, p. 1107-1116, avr. 2020, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00799.
- [162] K. Kumar et A. Ghosh, « ^{18}F -AlF Labeled Peptide and Protein Conjugates as Positron Emission Tomography Imaging Pharmaceuticals », *Bioconjug. Chem.*, vol. 29, n° 4, p. 953-975, avr. 2018, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00817.
- [163] M. A. Bakir *et al.*, « c-erbB2 protein overexpression in breast cancer as a target for PET using iodine-124-labeled monoclonal antibodies », *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 33, n° 12, p. 2154-2160, déc. 1992.
- [164] W. E. Bolch, K. F. Eckerman, G. Sgouros, et S. R. Thomas, « MIRD Pamphlet No. 21: A Generalized Schema for Radiopharmaceutical Dosimetry—Standardization of Nomenclature », *J. Nucl. Med.*, vol. 50, n° 3, p. 477-484, mars 2009, doi: 10.2967/jnumed.108.056036.
- [165] « Recommandations 2007 de la commission internationale de protection radiologique (ICPR) - Publication 103 de la CIPR », 2009. [En ligne]. Disponible sur: https://www.icrp.org/docs/P103_French.pdf
- [166] N. F. Abu Bakar, S. Amira Othman, N. F. Amirah Nor Azman, et N. Saqinah Jasrin, « Effect of ionizing radiation towards human health: A review », *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 268, p. 012005, juill. 2019, doi: 10.1088/1755-1315/268/1/012005.
- [167] L.-J. Wu *et al.*, « Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, n° 9, p. 4959-4964, avr. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.9.4959.
- [168] L. H. Thompson et H. D. Suit, « Proliferation Kinetics of X-irradiated Mouse L Cells Studied with Time-lapse Photography. II », *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, vol. 15, n° 4, p. 347-362, janv. 1969, doi: 10.1080/09553006914550571.

Références bibliographiques

- [169] M. Cristy et K. F. Eckerman, « Specific absorbed fractions of energy at various ages from internal photon sources: 1, Methods », United States, 1987.
- [170] M. Andersson, L. Johansson, K. Eckerman, et S. Mattsson, « IDAC-Dose 2.1, an internal dosimetry program for diagnostic nuclear medicine based on the ICRP adult reference voxel phantoms », *EJNMMI Res.*, vol. 7, n° 1, p. 88, nov. 2017, doi: 10.1186/s13550-017-0339-3.
- [171] J. Charles A Janeway, P. Travers, M. Walport, et M. J. Shlomchik, « The structure of a typical antibody molecule », *Immunobiol. Immune Syst. Health Dis. 5th Ed.*, 2001, Consulté le: 22 novembre 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/>
- [172] M. Pyzik, K. M. K. Sand, J. J. Hubbard, J. T. Andersen, I. Sandlie, et R. S. Blumberg, « The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? », *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 1540, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01540.
- [173] L. Liu, « Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins », *Protein Cell*, vol. 9, n° 1, p. 15-32, janv. 2018, doi: 10.1007/s13238-017-0408-4.
- [174] G. J. Robbie *et al.*, « A Novel Investigational Fc-Modified Humanized Monoclonal Antibody, Motavizumab-YTE, Has an Extended Half-Life in Healthy Adults », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, n° 12, p. 6147-6153, déc. 2013, doi: 10.1128/AAC.01285-13.
- [175] R. Swiercz *et al.*, « Use of Fc-Engineered Antibodies as Clearing Agents to Increase Contrast During PET », *J. Nucl. Med.*, vol. 55, n° 7, p. 1204-1207, juill. 2014, doi: 10.2967/jnumed.113.136481.
- [176] J. T. Ryman et B. Meibohm, « Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies: Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies », *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.*, vol. 6, n° 9, p. 576-588, sept. 2017, doi: 10.1002/psp4.12224.
- [177] Y. Vugmeyster, « Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges », *World J. Biol. Chem.*, vol. 3, n° 4, p. 73, 2012, doi: 10.4331/wjbc.v3.i4.73.
- [178] R. Deng, F. Jin, S. Prabhu, et S. Iyer, « Monoclonal antibodies: what are the pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for drug development? », *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 8, n° 2, p. 141-160, févr. 2012, doi: 10.1517/17425255.2012.643868.
- [179] W. Wang, E. Wang, et J. Balthasar, « Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics », *Clin. Pharmacol.*, vol. 84, n° 5, p. 11, 2008.
- [180] P. M. Glassman et J. P. Balthasar, « Mechanistic considerations for the use of monoclonal antibodies for cancer therapy », vol. 11, n° 1, p. 14, 2014.
- [181] P. A. van Schouwenburg, T. Rispens, et G. J. Wolbink, « Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis », *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 9, n° 3, p. 164-172, mars 2013, doi: 10.1038/nrrheum.2013.4.
- [182] A. S. De Groot et D. W. Scott, « Immunogenicity of protein therapeutics », *Trends Immunol.*, vol. 28, n° 11, p. 482-490, nov. 2007, doi: 10.1016/j.it.2007.07.011.
- [183] K. Bendtzen, « Immunogenicity of Anti-TNF- α Biotherapies: II. Clinical Relevance of Methods Used for Anti-Drug Antibody Detection », *Front. Immunol.*, vol. 6, avr. 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00109.
- [184] E. D. Ehrenpreis, « Pharmacokinetic Effects of Antidrug Antibodies Occurring in Healthy Subjects After a Single Dose of Intravenous Infliximab », *Drugs RD*, vol. 17, n° 4, p. 607-613, déc. 2017, doi: 10.1007/s40268-017-0211-y.
- [185] A. V. Kamath, « Translational pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies », *Drug Discov. Today Technol.*, vol. 21-22, p. 75-83, sept. 2016, doi: 10.1016/j.ddtec.2016.09.004.

Références bibliographiques

- [186] J. Gabrielsson et D. Weiner, « Non-compartmental Analysis », in *Computational Toxicology*, vol. 929, B. Reisfeld et A. N. Mayeno, Éd. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, p. 377-389. doi: 10.1007/978-1-62703-050-2_16.
- [187] « Appendix 1: Mathematical Concepts and the Trapezoidal Method », in *Introduction to Drug Disposition and Pharmacokinetics*, John Wiley & Sons, Ltd, 2016, p. 293-299. doi: 10.1002/9781119261087.app1.
- [188] L. B. Sheiner, B. Rosenberg, et K. L. Melmon, « Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage », *Comput. Biomed. Res.*, vol. 5, n° 5, p. 441-459, oct. 1972, doi: 10.1016/0010-4809(72)90051-1.
- [189] S. Urien, « La pharmacocinétique de population, aspects fondamentaux », vol. 17, p. 6, 2003.
- [190] M. Lavielle et F. Mentré, « Estimation of Population Pharmacokinetic Parameters of Saquinavir in HIV Patients with the MONOLIX Software », *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.*, vol. 34, n° 2, p. 229-249, mars 2007, doi: 10.1007/s10928-006-9043-z.
- [191] D. Mould et R. Upton, « Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development-Part 2: Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods », *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.*, vol. 2, n° 4, p. 38, avr. 2013, doi: 10.1038/psp.2013.14.
- [192] B. Delyon, M. Lavielle, et E. Moulines, « Convergence of a stochastic approximation version of the EM algorithm », *Ann. Stat.*, vol. 27, n° 1, mars 1999, doi: 10.1214/aos/1018031103.
- [193] P. L. S. Chan, P. Jacqmin, M. Lavielle, L. McFadyen, et B. Weatherley, « The use of the SAEM algorithm in MONOLIX software for estimation of population pharmacokinetic-pharmacodynamic-viral dynamics parameters of maraviroc in asymptomatic HIV subjects », *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.*, vol. 38, n° 1, p. 41-61, févr. 2011, doi: 10.1007/s10928-010-9175-z.
- [194] L. B. Sheiner, S. Beal, B. Rosenberg, et V. V. Marathe, « Forecasting individual pharmacokinetics. », *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 26, n° 3, p. 294-305, sept. 1979, doi: 10.1002/cpt1979263294.
- [195] M. Lavielle et B. Ribba, « Enhanced Method for Diagnosing Pharmacometric Models: Random Sampling from Conditional Distributions », *Pharm. Res.*, vol. 33, n° 12, p. 2979-2988, déc. 2016, doi: 10.1007/s11095-016-2020-3.
- [196] R. M. Savic et M. O. Karlsson, « Importance of Shrinkage in Empirical Bayes Estimates for Diagnostics: Problems and Solutions », *AAPS J.*, vol. 11, n° 3, p. 558-569, sept. 2009, doi: 10.1208/s12248-009-9133-0.
- [197] M. Bergstrand, A. C. Hooker, J. E. Wallin, et M. O. Karlsson, « Prediction-Corrected Visual Predictive Checks for Diagnosing Nonlinear Mixed-Effects Models », *AAPS J.*, vol. 13, n° 2, p. 143-151, juin 2011, doi: 10.1208/s12248-011-9255-z.
- [198] N. L. Dirks et B. Meibohm, « Population Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies »:, *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 49, n° 10, p. 633-659, oct. 2010, doi: 10.2165/11535960-000000000-00000.
- [199] G. Bajaj, X. Wang, S. Agrawal, M. Gupta, A. Roy, et Y. Feng, « Model-Based Population Pharmacokinetic Analysis of Nivolumab in Patients With Solid Tumors: Model-Based Population Pharmacokinetic Analysis of Nivolumab », *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.*, vol. 6, n° 1, p. 58-66, janv. 2017, doi: 10.1002/psp4.12143.
- [200] T. Freshwater *et al.*, « Evaluation of dosing strategy for pembrolizumab for oncology indications », *J. Immunother. Cancer*, vol. 5, n° 1, p. 43, déc. 2017, doi: 10.1186/s40425-017-0242-5.

Références bibliographiques

- [201] M. Stroh *et al.*, « Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Atezolizumab in Metastatic Urothelial Carcinoma », *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 102, n° 2, p. 305-312, août 2017, doi: 10.1002/cpt.587.
- [202] M. Centanni, D. J. A. R. Moes, I. F. Trocóniz, J. Ciccolini, et J. G. C. van Hasselt, « Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Immune Checkpoint Inhibitors », *Clin. Pharmacokinet.*, févr. 2019, doi: 10.1007/s40262-019-00748-2.
- [203] R. J. Bauer, R. L. Dedrick, M. L. White, M. J. Murray, et M. R. Garovoy, « Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Anti-CD11a Antibody hu1124 in Human Subjects with Psoriasis », p. 24.
- [204] N. Hayashi, Y. Tsukamoto, W. M. Sallas, et P. J. Lowe, « A mechanism-based binding model for the population pharmacokinetics and pharmacodynamics of omalizumab », *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 63, n° 5, p. 548-561, mai 2007, doi: 10.1111/j.1365-2125.2006.02803.x.
- [205] M. A. Tabrizi, C.-M. L. Tseng, et L. K. Roskos, « Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies », *Drug Discov. Today*, vol. 11, n° 1-2, p. 81-88, janv. 2006, doi: 10.1016/S1359-6446(05)03638-X.
- [206] G. Levy, « Pharmacologic target-mediated drug disposition », *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 56, n° 3, p. 248-252, sept. 1994, doi: 10.1038/clpt.1994.134.
- [207] B. J. McParland, *Nuclear Medicine Radiation Dosimetry*. 2010.
- [208] « World Health Organization. Cancer fact sheets,lung cancer. 2018. Available at:<http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>. Accessed December2, 2018 ».
- [209] E. Brambilla, « Classification OMS 2015 des tumeurs pulmonaires : Changements de paradigme », p. 76.
- [210] A. Rittmeyer *et al.*, « Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial », *The Lancet*, vol. 389, n° 10066, p. 255-265, janv. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)32517-X.
- [211] H. Borghaei *et al.*, « Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, n° 17, p. 1627-1639, oct. 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1507643.
- [212] J. Brahmer *et al.*, « Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, n° 2, p. 123-135, juill. 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1504627.
- [213] J. S. Kurman et S. D. Murgu, « Hyperprogressive disease in patients with non-small cell lung cancer on immunotherapy », *J. Thorac. Dis.*, vol. 10, n° 2, p. 1124-1128, févr. 2018, doi: 10.21037/jtd.2018.01.79.
- [214] S. Lantuejoul *et al.*, « Tests immunohistochimiques PD-L1 dans les cancers du poumon non à petites cellules : recommandations par le groupe PATTERN de pathologistes thoraciques », *Ann. Pathol.*, vol. 38, n° 2, p. 110-125, avr. 2018, doi: 10.1016/j.anpat.2018.01.007.
- [215] G. S. Krugsfeld *et al.*, « Analysis of real-world PD-L1 IHC 28-8 and 22C3 pharmDx assay utilisation, turnaround times and analytical concordance across multiple tumour types », *J. Clin. Pathol.*, vol. 73, n° 10, p. 656-664, oct. 2020, doi: 10.1136/jclinpath-2020-206466.
- [216] A. I. Daud *et al.*, « Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma », *J. Clin. Oncol.*, vol. 34, n° 34, p. 4102-4109, déc. 2016, doi: 10.1200/JCO.2016.67.2477.
- [217] S. Kim *et al.*, « Comparative analysis of PD-L1 expression between primary and metastatic pulmonary adenocarcinomas », *Eur. J. Cancer*, vol. 75, p. 141-149, avr. 2017, doi: 10.1016/j.ejca.2017.01.004.

Références bibliographiques

- [218] S. Chatterjee *et al.*, « A humanized antibody for imaging immune checkpoint ligand PD-L1 expression in tumors », *Oncotarget*, vol. 7, n° 9, p. 10215-10227, mars 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7143.
- [219] C. G. England *et al.*, « 89Zr-labeled nivolumab for imaging of T-cell infiltration in a humanized murine model of lung cancer », *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 45, n° 1, p. 110-120, janv. 2018, doi: 10.1007/s00259-017-3803-4.
- [220] L. E. Lamberts *et al.*, « Antibody Positron Emission Tomography Imaging in Anticancer Drug Development », *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, n° 13, p. 1491-1504, mai 2015, doi: 10.1200/JCO.2014.57.8278.
- [221] J. Czernin et M. E. Phelps, « Positron Emission Tomography Scanning: Current and Future Applications », *Annu. Rev. Med.*, vol. 53, n° 1, p. 89-112, févr. 2002, doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.104028.
- [222] G. A. M. S. van Dongen, A. J. Poot, et D. J. Vugts, « PET imaging with radiolabeled antibodies and tyrosine kinase inhibitors: immuno-PET and TKI-PET », *Tumor Biol.*, vol. 33, n° 3, p. 607-615, juin 2012, doi: 10.1007/s13277-012-0316-4.
- [223] G. W. Severin, J. W. Engle, R. J. Nickles, et T. E. Barnhart, « 89Zr Radiochemistry for PET », p. 14, 2015.
- [224] « Nuclear Data Sheets for A = 89* | Elsevier Enhanced Reader ». <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0090375298900199?token=10C637BB135A71D8D92A5C6641819826014BB731382D3724EA79114AA6E25F2E84CF24CC23FD5E4903402E1C581D07E&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210922143458> (consulté le 22 septembre 2021).
- [225] H. Boxenbaum, « Interspecies scaling, allometry, physiological time, and the ground plan of pharmacokinetics », *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, vol. 10, n° 2, p. 201-227, avr. 1982, doi: 10.1007/BF01062336.
- [226] M. J. W. D. Vosjan *et al.*, « Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine », *Nat. Protoc.*, vol. 5, n° 4, p. 739-743, avr. 2010, doi: 10.1038/nprot.2010.13.
- [227] K. Zhang, K. Wrzesinski, S. J. Fey, P. Mose Larsen, X. Zhang, et P. Roepstorff, « Assessing CMT cell line stability by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry based proteome analysis », *J. Proteomics*, vol. 71, n° 2, p. 160-167, juill. 2008, doi: 10.1016/j.jprot.2008.04.001.
- [228] H. Y. Li *et al.*, « The Tumor Microenvironment Regulates Sensitivity of Murine Lung Tumors to PD-1/PD-L1 Antibody Blockade », *Cancer Immunol. Res.*, vol. 5, n° 9, p. 767-777, sept. 2017, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0365.
- [229] V. Justilien *et al.*, « Matrix Metalloproteinase-10 Is Required for Lung Cancer Stem Cell Maintenance, Tumor Initiation and Metastatic Potential », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 4, p. e35040, avr. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0035040.
- [230] T. Lindmo, E. Boven, F. Cuttitta, et P. A. Bunn, « Determination of the Immunoreactive Fraction of Radiolabeled Monoclonal Antibodies by Linear Extrapolation to Binding at Infinite Antigen Excess », p. 13.
- [231] E. M. Vicente, M. A. Lodge, S. P. Rowe, R. L. Wahl, et E. C. Frey, « Simplifying volumes-of-interest (VOIs) definition in quantitative SPECT: Beyond manual definition of 3D whole-organ VOIs », *Med. Phys.*, vol. 44, n° 5, p. 1707-1717, mai 2017, doi: 10.1002/mp.12164.
- [232] M. Kikuchi *et al.*, « Preclinical immunoPET/CT imaging using Zr-89-labeled anti-PD-L1 monoclonal antibody for assessing radiation-induced PD-L1 upregulation in head and neck cancer and melanoma », *OncoImmunology*, p. e1329071, mai 2017, doi: 10.1080/2162402X.2017.1329071.

Références bibliographiques

- [233] E. M. Jagoda *et al.*, « Immuno-PET Imaging of the Programmed Cell Death-1 Ligand (PD-L1) Using a Zirconium-89 Labeled Therapeutic Antibody, Avelumab », *Mol. Imaging*, vol. 18, p. 153601211982998, janv. 2019, doi: 10.1177/1536012119829986.
- [234] M. Ovacik et K. Lin, « Tutorial on Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Its Considerations in Early Development: Tutorial on Monoclonal Antibody Pharmacokinetics », *Clin. Transl. Sci.*, vol. 11, n° 6, p. 540-552, nov. 2018, doi: 10.1111/cts.12567.
- [235] Z. H. Temrikar, S. Suryawanshi, et B. Meibohm, « Pharmacokinetics and Clinical Pharmacology of Monoclonal Antibodies in Pediatric Patients », *Pediatr. Drugs*, vol. 22, n° 2, p. 199-216, avr. 2020, doi: 10.1007/s40272-020-00382-7.
- [236] E. D. Lobo, R. J. Hansen, et J. P. Balthasar, « Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics », *J. Pharm. Sci.*, vol. 93, n° 11, p. 2645-2668, nov. 2004, doi: 10.1002/jps.20178.
- [237] A. Ruggiero *et al.*, « Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 27, p. 12369-12374, juill. 2010, doi: 10.1073/pnas.0913667107.
- [238] D. S. Abou, T. Ku, et P. M. Smith-Jones, « IN VIVO BIODISTRIBUTION AND ACCUMULATION OF 89Zr IN MICE », p. 14, 2015.
- [239] J. P. Holland, Y. Sheh, et J. S. Lewis, « Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89 », *Nucl. Med. Biol.*, vol. 36, n° 7, p. 729-739, oct. 2009, doi: 10.1016/j.nucmedbio.2009.05.007.
- [240] L. R. Perk, G. W. M. Visser, B. M. Tijink, et C. R. Leemans, « 89Zr as a PET Surrogate Radioisotope for Scouting Biodistribution of the Therapeutic Radiometals 90Y and 177Lu in Tumor-Bearing Nude Mice After Coupling to the Internalizing Antibody Cetuximab », p. 9.
- [241] E. C. F. Dijkers *et al.*, « Development and Characterization of Clinical-Grade ⁸⁹ Zr-Trastuzumab for HER2/ neu ImmunoPET Imaging », *J. Nucl. Med.*, vol. 50, n° 6, p. 974-981, juin 2009, doi: 10.2967/jnumed.108.060392.
- [242] P. Laverman *et al.*, « Immuno-PET and Immuno-SPECT of Rheumatoid Arthritis with Radiolabeled Anti-Fibroblast Activation Protein Antibody Correlates with Severity of Arthritis », *J. Nucl. Med.*, vol. 56, n° 5, p. 778-783, mai 2015, doi: 10.2967/jnumed.114.152959.
- [243] V. L. Ferguson, R. A. Ayers, T. A. Bateman, et S. J. Simske, « Bone development and age-related bone loss in male C57BL/6J mice », *Bone*, vol. 33, n° 3, p. 387-398, sept. 2003, doi: 10.1016/S8756-3282(03)00199-6.
- [244] D. Li *et al.*, « Immuno-PET Imaging of ⁸⁹ Zr Labeled Anti-PD-L1 Domain Antibody », *Mol. Pharm.*, vol. 15, n° 4, p. 1674-1681, avr. 2018, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00062.
- [245] M. E. Keir, M. J. Butte, G. J. Freeman, et A. H. Sharpe, « PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 26, n° 1, p. 677-704, avr. 2008, doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
- [246] C. C. Boyle, A. J. Paine, et S. J. Mather, « The mechanism of hepatic uptake of a radiolabelled monoclonal antibody », *Int. J. Cancer*, vol. 50, n° 6, p. 912-917, avr. 1992, doi: 10.1002/ijc.2910500616.
- [247] K. Wang *et al.*, « PD-1 blockade inhibits osteoclast formation and murine bone cancer pain », *J. Clin. Invest.*, vol. 130, n° 7, p. 3603-3620, doi: 10.1172/JCI133334.
- [248] T. Kurino *et al.*, « Poor outcome with anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) antibody due to poor pharmacokinetic properties in PD-1/PD-L1 blockade-sensitive mouse models », *J. Immunother. Cancer*, vol. 8, n° 1, p. e000400, févr. 2020, doi: 10.1136/jitc-2019-000400.

Références bibliographiques

- [249] M. Yasunaga *et al.*, « Development of Antibody–Drug Conjugates Using DDS and Molecular Imaging », *Bioengineering*, vol. 4, n° 4, p. 78, sept. 2017, doi: 10.3390/bioengineering4030078.
- [250] Y. Matsumura, « The Drug Discovery by NanoMedicine and its Clinical Experience », *Jpn. J. Clin. Oncol.*, vol. 44, n° 6, p. 515-525, juin 2014, doi: 10.1093/jjco/hyu046.
- [251] S. Bhattacharyya *et al.*, « Zirconium-89 labeled panitumumab: a potential immuno-PET probe for HER1-expressing carcinomas », *Nucl. Med. Biol.*, vol. 40, n° 4, p. 451-457, mai 2013, doi: 10.1016/j.nucmedbio.2013.01.007.
- [252] L. Lindenberg *et al.*, « Dosimetry and first human experience with 89Zr-panitumumab », p. 9.
- [253] B. Quinn, Z. Dauer, N. Pandit-Taskar, H. Schoder, et L. T. Dauer, « Radiation dosimetry of 18F-FDG PET/CT: incorporating exam-specific parameters in dose estimates », *BMC Med. Imaging*, vol. 16, n° 1, p. 41, déc. 2016, doi: 10.1186/s12880-016-0143-y.
- [254] K. Ancevski Hunter, M. A. Socinski, et L. C. Villaruz, « PD-L1 Testing in Guiding Patient Selection for PD-1/PD-L1 Inhibitor Therapy in Lung Cancer », *Mol. Diagn. Ther.*, vol. 22, n° 1, p. 1-10, févr. 2018, doi: 10.1007/s40291-017-0308-6.
- [255] R. S. Herbst *et al.*, « Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1–Selected Patients with NSCLC », *N. Engl. J. Med.*, vol. 383, n° 14, p. 1328-1339, oct. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa1917346.
- [256] M. P. Kelly *et al.*, « Preclinical PET imaging with the novel human antibody 89Zr-DFO-REGN3504 sensitively detects PD-L1 expression in tumors and normal tissues », *J. Immunother. Cancer*, vol. 9, n° 1, p. e002025, janv. 2021, doi: 10.1136/jitc-2020-002025.
- [257] F. R. Hirsch *et al.*, « PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project », *J. Thorac. Oncol.*, vol. 12, n° 2, p. 208-222, févr. 2017, doi: 10.1016/j.jtho.2016.11.2228.
- [258] Y. W. S. Jauw *et al.*, « Immuno-Positron Emission Tomography with Zirconium-89-Labeled Monoclonal Antibodies in Oncology: What Can We Learn from Initial Clinical Trials? », *Front. Pharmacol.*, vol. 7, p. 131, 2016, doi: 10.3389/fphar.2016.00131.
- [259] M. Ciprotti *et al.*, « Phase I Imaging and Pharmacodynamic Trial of CS-1008 in Patients With Metastatic Colorectal Cancer », *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, n° 24, p. 2609-2616, août 2015, doi: 10.1200/JCO.2014.60.4256.
- [260] M. Sakata, K. Oda, J. Toyohara, K. Ishii, T. Nariai, et K. Ishiwata, « Direct comparison of radiation dosimetry of six PET tracers using human whole-body imaging and murine biodistribution studies », *Ann. Nucl. Med.*, vol. 27, n° 3, p. 285-296, avr. 2013, doi: 10.1007/s12149-013-0685-9.
- [261] M. A. Deri *et al.*, « *p*-SCN-Bn-HOPO: A Superior Bifunctional Chelator for ⁸⁹Zr ImmunoPET », *Bioconjug. Chem.*, vol. 26, n° 12, p. 2579-2591, déc. 2015, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00572.
- [262] H.-S. Jans, X.-H. Yang, D. R. Brocks, P. Kumar, M. Wuest, et L. I. Wiebe, « Positron Emission Tomography (PET) and Pharmacokinetics: Classical Blood Sampling Versus Image-Derived Analysis of [18F]FAZA and [18F]FDG in a Murine Tumor Bearing Model », *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.*, vol. 21, n° 1s, p. 32s-47s, 2018, doi: 10.18433/jpps29788.
- [263] C. Kuntner, « Kinetic modeling in pre-clinical positron emission tomography », *Z. Für Med. Phys.*, vol. 24, n° 4, p. 274-285, déc. 2014, doi: 10.1016/j.zemedi.2014.02.003.
- [264] A. Lindauer *et al.*, « Translational Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Tumor Growth Inhibition Supports Dose-Range Selection of the Anti–PD-1 Antibody Pembrolizumab », *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.*, vol. 6, n° 1, p. 11-20, 2017, doi: 10.1002/psp.4.12130.

Références bibliographiques

- [265] P. M. Glassman, L. Abuqayyas, et J. P. Balthasar, « Assessments of antibody biodistribution », *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 55, n° S3, p. S29-S38, 2015, doi: 10.1002/jcph.365.
- [266] H. Yu, T. A. Boyle, C. Zhou, D. L. Rimm, et F. R. Hirsch, « PD-L1 Expression in Lung Cancer », *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*, vol. 11, n° 7, p. 964-975, juill. 2016, doi: 10.1016/j.jtho.2016.04.014.
- [267] W. Yu *et al.*, « PD-L1 promotes tumor growth and progression by activating WIP and β -catenin signaling pathways and predicts poor prognosis in lung cancer », *Cell Death Dis.*, vol. 11, n° 7, p. 506, juill. 2020, doi: 10.1038/s41419-020-2701-z.
- [268] I. Mellman et H. Plutner, « Internalization and degradation of macrophage Fc receptors bound to polyvalent immune complexes. », *J. Cell Biol.*, vol. 98, n° 4, p. 1170-1177, avr. 1984, doi: 10.1083/jcb.98.4.1170.
- [269] J. Garousi, A. Orlova, F. Y. Frejd, et V. Tolmachev, « Imaging using radiolabelled targeted proteins: radioimmunodetection and beyond », *EJNMMI Radiopharm. Chem.*, vol. 5, n° 1, p. 16, déc. 2020, doi: 10.1186/s41181-020-00094-w.
- [270] G. Luurtsema *et al.*, « EANM guideline for harmonisation on molar activity or specific activity of radiopharmaceuticals: impact on safety and imaging quality », *EJNMMI Radiopharm. Chem.*, vol. 6, n° 1, p. 34, oct. 2021, doi: 10.1186/s41181-021-00149-6.
- [271] S. K. Sharma *et al.*, « A Systematic Evaluation of Antibody Modification and ^{89}Zr -Radiolabeling for Optimized Immuno-PET », *Bioconjug. Chem.*, vol. 32, n° 7, p. 1177-1191, juill. 2021, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00087.
- [272] V. T. DeVita et E. Chu, « A history of cancer chemotherapy », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 21, p. 8643-8653, nov. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6611.
- [273] B. Olson, Y. Li, Y. Lin, E. T. Liu, et A. Patnaik, « Mouse Models for Cancer Immunotherapy Research », *Cancer Discov.*, vol. 8, n° 11, p. 1358-1365, nov. 2018, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0044.
- [274] S. Gupta, S. Batra, et M. Jain, « Antibody Labeling with Radioiodine and Radiometals », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1141, p. 147-157, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-0363-4_9.
- [275] M. Chomet, G. A. M. S. van Dongen, et D. J. Vugts, « State of the Art in Radiolabeling of Antibodies with Common and Uncommon Radiometals for Preclinical and Clinical Immuno-PET », *Bioconjug. Chem.*, vol. 32, n° 7, p. 1315-1330, juill. 2021, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00136.
- [276] R. Raavé *et al.*, « Direct comparison of the in vitro and in vivo stability of DFO, DFO* and DFOcyclo* for ^{89}Zr -immunoPET », *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 46, n° 9, p. 1966-1977, août 2019, doi: 10.1007/s00259-019-04343-2.
- [277] D. J. Vugts *et al.*, « Comparison of the octadentate bifunctional chelator DFO*-pPhe-NCS and the clinically used hexadentate bifunctional chelator DFO-pPhe-NCS for ^{89}Zr -immuno-PET », *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 44, n° 2, p. 286-295, févr. 2017, doi: 10.1007/s00259-016-3499-x.
- [278] A. Natarajan et S. S. Gambhir, « Radiation Dosimetry Study of $[^{89}\text{Zr}]$ rituximab Tracer for Clinical Translation of B cell NHL Imaging using Positron Emission Tomography », *Mol. Imaging Biol.*, vol. 17, n° 4, p. 539-547, août 2015, doi: 10.1007/s11307-014-0810-8.
- [279] N. Mataki *et al.*, « Expression of PD-1, PD-L1, and PD-L2 in the Liver in Autoimmune Liver Diseases », *Off. J. Am. Coll. Gastroenterol. ACG*, vol. 102, n° 2, p. 302-312, févr. 2007, Consulté le: 30 novembre 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://journals.lww.com/ajg/Abstract/2007/02000/Expression_of_PD_1,_PD_L1,_and_PD_L2_in_the_Liver.14.aspx

Références bibliographiques

- [280] Y. Iwai, S. Terawaki, M. Ikegawa, T. Okazaki, et T. Honjo, « PD-1 Inhibits Antiviral Immunity at the Effector Phase in the Liver », *J. Exp. Med.*, vol. 198, n° 1, p. 39-50, juill. 2003, doi: 10.1084/jem.20022235.
- [281] J. P. Holland, V. Divilov, N. H. Bander, P. M. Smith-Jones, S. M. Larson, et J. S. Lewis, « ⁸⁹Zr-DFO-J591 for ImmunoPET of Prostate-Specific Membrane Antigen Expression In Vivo », *J. Nucl. Med.*, vol. 51, n° 8, p. 1293-1300, août 2010, doi: 10.2967/jnumed.110.076174.
- [282] E. B. Ehlerding *et al.*, « Noninvasive Imaging and Quantification of Radiotherapy-Induced PD-L1 Upregulation with ⁸⁹Zr-Df-Atezolizumab », *Bioconjug. Chem.*, vol. 30, n° 5, p. 1434-1441, mai 2019, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00178.
- [283] C. Truillet *et al.*, « Imaging PD-L1 Expression with ImmunoPET », *Bioconjug. Chem.*, vol. 29, n° 1, p. 96-103, janv. 2018, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00631.
- [284] Z. Li, B.-F. Krippendorff, et D. K. Shah, « Influence of Molecular size on the clearance of antibody fragments », *Pharm. Res.*, vol. 34, n° 10, p. 2131-2141, oct. 2017, doi: 10.1007/s11095-017-2219-y.
- [285] C. A. Boswell, D. B. Tesar, K. Mukhyala, F.-P. Theil, P. J. Fielder, et L. A. Khawli, « Effects of Charge on Antibody Tissue Distribution and Pharmacokinetics », *ACS Publications*, 5 novembre 2010. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bc100261d> (consulté le 1 décembre 2021).
- [286] G. Hong, M. I. Bazin-Redureau, et J. M. Scherrmann, « Pharmacokinetics and organ distribution of cationized colchicine-specific IgG and Fab fragments in rat », *J. Pharm. Sci.*, vol. 88, n° 1, p. 147-153, janv. 1999, doi: 10.1021/js970335n.

Publication dans des revues internationales

Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model, Frontiers nuclear medecin. **Krache A**, Fontan C, Pestourie C, Bardies M, Bouvet M, Payoux P, Chatelut E, White-Koning M, Salabert AS. [Accepté le 06/12/2021, Chez Frontiers, Nuclear medecin]

Communications orales dans des congrès internationaux

Antibody anti PDL1 radiolabelling with ^{89}Zr : feasibility and in vitro characterization. **Krache A**, Fontan C, Bouvet M, Payoux P, Salabert AS, White-Koning M. 4th Nuclear Technologies for Health Symposium. Nantes, France 2020.

Preclinical pharmacokinetics and dosimetry of an $[^{89}\text{Zr}]$ labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer murine model. **Krache A**, Fontan C, Bouvet M, Payoux P, Chatelut E, Salabert AS, White-Koning M. Combination in Cancer immunotherapy and Overcoming Resistance, from molecular aspects to clinical issues. Toulouse, France 2021.

Preclinical pharmacokinetic and dosimetry of a ^{89}Zr labelled anti-PDL1 in an orthotopic lung cancer model. **Krache A**, Fontan C, Pestourie C, Bardies M, Bouvet M, Payoux P, Chatelut E, White-Koning M, Salabert AS. European Association of Nuclear Medicine, 20221.

Author: Anis KRACHE

Title: PET imaging of PD-L1 in a mouse model of lung cancer: Zirconium-89 radiolabelling, pharmacokinetic modelling and dosimetry.

PhD supervisors: Dr. Mélanie WHITE-KONING, Dr. Anne-Sophie SALABERT & Dr. Charlotte FONTAN

Summary:

Immunotherapy with anti PD-L1 monoclonal antibodies is an innovative cancer treatment, used in non-small cell lung cancer (NSCLC). This antibody inhibits checkpoints inhibitors to restore the anti-tumour immune response by preventing the binding between PD-1/PD-L1. The administration of this treatment is conditional on the assessment of PD-L1 expression on tumour biopsies. However, the use of biopsies to identify PD-L1 expression can be problematic as the heterogeneity of the tumour may lead to differences in expression depending on the site of extraction. Moreover, as PD-L1 expression varies with time and exposure to treatment, the multiplication of invasive procedures such as biopsies for treatment follow-up is not ideal. It is therefore necessary to look for biomarkers to better identify patients likely to respond to the treatment but also to monitor this therapy to prevent resistance. Radiolabelled antibodies are a rapidly developing diagnostic method which combines antibody targeting with the sensitivity of positron emission tomography (PET) imaging. In this work, we radiolabelled an anti-PDL1 antibody with zirconium-89, a radioisotope whose physical half-life is compatible with the pharmacokinetics of monoclonal antibodies. We studied the biological properties of this radiolabelled antibody in vitro and in vivo in a syngeneic murine NSCLC model expressing PD-L1. In this mouse model, with and without treatment, we also studied the survival of the animals and the evolution of the tumour and its microenvironment using histological sections (TIM-3).

With a radiochemical purity (RCP) higher than 95%, [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 was correctly radiolabelled. The immunoreactivity (96%) showed that the antibody was not damaged by the radiolabelling procedure. This [⁸⁹Zr]DFO-anti-PDL1 was injected into healthy mice and lung-cancer grafted mice. PET imaging was performed 24h, 48h, 72h and 168h after injection. A pharmacokinetic (PK) model was developed to describe the distribution of the tracer. It was used to estimate the different inter-compartmental transfer constants and a better imaging time at 125h. A blocking study was used to verify the in vivo specificity of the radiotracer. Using modelling, the PK parameters of the organs were estimated and extrapolated in humans using allometric equations. This allowed us to calculate a dosimetry of 132 µSv/MBq. Treatment of NSCLC in the mouse model revealed an increase in TIM-3 over time highlighting its potential role in immunotherapy escape.

The results obtained seem encouraging for the development of a method to assess PD-L1 expression by imaging in NSCLC using immunoPET. However, the dosimetry of 132 µSv/MBq remains a significant barrier to its use, although the value found remains low compared to other zirconium-89 labelled antibodies.

Auteur : Anis KRACHE

Titre : Imagerie TEP de PD-L1 dans un modèle murin de cancer du poumon : Radiomarquage au zirconium-89, modélisation pharmacocinétique et dosimétrie.

Directrices de thèse : Dr. Mélanie WHITE-KONING, Dr. Anne-Sophie SALABERT & Dr. Charlotte FONTAN

Date et Lieu de soutenance : Le 21 février 2022, CHU Purpan, Pavillon Baudot

Résumé :

L'immunothérapie par anticorps monoclonaux anti PD-L1 est un traitement innovant du cancer, utilisé notamment dans le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC). Cet anticorps permet d'inhiber les checkpoints inhibiteurs afin de restaurer la réponse immunitaire antitumorale en empêchant la liaison entre PD-1/PD-L1. L'administration de ce traitement est conditionnée par l'évaluation de l'expression de PD-L1 sur des biopsies de tumeurs. L'utilisation de biopsie pose cependant un problème dans l'exhaustivité du résultat obtenu pour cette expression qui va être lié au site d'extraction sur une tumeur potentiellement hétérogène vis à vis de PD-L1. De plus, l'expression de PD-L1 variant avec le temps et l'exposition au traitement, la multiplication d'actes invasifs tels que des biopsies pour un suivi de traitement n'est pas idéale. Il paraît donc nécessaire de rechercher des biomarqueurs afin de mieux identifier les patients susceptibles de répondre au traitement, suivre l'évolution de cette thérapie et ainsi contribuer à prévenir les résistances. Les anticorps radiomarqués sont des outils en plein essor permettant d'allier le ciblage d'un anticorps et la sensibilité de l'imagerie par tomographie par émission de positions (TEP). Dans ces travaux, nous avons réalisé le radiomarquage d'un anticorps anti-PDL1 avec du zirconium-89, radioisotope dont la période physique est compatible avec la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux. Nous avons étudié les propriétés biologiques de cet anticorps radiomarqué *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de CPNPC murin syngénique exprimant PD-L1. Dans ce modèle murin, avec et sans traitement, nous avons également étudié la survie des animaux ainsi que l'évolution de la tumeur et de son microenvironnement à l'aide de coupes histologiques (TIM-3).

Avec une pureté radiochimique (PRC) supérieure à 95%, le $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -anti-PDL1 a été correctement radiomarqué. L'immunoréactivité (96%) a montré que l'anticorps n'a pas été endommagé par la procédure de radiomarquage. Ce $[^{89}\text{Zr}]\text{DFO}$ -anti-PDL1 a été injecté chez des souris saines et dans le modèle de CPNPC. L'imagerie TEP a été réalisée 24h, 48h, 72h et 168h après l'injection. Un modèle pharmacocinétique (PK) a été développé afin de décrire la distribution du traceur. Il a permis d'estimer les différentes constantes de transferts intercompartimentales et un meilleur temps d'imagerie à 125h. Une étude de blocage a permis de vérifier la spécificité *in vivo* du radiotraceur. À l'aide de la modélisation, les paramètres PK des organes ont été estimés et extrapolés chez l'homme à l'aide d'équations allométriques. Ceci nous a permis de calculer une dosimétrie de 132 $\mu\text{Sv}/\text{MBq}$. Le traitement du CPNPC dans le modèle murin a révélé une augmentation de TIM-3 au cours du temps soulignant son rôle potentiel dans les échappements aux traitements par immunothérapie.

Les résultats obtenus semblent encourageants concernant la mise en place d'une méthode d'évaluation de l'expression de PD-L1 par imagerie dans le CPNPC en utilisant l'immunoTEP. La dosimétrie de 132 $\mu\text{Sv}/\text{MBq}$ reste cependant un frein conséquent à son utilisation bien que la valeur retrouvée reste faible en comparaison des autres anticorps marqués au zirconium-89.