

MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE

Soutenu publiquement le 25 Juin 2021

Par M Samir BOUKHLEF

Conformément aux dispositions réglementaires en vigueur
tient lieu de
THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**AUTOMATISATION DU RADIOMARQUAGE AU GALLIUM-68 DE L'EXENDIN-4-
CYS⁴⁰-VS-DO3A EMPLOYANT UN AUTOMATE MINIAIO®**

Membres du jury :

Président :

SIMON Nicolas, Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,
Université de Lille – CHU de Lille

Assesseurs :

CHILLON Jean-Marc, Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,
Université d'Amiens – CHU d'Amiens

DEKYNDT Berengère, Pharmacien – Praticien Hospitalier – CHU de Lille

LEGRAND Jean-François, Pharmacien – Praticien Hospitalier – CHU de Lille

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

Université de Lille

| | |
|---|------------------------|
| Président : | Jean-Christophe CAMART |
| Premier Vice-président : | Nicolas POSTEL |
| Vice-président formation tout au long de la vie : | Christophe MONDOU |
| Vice-président recherche : | Lionel MONTAGNE |
| Vice-président relations internationales : | François-Olivier SEYS |
| Vice-présidente ressources : | Georgette DAL |
| Directrice Générale des Services : | Marie-Dominique SAVINA |

Faculté de Pharmacie

| | |
|---|-------------------|
| Doyen : | Bertrand DÉCAUDIN |
| Vice-doyen et assesseur à la recherche : | Patricia MELNYK |
| Assesseur aux relations internationales : | Philippe CHAVATTE |
| Assesseur aux relations avec le monde professionnel : | Thomas MORGENROTH |
| Assesseur à la vie de la faculté : | Claire PINÇON |
| Assesseur aux études : | Benjamin BERTIN |
| Responsable des Services : | Cyrille PORTA |
| Représentant étudiant : | Augustin CLERGIER |

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|--------------|-----------|--|-------------|
| Mme | ALLORGE | Delphine | Toxicologie et Santé publique | 81 |
| M. | BROUSSEAU | Thierry | Biochimie | 82 |
| M. | DÉCAUDIN | Bertrand | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 81 |
| M. | DINE | Thierry | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 81 |
| Mme | DUPONT-PRADO | Annabelle | Hématologie | 82 |
| Mme | GOFFARD | Anne | Bactériologie - Virologie | 82 |
| M. | GRESSIER | Bernard | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 86 |
| M. | ODOU | Pascal | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 80 |
| Mme | POULAIN | Stéphanie | Hématologie | 82 |
| M. | SIMON | Nicolas | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 81 |
| M. | STAELS | Bart | Biologie cellulaire | 82 |

Professeurs des Universités (PU)

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|-------------|-------------|--|-------------|
| M. | ALIOUAT | El Moukhtar | Parasitologie - Biologie animale | 87 |
| Mme | AZAROUAL | Nathalie | Biophysique - RMN | 85 |
| M. | BLANCHEMAIN | Nicolas | Pharmacotechnie industrielle | 85 |
| M. | CARNOY | Christophe | Immunologie | 87 |
| M. | CAZIN | Jean-Louis | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 86 |

| | | | | |
|-----|---------------|-----------------|---|----|
| M. | CHAVATTE | Philippe | Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol | 86 |
| M. | COURTECUISSÉ | Régis | Sciences végétales et fongiques | 87 |
| M. | CUNY | Damien | Sciences végétales et fongiques | 87 |
| Mme | DELBAERE | Stéphanie | Biophysique - RMN | 85 |
| Mme | DEPREZ | Rebecca | Chimie thérapeutique | 86 |
| M. | DEPREZ | Benoît | Chimie bioinorganique | 85 |
| M. | DUPONT | Frédéric | Sciences végétales et fongiques | 87 |
| M. | DURIEZ | Patrick | Physiologie | 86 |
| M. | ELATI | Mohamed | Biomathématiques | 27 |
| M. | FOLIGNÉ | Benoît | Bactériologie - Virologie | 87 |
| Mme | FOULON | Catherine | Chimie analytique | 85 |
| M. | GARÇON | Guillaume | Toxicologie et Santé publique | 86 |
| M. | GOOSSENS | Jean-François | Chimie analytique | 85 |
| M. | HENNEBELLE | Thierry | Pharmacognosie | 86 |
| M. | LEBEGUE | Nicolas | Chimie thérapeutique | 86 |
| M. | LEMDANI | Mohamed | Biomathématiques | 26 |
| Mme | LESTAVEL | Sophie | Biologie cellulaire | 87 |
| Mme | LESTRELIN | Réjane | Biologie cellulaire | 87 |
| Mme | MELNYK | Patricia | Chimie physique | 85 |
| M. | MILLET | Régis | Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol | 86 |
| Mme | MUHR-TAILLEUX | Anne | Biochimie | 87 |
| Mme | PERROY | Anne-Catherine | Droit et économie pharmaceutique | 86 |
| Mme | ROMOND | Marie-Bénédicte | Bactériologie - Virologie | 87 |

| | | | | |
|-----|-------------|----------|----------------------------------|----|
| Mme | SAHPAZ | Sevser | Pharmacognosie | 86 |
| M. | SERGHERAERT | Éric | Droit et économie pharmaceutique | 86 |
| M. | SIEPMANN | Juergen | Pharmacotechnie industrielle | 85 |
| Mme | SIEPMANN | Florence | Pharmacotechnie industrielle | 85 |
| M. | WILLAND | Nicolas | Chimie organique | 86 |

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|-----------|-----------------|---|-------------|
| M. | BLONDIAUX | Nicolas | Bactériologie - Virologie | 82 |
| Mme | DEMARET | Julie | Immunologie | 82 |
| Mme | GARAT | Anne | Toxicologie et Santé publique | 81 |
| Mme | GENAY | Stéphanie | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 81 |
| M. | LANNOY | Damien | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 80 |
| Mme | ODOU | Marie-Françoise | Bactériologie - Virologie | 82 |

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|-----------|--------------|----------------------------------|-------------|
| M. | AGOURIDAS | Laurence | Chimie thérapeutique | 85 |
| Mme | ALIOUAT | Cécile-Marie | Parasitologie - Biologie animale | 87 |
| M. | ANTHÉRIEU | Sébastien | Toxicologie et Santé publique | 86 |

| | | | | |
|-----|-----------------|-----------|--|----|
| Mme | AUMERCIER | Pierrette | Biochimie | 87 |
| M. | BANTUBUNGI-BLUM | Kadiombo | Biologie cellulaire | 87 |
| Mme | BARTHELEMY | Christine | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 85 |
| Mme | BEHRA | Josette | Bactériologie - Virologie | 87 |
| M. | BELARBI | Karim-Ali | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 86 |
| M. | BERTHET | Jérôme | Biophysique - RMN | 85 |
| M. | BERTIN | Benjamin | Immunologie | 87 |
| M. | BORDAGE | Simon | Pharmacognosie | 86 |
| M. | BOSC | Damien | Chimie thérapeutique | 86 |
| M. | BRIAND | Olivier | Biochimie | 87 |
| Mme | CARON-HOUDE | Sandrine | Biologie cellulaire | 87 |
| Mme | CARRIÉ | Hélène | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 86 |
| Mme | CHABÉ | Magali | Parasitologie - Biologie animale | 87 |
| Mme | CHARTON | Julie | Chimie organique | 86 |
| M. | CHEVALIER | Dany | Toxicologie et Santé publique | 86 |
| Mme | DANEL | Cécile | Chimie analytique | 85 |
| Mme | DEMANCHE | Christine | Parasitologie - Biologie animale | 87 |
| Mme | DEMARQUILLY | Catherine | Biomathématiques | 85 |
| M. | DHIFLI | Wajdi | Biomathématiques | 27 |
| Mme | DUMONT | Julie | Biologie cellulaire | 87 |
| M. | EL BAKALI | Jamal | Chimie thérapeutique | 86 |
| M. | FARCE | Amaury | Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol | 86 |
| M. | FLIPO | Marion | Chimie organique | 86 |

| | | | | |
|-----|-----------------------|-----------------|---|----|
| M. | FURMAN | Christophe | Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol | 86 |
| M. | GERVOIS | Philippe | Biochimie | 87 |
| Mme | GOOSSENS | Laurence | Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol | 86 |
| Mme | GRAVE | Béatrice | Toxicologie et Santé publique | 86 |
| Mme | GROSS | Barbara | Biochimie | 87 |
| M. | HAMONIER | Julien | Biomathématiques | 26 |
| Mme | HAMOUDI-BEN YELLES | Chérifa-Mounira | Pharmacotechnie industrielle | 85 |
| Mme | HANNOTHIAUX | Marie-Hélène | Toxicologie et Santé publique | 86 |
| Mme | HELLEBOID | Audrey | Physiologie | 86 |
| M. | HERMANN | Emmanuel | Immunologie | 87 |
| M. | KAMBIA KPAKPAGA | Nicolas | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 86 |
| M. | KARROUT | Younes | Pharmacotechnie industrielle | 85 |
| Mme | LALLOYER | Fanny | Biochimie | 87 |
| Mme | LECOEUR | Marie | Chimie analytique | 85 |
| Mme | LEHMANN | Hélène | Droit et économie pharmaceutique | 86 |
| Mme | LELEU | Natascha | Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol | 86 |
| Mme | LIPKA | Emmanuelle | Chimie analytique | 85 |
| Mme | LOINGEVILLE | Florence | Biomathématiques | 26 |
| Mme | MARTIN | Françoise | Physiologie | 86 |
| M. | MOREAU | Pierre-Arthur | Sciences végétales et fongiques | 87 |
| M. | MORGENROTH | Thomas | Droit et économie pharmaceutique | 86 |
| Mme | MUSCHERT | Susanne | Pharmacotechnie industrielle | 85 |
| Mme | NIKASINOVIC | Lydia | Toxicologie et Santé publique | 86 |

| | | | | |
|-----|------------|-----------|---|----|
| Mme | PINÇON | Claire | Biomathématiques | 85 |
| M. | PIVA | Frank | Biochimie | 85 |
| Mme | PLATEL | Anne | Toxicologie et Santé publique | 86 |
| M. | POURCET | Benoît | Biochimie | 87 |
| M. | RAVAUX | Pierre | Biomathématiques / Innovations pédagogiques | 85 |
| Mme | RAVEZ | Séverine | Chimie thérapeutique | 86 |
| Mme | RIVIÈRE | Céline | Pharmacognosie | 86 |
| M. | ROUMY | Vincent | Pharmacognosie | 86 |
| Mme | SEBTI | Yasmine | Biochimie | 87 |
| Mme | SINGER | Elisabeth | Bactériologie - Virologie | 87 |
| Mme | STANDAERT | Annie | Parasitologie - Biologie animale | 87 |
| M. | TAGZIRT | Madjid | Hématologie | 87 |
| M. | VILLEMAGNE | Baptiste | Chimie organique | 86 |
| M. | WELTI | Stéphane | Sciences végétales et fongiques | 87 |
| M. | YOUS | Saïd | Chimie thérapeutique | 86 |
| M. | ZITOUNI | Djamel | Biomathématiques | 85 |

Professeurs certifiés

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement |
|------|----------|-----------|------------------------|
| Mme | FAUQUANT | Soline | Anglais |
| M. | HUGES | Dominique | Anglais |
| M. | OSTYN | Gaël | Anglais |

Professeurs Associés

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|----------|------------|----------------------------------|-------------|
| M. | DAO PHAN | Haï Pascal | Chimie thérapeutique | 86 |
| M. | DHANANI | Alban | Droit et économie pharmaceutique | 86 |

Maîtres de Conférences Associés

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|-----------|------------|--|-------------|
| Mme | CUCCHI | Malgorzata | Biomathématiques | 85 |
| M. | DUFOSSEZ | François | Biomathématiques | 85 |
| M. | FRIMAT | Bruno | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 85 |
| M. | GILLOT | François | Droit et économie pharmaceutique | 86 |
| M. | MASCAUT | Daniel | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 85 |
| M. | MITOUMBA | Fabrice | Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière | 86 |
| M. | PELLETIER | Franck | Droit et économie pharmaceutique | 86 |
| M. | ZANETTI | Sébastien | Biomathématiques | 85 |

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|----------|-----------|--|-------------|
| Mme | CUVELIER | Élodie | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 81 |
| M. | GRZYCH | Guillaume | Biochimie | 82 |
| Mme | LENSKI | Marie | Toxicologie et santé publique | 81 |
| Mme | HENRY | Héloïse | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 80 |
| Mme | MASSE | Morgane | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 81 |
| Mme | VAISSIÉ | Alix | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 81 |

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|-----------|---------|---|-------------|
| Mme | GEORGE | Fanny | Bactériologie - Virologie / Immunologie | 87 |
| Mme | N'GUESSAN | Cécilia | Parasitologie - Biologie animale | 87 |
| M. | RUEZ | Richard | Hématologie | 87 |
| M. | SAIED | Tarak | Biophysique - RMN | 85 |
| M. | SIEROCKI | Pierre | Chimie bioinorganique | 85 |

Enseignant contractuel

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement |
|------|-------------|---------|---|
| M. | MARTIN MENA | Anthony | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière |

Faculté de Pharmacie de Lille

*3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>*

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| LISTE DES FIGURES | 17 |
| LISTE DES TABLEAUX | 19 |
| LISTE DES ANNEXES | 19 |
| ABREVIATIONS | 21 |
| I. INTRODUCTION | 23 |
| A. Tomographie par émission de positons (TEP) | 25 |
| 1. La désintégration β^+ | 25 |
| 2. Principes de détection des rayonnements | 26 |
| 3. Radionucléides utilisables en TEP | 29 |
| B. Le Gallium-68 | 31 |
| 1. Propriétés physico-chimiques | 31 |
| 2. Production du Ga-68 | 32 |
| 3. Principes du radiomarquage au Ga-68 | 34 |
| 4. Intérêt de l'automatisation pour le radiomarquage | 37 |
| C. Exendin-4 : Un analogue du Glucagon Like Peptide-1 | 38 |
| 1. Découverte et propriétés biologiques | 38 |
| 2. Intérêts de l'imagerie des récepteurs au GLP-1 | 39 |
| 3. Le radiomarquage des dérivés de l'Exendin-4 au Ga-68 | 42 |
| II. MATERIELS ET METHODES | 43 |
| A. Installations, équipements et réactifs | 43 |
| B. Schéma de synthèse de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO3A-VS-Cys}^{40}\text{-Exendin-4}$ | 44 |
| C. Contrôle qualité et mesures d'activité | 46 |
| D. Données et Analyse des données | 48 |
| III. RESULTATS | 49 |
| A. Qualification du générateur et de l'équipement | 49 |
| B. Contrôle qualité du produit fini | 49 |
| C. Stabilité radiochimique | 52 |
| D. Evaluation microbiologique | 53 |
| IV. DISCUSSION | 54 |
| A. Qualification du générateur de ^{68}Ga | 54 |
| B. Automatisation du radiomarquage | 54 |
| C. Statut et disponibilité du précurseur | 55 |
| D. Activité spécifique et effets indésirables | 55 |
| E. Cassettes et dispositifs médicaux | 56 |
| F. Réactifs et contrôle qualité du produit fini | 57 |
| V. CONCLUSION | 58 |
| VI. BIBLIOGRAPHIE | 59 |
| VII. ANNEXES | 63 |

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de désintégration selon un mode β^+ et de l'annihilation

Figure 2 : Schématisation de l'effet photo-électrique

Figure 3 : Schématisation de l'effet Compton.

Figure 4 : Schéma du principe de fonctionnement d'une caméra TEP issu du mémoire de J.Lange - *Development of a Parallel Computing Optimized Head Movement Correction Method in PET (2003)*(1).

Figure 5 : ① Circuit descriptif d'une chambre à ionisation ② Illustration de l'activimètre ISOMED 2010® et de son interface graphique

Figure 6 : Illustration de l'impact de l'énergie du positon sur le parcours du positon dans la matière et la résolution d'une acquisition en TEP d'un fantôme de Jaszczak. *Extrait de A.Sanchez-Crespo et Al. (2012)*(2)

Figure 7 : Schéma de désintégration du ^{68}Ge et du ^{68}Ga

Figure 8 : Photographie du cyclotron ARRONAX (Nantes)

Figure 9 : Photographies des générateurs ① GalliaPharm® et ② GalliAd® issues des sites www.base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr et www.ire.eu

Figure 10 : Vue en coupe et vue frontale du générateur GalliaPharm®, extrait du RCP.(3)

Figure 11 : Photographie d'un automate All-In-One Trasis® où est installé une cassette. Source: <http://www.iphc.cnrs.fr/The-laboratories.html>

Figure 12 : Séquences peptidique de l'Exendin-3, Exendin-4 et du GLP-1 (7-36) extrait des travaux de *J.Eng et Al. (1992)*

Figure 13 : Scintigraphie à l'Exendin radiomarquée à l'In-111 d'un patient ayant bénéficié d'une autogreffe d'îlots de Langerhans. Extrait des travaux de *F.Pattou et Al. (2010)* (4)

Figure 14 : Coupes abdominales transverses réalisées en TEP injectée à au [^{68}Ga] Exendin-4, [^{11}C]-HTP et au [^{18}F] FDG. Extrait des travaux de *O.Eriksson et Al. (2014)* (5)

Figure 15 : Représentation de la disposition du matériel dans le logiciel pilotant l'automate MiniAIO®.

Figure 16 : Diagramme du processus de radiomarquage de l'Exendin-4.

Figure 17 : Répartition de l'activité (MBq) corrigée de la décroissance ($T_{\text{cal}} = T_{\text{fin}}$ élution) en fonction des éléments de la cassette.

Figure 18 : Radiochromatogramme (CCM) du produit final contrôlé à $t_0 = \text{fin}$ du processus de radiomarquage.

Figure 19 : Radiochromatogramme (HPLC) du produit final contrôlé à $t = t_0 + 2\text{h}$.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales caractéristiques physiques et méthode de production des principaux radionucléides utilisables pour l'imagerie TEP

Tableau 2 : Exemples de structures et caractéristiques de chélateurs utilisés pour le radiomarquage de traceurs au Ga-68

Tableau 3 : Caractéristiques des réactions de marquages des différents dérivés de l'Exendin-4

Tableau 4 : Description de l'évolution du gradient de concentration utilisé dans la méthode de contrôle par HPLC du produit fini.

Tableau 5 : Références des critères d'acceptation du radiomarquage de l'Exendin.

Tableau 6 : Critères d'acceptation et caractéristiques de l'Exendin radiomarquée

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Photographie d'une cassette pour le radiomarquage de peptides.

Annexe 2 : Photographie de l'enceinte H700® équipée d'un automate MiniAIO® et d'un générateur Gallipharm®.

Annexe 3 : Représentation graphique de la réaction de radiomarquage de l'Exendin-4-DO3A-VS-Cys⁴⁰ extraite de *Evaluation of [68Ga]DO3A-VS-Cys40-Exendin-4 as a PET Probe for Imaging Human Transplanted Islets in the Liver – Li J et Al. (6)*

Annexe 4 : Certificat d'analyse de l'Exendin-4-DO3A-VS-Cys⁴⁰

ABREVIATIONS

ACN : Acétonitrile

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

CCM : Chromatographie Couche Mince

DME : Dossier de Médicament Expérimental

E&Z : Eckert & Ziegler

ESA : Etats-Unis d'Amérique

⁶⁸Ga : Gallium-68

⁶⁸Ge : Germanium-68

GLP-1 : *Glucagon-like peptide-1*

GLP-1R : Récepteur du GLP-1

ITLC/SG : Instant Thin Layer Chromatography / Silica Gel

HLB : Hydrophilic-Lipophilic Balance

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Pression

RCP : Résumé des caractéristiques du produit

SPE : Extraction en Phase Solide

TEMP : Tomographie par émission monophotonique

TEP : Tomographie par émission de positons

TFA : Acide TriFluoroAcétique

I. INTRODUCTION

Au cours des deux dernières décennies, l'imagerie scintigraphique des récepteurs du *glucagon-like peptide-1* (GLP-1R) a démontré son haut potentiel clinique pour le diagnostic des insulinomes (6–8) et pour le suivi post-transplantation des greffes pancréatiques ou d'îlots de Langerhans chez le sujet diabétique (4,9,10).

L'acquisition de telles images est rendue possible par le radiomarquage d'analogues peptidiques du GLP-1 : L'Exendin-3 et l'Exendin-4 (11). Malgré l'intense fixation rénale du traceur, la haute affinité des dérivés de l'Exendin pour GLP-1R(12) rend possible la localisation de lésions d'insulinomes de petites tailles (6,13). Les dérivés de l'exendin radiomarkés avec un émetteur de positons (Fluor-18(1), Cuivre-64(14), Gallium-68(10)) permettent d'exploiter la tomographie par émission de positons (TEP), une méthode d'imagerie sensible, semi-quantitative et ayant une résolution spatiale de l'ordre du millimètre.

Le choix du ^{68}Ga pour l'imagerie TEP présente de nombreux avantages : économique, disponibilité sur site, multiples éluions quotidiennes, statut de médicament radiopharmaceutique. Au 01/01/2021, deux générateurs de ^{68}Ga possèdent une autorisation de mise sur le marché (AMM) : le GalliaPharm® (Eckert & Ziegler, Berlin, Allemagne) autorisé en 2015 (3) et le GalliAd® (IRE ELiT, Fleurus, Belgique) autorisé en 2018 (15).

Favoriser l'accessibilité de ce radiotracer permettra son utilisation sans délai dans le cadre d'essais cliniques susceptibles d'être ouverts notamment pour la transplantation d'îlots de Langerhans (TIL). Leur nombre devrait augmenter suite à l'inscription de la TIL à la classification commune des actes médicaux au 01/01/2021. Son accessibilité est aussi conditionnée par l'obtention d'une méthode de radiomarquage rapide, reproductible et répondant aux exigences des bonnes pratiques de préparation (BPP). L'automatisation du radiomarquage de l'Exendin peut répondre à ces objectifs tout en limitant la dosimétrie des opérateurs.

Afin d'introduire le travail portant sur le radiomarquage automatisé de l'Exendin-4-Cys40-VS-DO3A, un bref exposé rappellera les bases de physique nucléaire nécessaires à la compréhension des principes de fonctionnement de l'imagerie TEP

et de son intérêt chez les patients ayant bénéficié d'une greffe d'îlots de Langerhans ou pour localiser les lésions d'insulinomes.

Jusqu'à présent, la synthèse de [^{68}Ga]Ga-DO3A-VS-Cys⁴⁰-Exendin-4 n'a été décrite que pour le module de synthèse automatisée Modular PharmLab (Eckert & Ziegler)(16). Notre objectif était d'évaluer la synthèse automatisée de ce radiotracteur sur un module différent afin de le rendre disponible pour une communauté plus large.

En conclusion de cette étude, nous rapportons une méthode reproductible et rapide de radiomarquage de l'Exendin-4-Cys⁴⁰-VS-DO3A en système clos piloté par un automate Mini All In One® (MiniAIO®, Trasis, Ans, Belgique).

II. RAPPELS : IMAGERIE NUCLEAIRE ET EXENDIN-4

A. Tomographie par émission de positons (TEP)

1. La désintégration β^+

La radioactivité est un phénomène aléatoire, spontané, irréversible au cours duquel un noyau atomique instable se désintègre en un noyau plus stable. Lorsque le noyau instable est trop riche en proton, la désintégration suit un mode β^+ . Ce mode de désintégration implique la transformation, dans le noyau, d'un proton en neutron avec l'émission d'un positon et d'un neutrino. Le positon est une particule chargée positivement et qui possède une masse identique à celle d'un électron. Lorsqu'elle est émise par le noyau, elle va transférer son énergie cinétique au milieu environnant (quelques mm). Une fois l'énergie cinétique nulle, le positon va interagir avec un électron du milieu provoquant un phénomène d'annihilation : deux photons γ de 511 keV seront émis et poursuivront un trajet opposé à 180° .

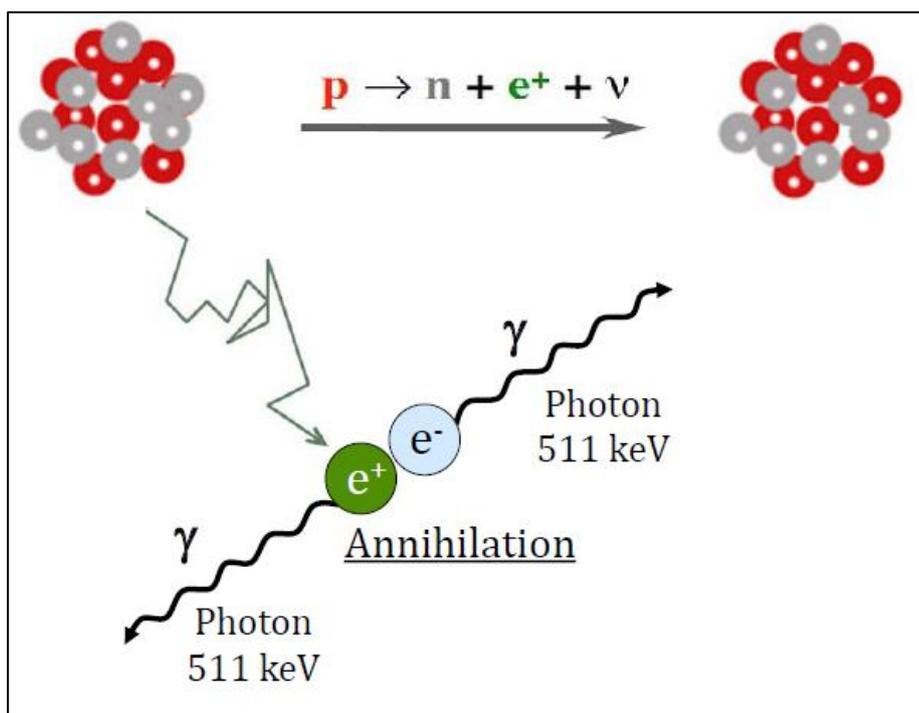


Figure 1 : Schéma de désintégration selon un mode β^+ et de l'annihilation

2. Principes de détection des rayonnements

- Interaction rayonnement-matière

Suite à l'annihilation du positon, survient l'émission en colinéarité de deux photons gamma qui vont réagir avec la matière environnante et transférer leur énergie. Avec une énergie de 511 keV, ce rayonnement électromagnétique est ionisant (énergie suffisante pour arracher un électron à un atome de la matière environnante). Essentiellement, deux types d'interactions avec la matière possibles : l'effet photo-électrique et la diffusion Compton.

L'effet photo-électrique est observé lorsque l'intégralité de l'énergie du photon est transférée à un électron qui sera éjecté de l'atome.

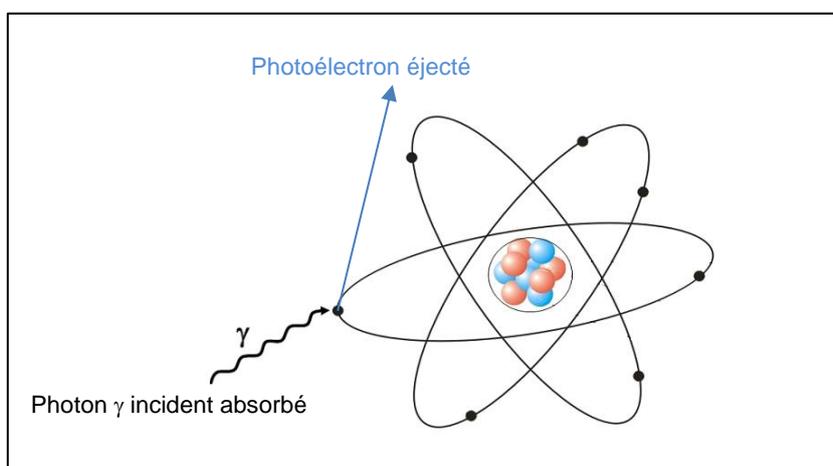


Figure 2 : Schématisation de l'effet photo-électrique

Cependant, le photon incident peut céder seulement une partie de son énergie à un électron. L'électron sera éjecté et le photon diffusé : c'est l'effet Compton.

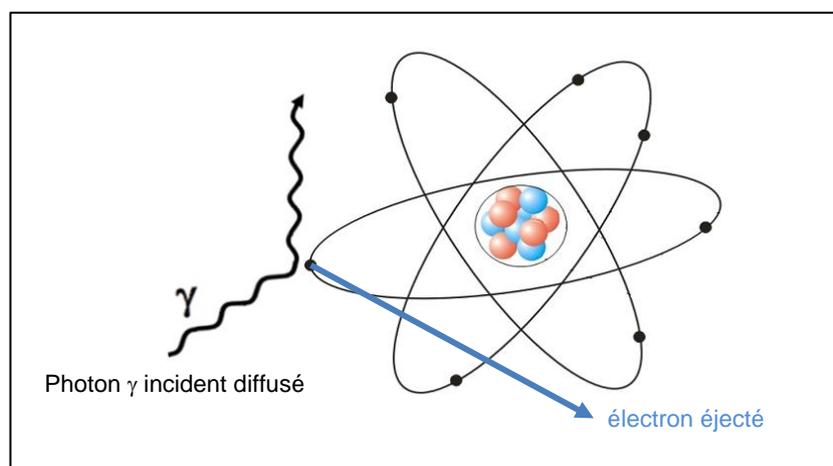


Figure 3 : Schématisation de l'effet Compton

- Chaines de détection pour l'acquisition d'imagerie TEP

Le parcours du positon est très court dans la matière et seuls les photons issus de l'annihilation ont un parcours suffisant pour permettre la détection d'un signal. Le principe de détection des rayonnements des caméras TEP repose sur l'effet photoélectrique. En effet, la chaîne de détection constituant les caméras TEP comporte :

- Un cristal de détection dont la fonction est de convertir le photon γ de 511 keV en photon lumineux.
- De dispositifs d'amplification des photons lumineux issus de l'interaction photoélectrique.
- De dispositifs de conversion des signaux lumineux en signaux électriques
- De dispositifs de traitement informatique des signaux électriques.

La détection en coïncidence des photons d'annihilation permet de localiser le lieu d'annihilation situé à quelques mm du point de désintégration de l'atome radioactif.

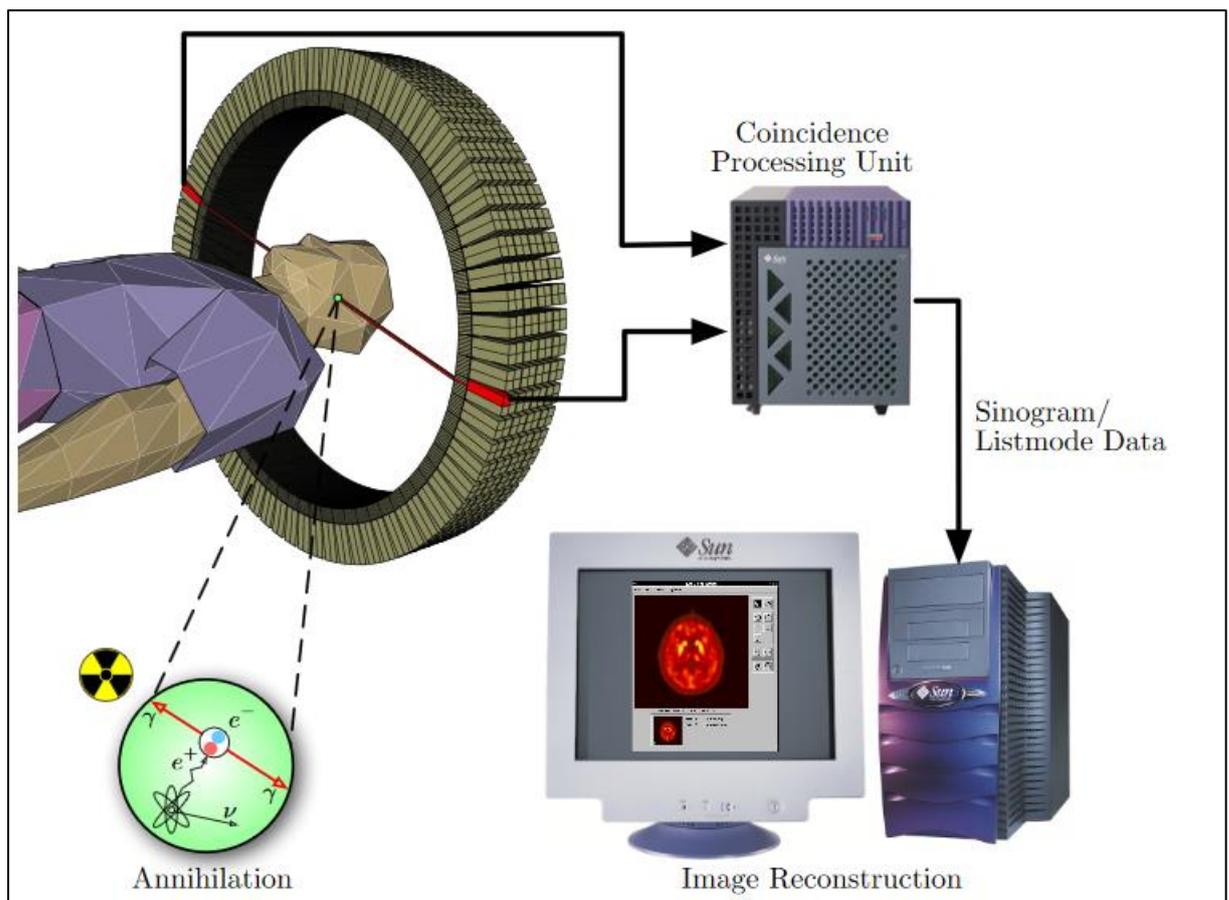


Figure 4 : Schéma du principe de fonctionnement d'une caméra TEP issu du mémoire de J.Lange - *Development of a Parallel Computing Optimized Head Movement Correction Method in PET* (2003)(1)

- Chambres à ionisation, activimètres et détecteurs de radioactivité

Les détecteurs à ionisations actifs exploitent le caractère ionisant des rayonnements. Ils sont composés d'un milieu détecteur constitué de gaz ou d'un matériel semi-conducteur. La forte tension appliquée au milieu détecteur permet de transporter les électrons et les ions créés par un phénomène d'ionisation lors du passage d'un rayon. Le signal électrique formé est alors amplifié et traité informatiquement pour indiquer une activité exprimée en nombre de désintégration par unité de temps.

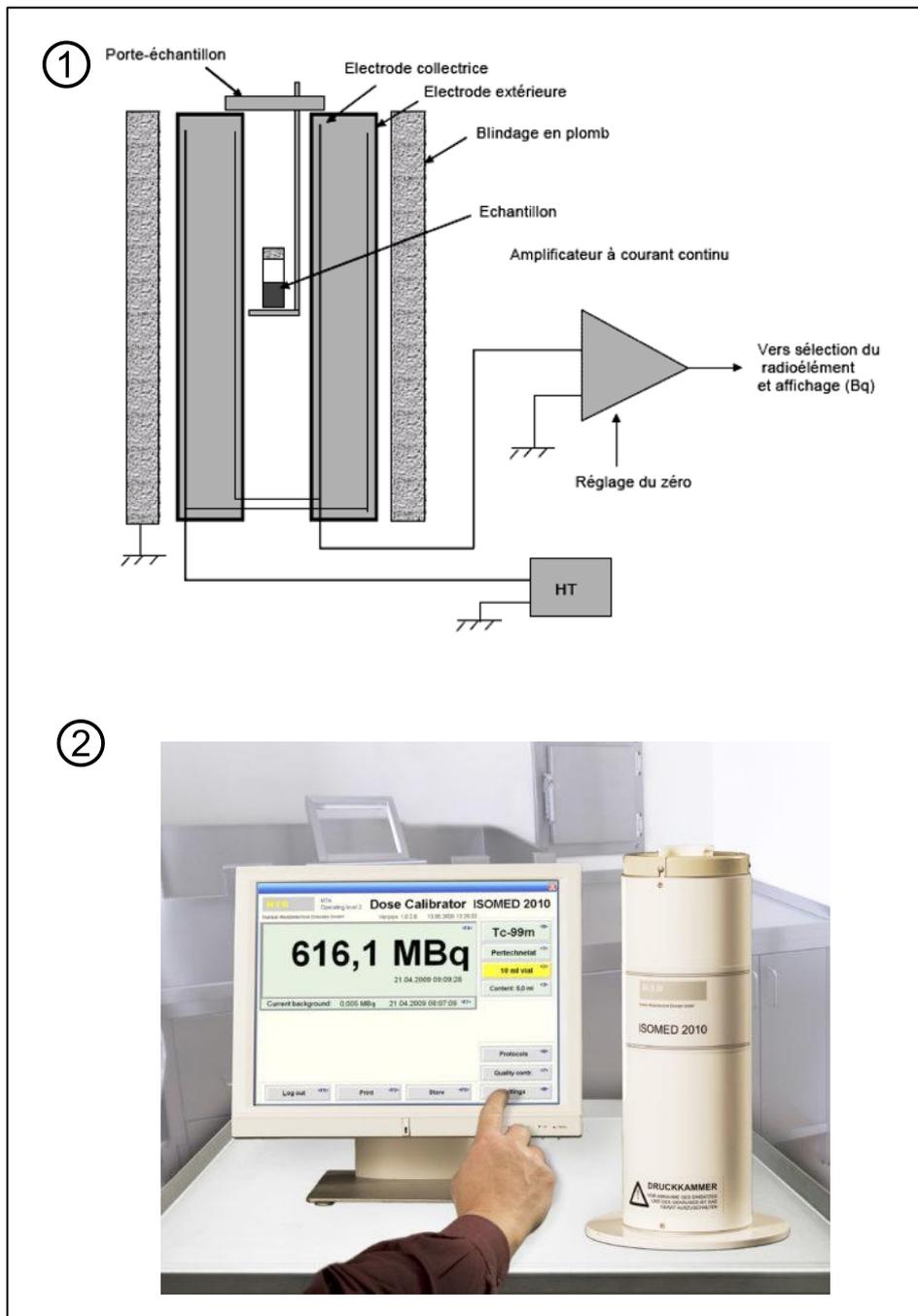


Figure 5 : ① Circuit descriptif d'une chambre à ionisation ② Illustration de l'activimètre ISOMED 2010® et de son interface graphique

3. Radionucléides utilisables en TEP

Plusieurs radionucléides peuvent être utilisés pour l'exploration en imagerie nucléaire par TEP. Leurs caractéristiques physico-chimiques sont d'intéressants critères d'évaluation pour leur application en TEP. En effet, on peut retenir les caractéristiques suivantes :

- Le rapport d'embranchement β^+ (probabilité de désintégration selon un mode β^+) est important car il influence la qualité des images : Si la désintégration emprunte un autre mode qui émet des photons d'une énergie proche de 511 keV, la qualité des images pourraient être dégradée par l'augmentation du bruit détecté.
- La faible énergie de certain positon permet de réduire le parcours libre, rapprochant le phénomène d'annihilation du lieu de désintégration et augmentant la résolution spatiale.

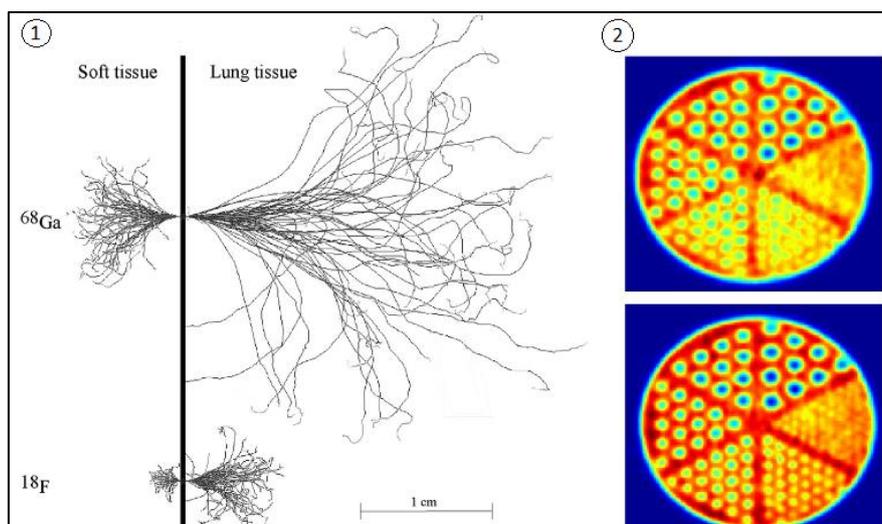


Figure 6 : Illustration de l'impact de l'énergie du positon sur le parcours du positon dans la matière et la résolution d'une acquisition en TEP d'un fantôme de Jaszczak. *Extrait de A.Sanchez-Crespo et Al. (2012)(2)*

- La demi-vie radioactive qui ne doit pas être trop longue pour des problématiques dosimétriques (irradiation et gestion des déchets), ni trop courte afin de permettre une acquisition des images compatible avec la biodistribution du traceur.

- La famille d'élément chimique du radioélément va influencer les stratégies de radiomarquage des traceurs possibles. Une stratégie possible est d'armer la molécule vectrice d'un groupement chélateur pouvant accueillir le radioélément. Cependant, il faut veiller à ce que la fonctionnalisation du vecteur ainsi que le processus de radiomarquage n'altèrent pas ses propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques.
- Le mode de production impactera le coût et les modalités d'approvisionnement.

Le tableau suivant présente les différents critères des principaux radionucléides exploités en TEP :

| Radionucléides | Demi-Vie (h) | β max (MeV) | Ratio β max (%) | Production |
|----------------|--------------|-------------------|-----------------------|------------|
| Rubidium-82 | 0,02 | 3,15 | 100 | Générateur |
| Carbone-11 | 0,34 | 0,96 | 100 | Cyclotron |
| Gallium-68 | 1,1 | 1,9 | 89 | Générateur |
| Fluor-18 | 1,8 | 0,63 | 97 | Cyclotron |
| Cuivre-64 | 12,7 | 0,66 | 18 | Cyclotron |
| Yttrium-86 | 14,7 | 3,15 | 34 | Cyclotron |
| Zirconium-89 | 78,4 | 0,9 | 23 | Cyclotron |
| Iode-124 | 100,2 | 2,14 | 24 | Cyclotron |

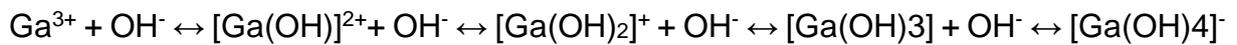
Tableau 1 : Principales caractéristiques physiques et méthode de production des principaux radionucléides utilisables pour l'imagerie TEP

B. Le Gallium-68

1. Propriétés physico-chimiques

Chimiquement, le Gallium-68 est un métal post-transitionnel, du 13e groupe de la classification périodique des éléments dont le degré d'oxydation est de +III en solution aqueuse.

A pH acide (pH<3), le Gallium-68 est sous forme d'ion $^{68}\text{Ga}^{3+}$ soluble en phase aqueuse. Seule cette forme soluble peut être complexée aux précurseurs. En effet, à pH plus basique (pH>3) le Gallium se présente sous les formes suivantes :



Physiquement, le Gallium-68 se désintègre selon un mode β^+ (88%) majoritaire ou par capture électronique (11%). Sa demi-vie de 68 minutes est compatible avec la biodistribution des traceurs historiquement utilisés pour l'imagerie TEP (^{18}F FDG, ^{18}F -DOPA, ^{18}F -Choline) tout en limitant les contraintes liées à la gestion des déchets radioactifs.

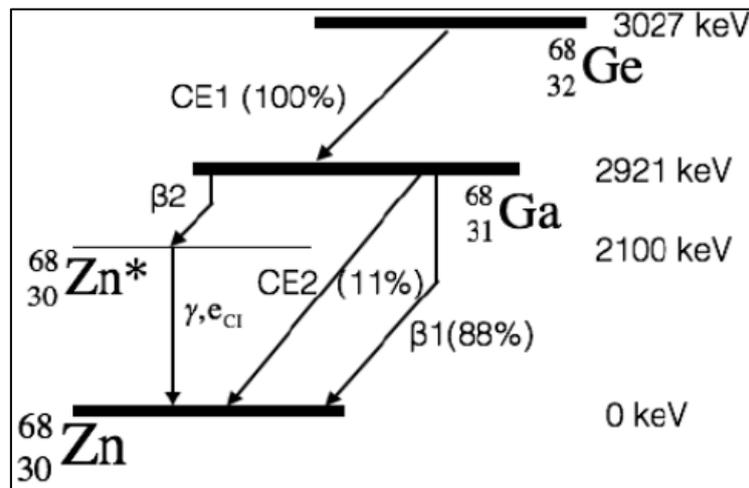


Figure 7 : Schéma de désintégration du ^{68}Ge et du ^{68}Ga

2. Production du Ga-68

A l'instar du Fluor-18 ou du Cuivre-64 qui nécessitent l'emploi de lourdes infrastructures type cyclotron, le Gallium-68 peut être obtenu par une simple élution d'un générateur de type $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$.

L'exploitation de cyclotrons impose le recrutement d'une équipe spécialisée (pharmaciens, ingénieurs et techniciens) et la réalisation de maintenance. S'ajoute également un processus d'élimination des impuretés du produit obtenu pouvant perturber les réactions de radiomarquage (exemple : Zinc).

Enfin, le transport des matières peut alourdir le coût d'approvisionnement en radionucléides issus d'un cyclotron, les structures pouvant être très éloignées du site d'exploitation.



Figure 8 : Photographie du cyclotron ARRONAX (Nantes)

Ainsi s'explique l'intérêt pour les deux générateurs de ^{68}Ga qui possèdent une autorisation de mise sur le marché (AMM) : le GalliaPharm et le GalliAd®.

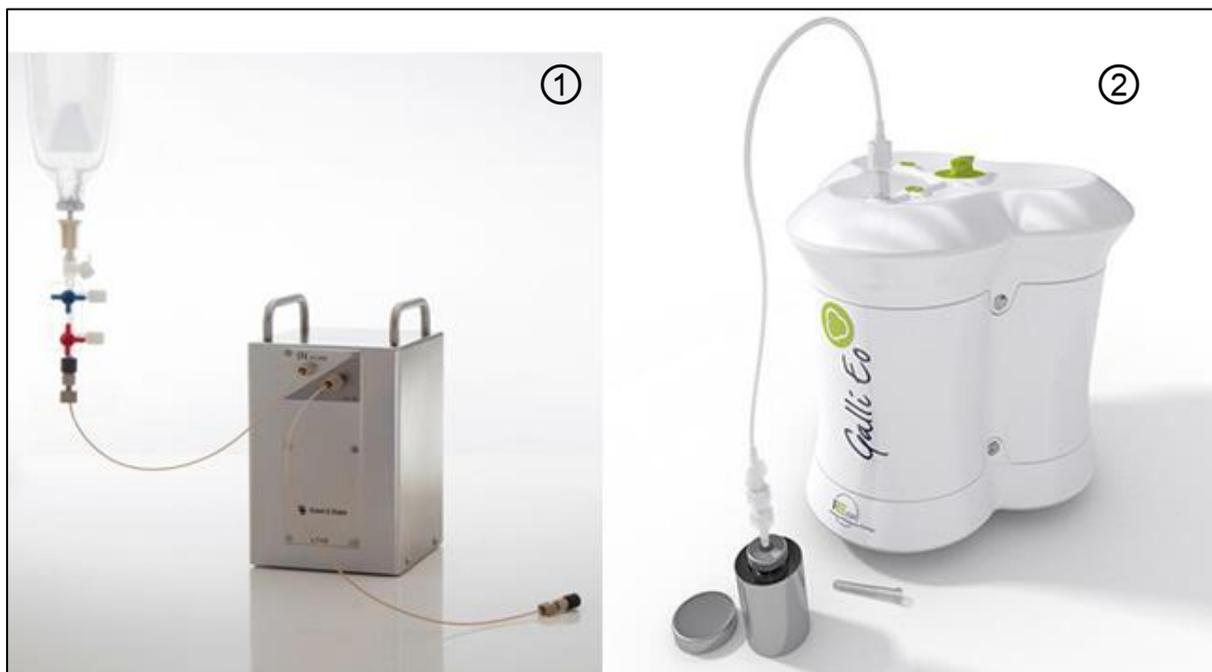


Figure 9 : Photographies des générateurs ① GalliaPharm® et ② GalliAd® issues des sites www.base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr et www.ire.eu

Le principe de fonctionnement des générateurs de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ repose sur la rétention de l'élément père, le Germanium 68 sur une colonne inorganique composée d'oxyde de titane (TiO_2). Ainsi, par décroissance de l'élément père, le Gallium-68 va s'accumuler. L'élution de cette colonne par une solution de HCl 0.1M permet d'obtenir un éluat riche en ions $^{68}\text{Ga}^{3+}$. Le rendement d'élution est supérieur à 70% (c'est-à-dire que l'on peut extraire 70% de l'activité totale de ^{68}Ga disponible à l'instant t), sous réserve d'une élution quotidienne du générateur et du respect des préconisations du fabricant. Le taux d'impuretés en ^{68}Ge est inférieur à 0,001%, assurant une grande pureté radionucléidique (c'est-à-dire que l'activité est due à la désintégration du ^{68}Ga). De plus, après un délai de 4h, plus de 90% de l'activité en Ga-68 disponible est régénérée.

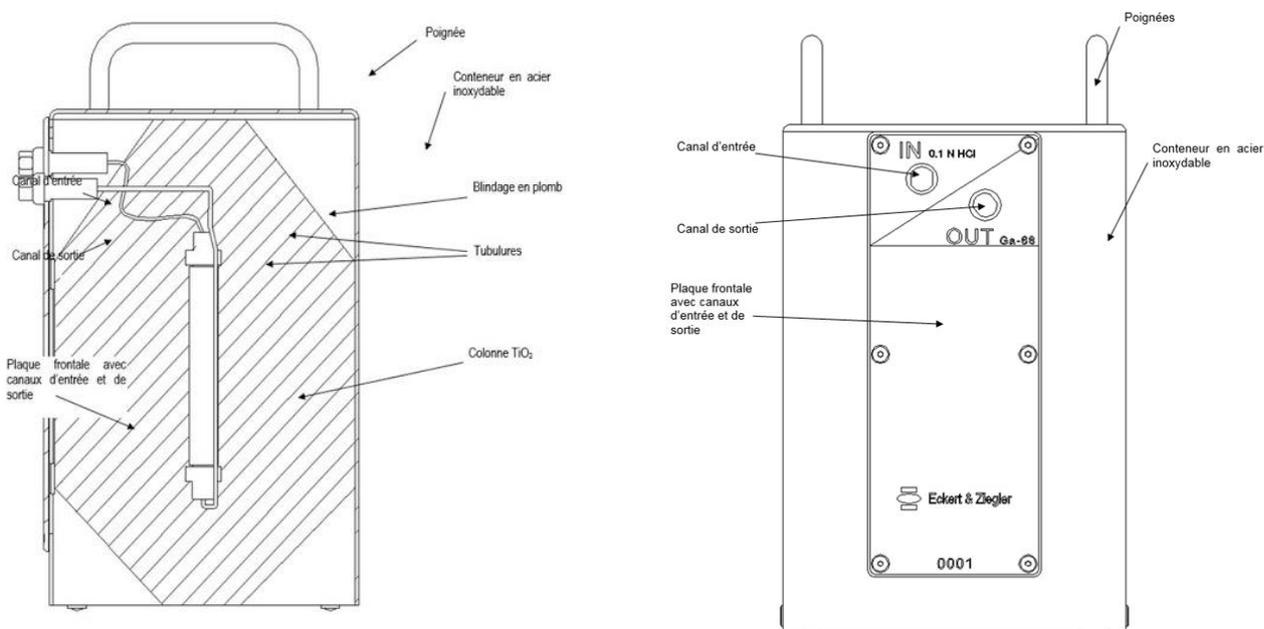


Figure 10 : Vue en coupe et vue frontale du générateur GalliaPharm®, extrait du RCP.(3)

Le choix du ^{68}Ga pour l'imagerie TEP présente donc de nombreux avantages : économique, disponibilité sur site, multiples élutions quotidiennes, statut de médicament radiopharmaceutique.

3. Principes du radiomarquage au Ga-68

Le principe général du radiomarquage d'un traceur au Ga-68 réside en un équilibre entre la solubilité du Ga-68 et la stabilité de la molécule à radiomarquer. En effet, l'ion $^{68}\text{Ga}^{3+}$ est la seule forme soluble de Ga-68 que l'on peut complexer sur une structure chélatrice. Or, le pH qui permet de travailler avec cet ion est très acide et défavorable à la stabilité de nombreux peptides et molécules. Le compromis consiste à utiliser une solution tamponnée permettant la chélation du Ga-68 tout en assurant une relative stabilité du complexe obtenu.

De plus, pour radiomarquer la molécule, celle-ci doit être en capacité de complexer le Ga-68. Un groupement chélateur est ainsi ajouté à la molécule afin de pouvoir réaliser cette réaction de chélation. Plusieurs chélateurs sont décrits dans la littérature dont les différentes caractéristiques influencent les conditions de radiomarquage : pH, durée et température de réaction.

Idéalement, les chélateurs doivent être utilisés dans des conditions simples, avoir une interaction forte avec le Ga-68 et être stable même en conditions *in vivo* afin de limiter les fixations non spécifiques en TEP et de maintenir un rapport « signal sur bruit » élevé.

Afin d'éviter la présence de Ga-68 libre, une étape de purification peut être utile. L'utilisation de méthode d'extraction liquide-solide, basée sur des cartouches SPE (Solide Phase extraction) peut être intéressante car en plus d'éliminer le Ga-68 libre, elle permet de rendre le produit de radiomarquage compatible à l'usage humain. En effet, l'extraction utilisant une solution aqueuse de NaCl 0,9% avec ou sans éthanol selon la méthode employée, la solution finale possède un pH moins acide que le milieu réactionnel. Enfin, l'extraction permet également de concentrer le radiotraceur et ainsi augmenter l'activité volumique du produit final. (17)

Une filtration stérilisante peut être réalisée en fin de synthèse afin de répondre aux exigences des bonnes pratiques de préparation concernant les préparations aseptiques en système ouvert.

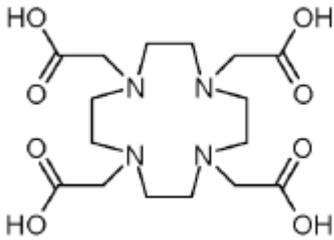
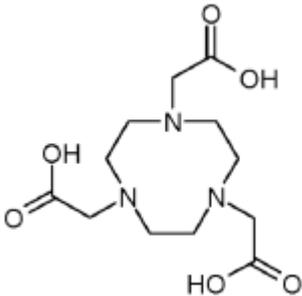
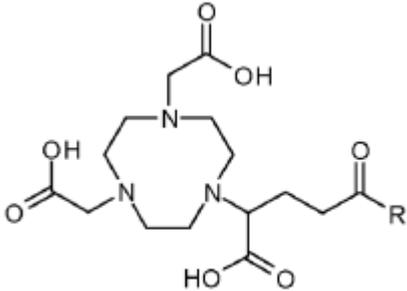
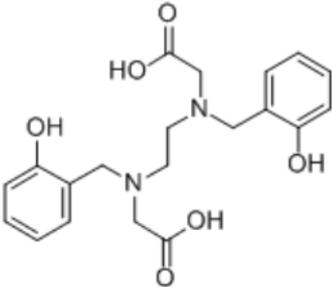
| Chélateur | Structure | Conditions de radiomarquage |
|------------------------|---|--|
| DOTA(18) |  | pH = 4 t = 30 min T° = 85°C Rendement > 95% |
| NOTA(17) |  | pH = 3,5 t = 10 min T° = Ambiante Rendement > 95% |
| NODAGA(19) |  | pH = 3,5 t = 30 min T° = Ambiante Rendement > 95% |
| HBED CC-TFP(20) |  | pH = 3,5 t = 30 min T° = Ambiante Rendement > 95% |

Tableau 2 : Exemples de structures et caractéristiques de chélateurs utilisés pour le radiomarquage de traceurs au Ga-68

4. Intérêt de l'automatisation pour le radiomarquage

Deux aspects importants sont à noter lors de la préparation de radiopharmaceutiques : assurer la stérilité du produit final et limiter la dosimétrie des opérateurs. La réglementation vise à assurer le respect de ces aspects au travers de la décision du 5 novembre 2007 relatives aux BPP(21).

On peut alors noter que, selon le chapitre 6 des BPP, toutes les étapes de préparations médicamenteuses stériles sont réalisées dans des locaux conçus pour assurer la maîtrise de la qualité microbiologique et particulière de l'air.

Aussi, les BPP possèdent des lignes directrices particulières destinés à la préparation de radiopharmaceutiques. Il y est notamment précisé que pour la préparation stérile de radiopharmaceutiques, les locaux doivent être équipés, soit de hotte à flux d'air laminaire, soit d'enceintes blindées (chapitre 9.3). L'enceinte blindée est un dispositif rigide, formant une barrière physique étanche, destiné à limiter la dosimétrie des opérateurs par son blindage tout en évitant la contamination de la préparation. Il est aussi possible d'exploiter des enceintes blindées adaptées à l'utilisation d'automates de synthèse, comportant deux compartiments : l'un en Classe C où seront réalisées les étapes critiques de radiomarquage : élution, transfert d'activité, chauffage, purification, dilution. L'autre en classe A pour l'étape de filtration stérilisante (Chapitre 6.5.3 des BPP) et de préparation de la dose unitaire.

La sécurité microbiologique est renforcée par l'emploi d'automate de synthèse à cassette, utilisant alors du matériel à usage unique stérile et apyrogène.

Les cassettes de radiomarquage forme un dispositif composé de rampes contenant plusieurs robinets 3 voies, sur lesquels sont connectées une seringue et des tubulures pour permettre les opérations de transfert de volume. En plus d'une entrée destinée à être branchée à la sortie du générateur de Ga-68, on y trouve également des emplacements permettant la connexion de flacons contenant les matières premières utilisées dans la réaction de marquage: le peptide précurseur, la solution tampon, la solution de NaCl 0,9%. Enfin, selon les usages, un flacon contenant une solution d'éthanol, une cartouche SPE et un filtre stérilisant peuvent être ajouté.

Pour exploiter ces cassettes et réaliser les opérations précitées : l'automate est équipé de moteurs permettant la rotation de robinets 3 voies, d'un pousse seringue électrique où est logée une seringue utilisée pour transférer un liquide ou de l'air, d'une pompe à air et d'un bain marie sec destiné à recevoir un flacon.



Figure 11 : Photographie d'un automate All-In-One Trasis® où est installé une cassette. Source: <http://www.iphc.cnrs.fr/The-laboratories.html>

C. Exendin-4 : Un analogue du Glucagon Like Peptide-1

1. Découverte et propriétés biologiques

Isolée de la salive du monstre de Gila (*Heloderma suspectum*), l'Exendin-4 est un peptide de 39 acides aminés qui montre une homologie de séquence avec le GLP-1 (*Glucagon Like Peptide 1*), puissante incrétine impliquée aux multiples effets biologique dont la sécrétion d'insuline.(11)



Figure 12 : Photographie de l'*Heloderma suspectum*

Source (<http://flickr.com/photo/39742989@N04/4335749920>)

La liaison du GLP-1 au récepteur du GLP-1 (GLP-1R), situé sur les cellules β des îlots de Langerhans, augmente la concentration en AMPc intracellulaire par activation de l'adénylate cyclase. S'en suit une cascade de mécanismes intracellulaires impliquant la protéine kinase A (PKA) et les canaux calciques dont la finalité conduira à l'exocytose de granules intracellulaires contenant l'insuline. (22)

Cette homologie de séquence permet l'activation du GLP-1R. L'exendin-4 ou exenatide, est utilisée pour la prise en charge du diabète. Elle est commercialisée sous le nom de Byetta®. On observe, par rapport au GLP-1, la présence de 9 acides aminés (PSSGAPPPS) supplémentaires en position C terminale. Cette séquence permet de résister à l'action de la Di-Peptydil-Peptidase IV (DPPIV), et allonge la demi-vie biologique passant alors de 2 min à environ 2,5 heures.(23)

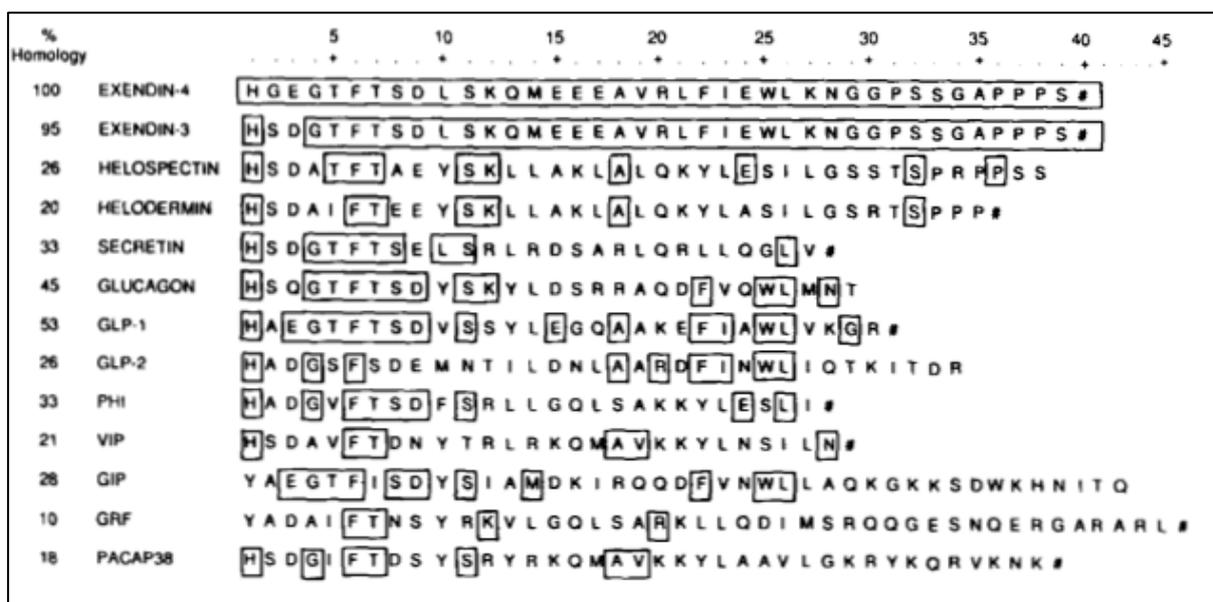


Figure 12 : Séquences peptidique de l'Exendin-3, Exendin-4 et du GLP-1 (7-36) extrait des travaux de J.Eng et Al. (1992)

2. Intérêts de l'imagerie des récepteurs au GLP-1

Dans l'attente de l'obtention d'une AMM ou d'une autorisation temporaire d'utilisation, l'usage, en France, de ce radiotraceur reste limité aux essais cliniques. La prise en charge des insulinomes peut constituer un futur cadre d'utilisation clinique.

Au 21/06/2021, 15 essais cliniques exploitant l'imagerie nucléaire des récepteurs au GLP-1 ont été déclarés sur la plateforme Clinical Trial (<https://clinicaltrials.gov>). Parmi ces essais, 8 sont encore en cours de recrutement et portent sur l'exploration du diabète.

Parmi les essais clôturés, le CHU de Lille a participé à l'essai clinique européen BETACURE (Diagnostic et traitement personnalisés de l'hypoglycémie hyperinsulinémique causée par la pathologie des cellules β) dont l'objectif était de développer l'utilisation de ce radio-traceur pour guider la prise en charge chirurgicale de l'hyperinsulinisme congénital de l'enfant et de l'insulinome. En effet, l'imagerie nucléaire des GLP-1R permet la localisation d'agrégats cellulaires encore appelés « foci » responsables de l'hypersécrétion insulinaire.

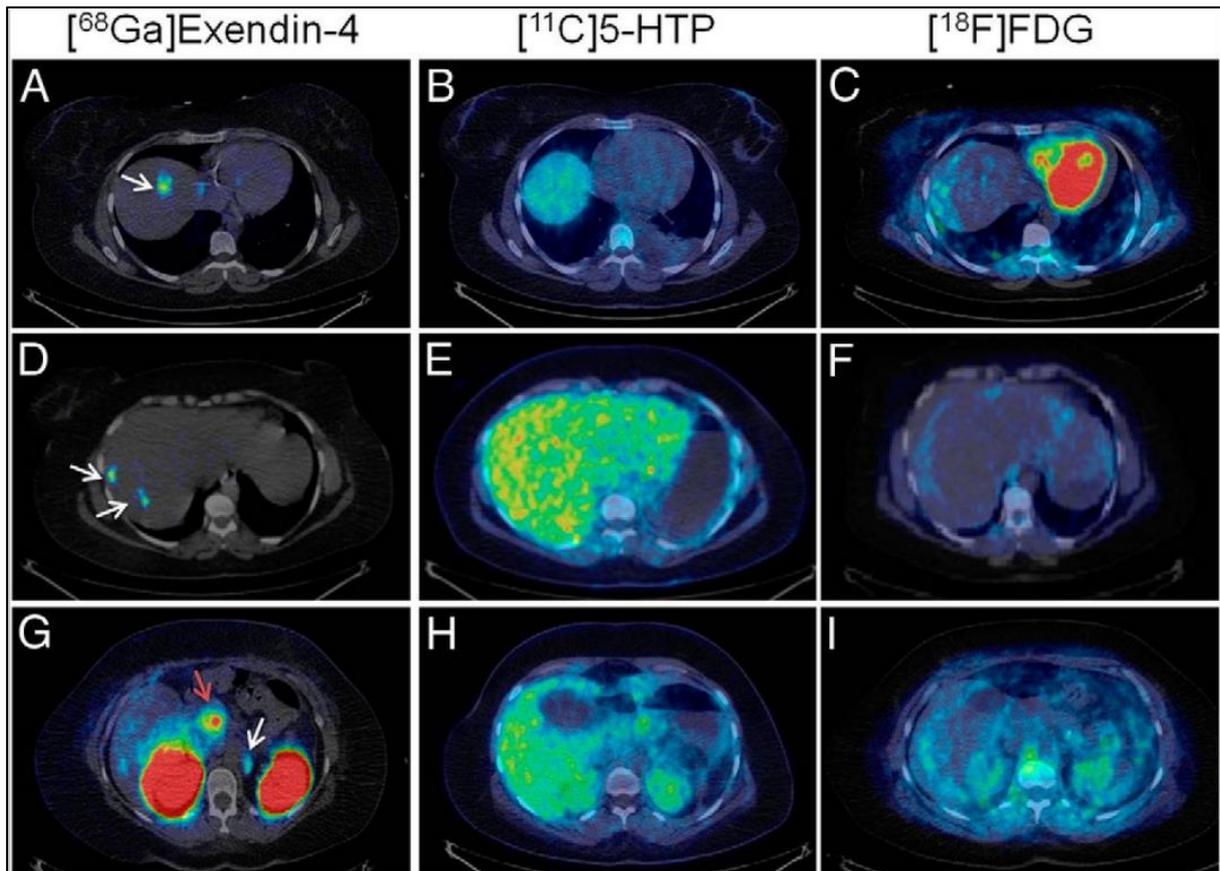


Figure 13 : Coupes abdominales transverses réalisées en TEP injectée au $[^{68}\text{Ga}]$ Exendin-4, $[^{11}\text{C}]$ -HTP et au $[^{18}\text{F}]$ FDG. Les flèches rouges indiquent la fixation naturelle du pancréas. Les flèches blanches indiquent les lésions d'insulinomes. Extrait des travaux de *O.Eriksson et Al.* (2014) (5)

L'enjeu majeur de ce radiotracer pour l'exploration in vivo du diabète vise à pouvoir quantifier le pool de cellules β présent (natif ou greffé) chez un sujet. La démonstration de ce potentiel a été réalisée chez un patient ayant bénéficié d'un greffe autologue d'îlots de Langerhans dans l'avant-bras. Un après la greffe, on pouvait observer par un examen scintigraphique à l'Exendin radiomarkée à l'Indium-111, la fixation des îlots de Langerhans. (4)

La spécificité de la liaison de l'Exendin-4 au GLP-1R renforce la possibilité de détecter un signal émis quasi-exclusivement par ces cellules. Ainsi, la combinaison d'un faible bruit et de l'aspect quantitatif de l'imagerie TEP pourrait permettre d'implanter cliniquement l'utilisation de cette imagerie pour une exploration quantitative et non invasive du diabète.(24)

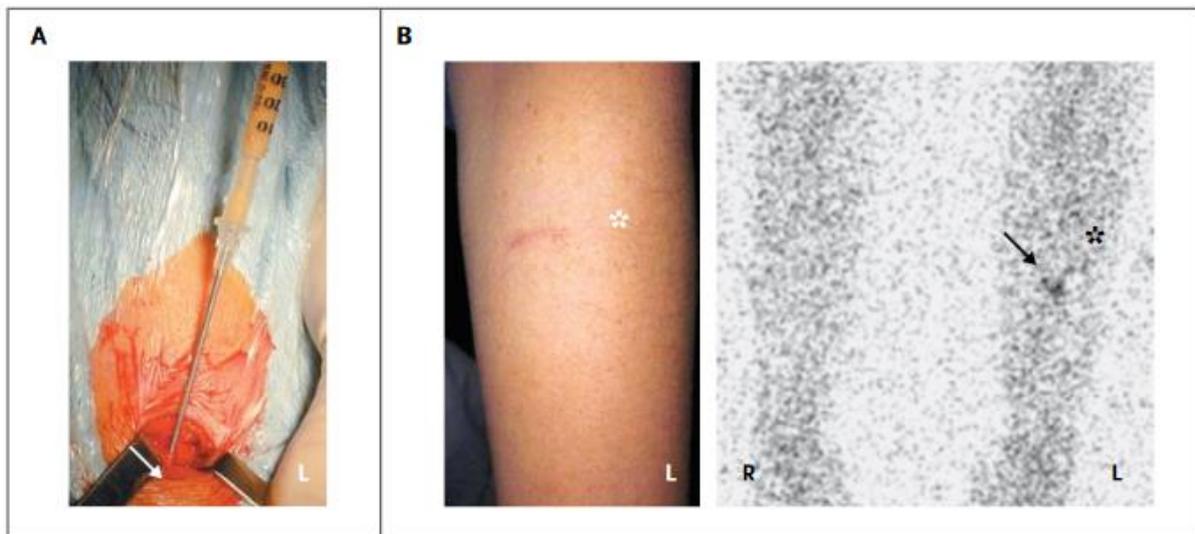


Figure 14 : Scintigraphie à l'Exendin radiomarkée à l'In-111 d'un patient ayant bénéficié d'une autogreffe d'îlots de Langerhans. Extrait des travaux de *F.Pattou et Al.* (2010) (4)

3. Le radiomarquage des dérivés de l'Exendin-4 au Ga-68

Plusieurs dérivés de l'Exendin-4 radiomarqués au Ga-68 ont été décrits dans la littérature. En fonction du groupement chélateur de Ga-68, en cohérence avec les notions abordées durant les principes de radiomarquage au Ga-68, les conditions de radiomarquage diffèrent :

| Structure du dérivé | Cartouche de purification SPE | T° et durée de réaction | Pureté radiochimique |
|--|-------------------------------|---|----------------------|
| DOTA-Exendin-4 (25) | C18 | 90°C, t =30 min | > 95% |
| [Lys40-(AHX-DFO)NH2] Exendin-4 (26), (27) | Pas de post-purification | 95°C, t = 1 min (micro-onde) ou t=10 min (bain-marie) | > 98% |
| NODAGA-Exendin-4 (26) | Pas de post-purification | 95°C, t = 10 min | > 95% |
| DO3A-Exendin-4 (16) | C18 | 75-85°C, t = 15 min | > 90% |

Tableau 3 : Caractéristiques des réactions de marquages des différents dérivés de l'Exendin-4

La seule étude comparant directement deux dérivés de l'Exendin-4 radiomarqués au Ga-68 rapporte une absence de différence concernant le rendement de marquage, la stabilité du produit radiomarqué ainsi que de leur biodistribution (modèle de souris).(26)

Enfin, parmi l'ensemble des dérivés radiomarqués ci-dessus, seule l'équipe de Velikyan et Al.(16) expose une méthode de radiomarquage intégralement automatisée et respectant les exigences des Bonnes Pratiques de Fabrication.

III. MATERIELS ET METHODES

A. Installations, équipements et réactifs

Le processus de radiomarquage a été développé en utilisant un automate MiniAIO® (Trasis) piloté par le logiciel Trasis Suite Software (Trasis, Version 2.31 Rev1). L'automate était placé dans une enceinte blindée H700 (Trasis) produisant un flux d'air laminaire de classe C selon les bonnes pratiques de préparation (BPP 2007). Cette enceinte blindée était disposée dans une zone à atmosphère contrôlée de classe D selon les BPP.

Le MiniAIO® était équipé d'une cassette de radiomarquage de peptide sans pré-purification (Trasis, Référence S7577, Version E) connectée à un générateur Galliapharm, à un collecteur de déchets en verre et, par un filtre 0.22µm assurant la filtration stérilisante lors de la formulation du produit fini, à un flacon en verre neutre de type 1 de 15mL (Ph.Eur.). Les mesures d'activité radioactives ont été relevées à l'aide d'une chambre à ionisation Isomed 2010 (Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH, Dresden, Allemagne). La disposition du matériel est représentée dans la figure 1.

L'intégralité des réactifs de synthèse utilisés dans cette étude était de qualité pharmaceutique à l'exception de l'Exendin-4-DO3A-VS-Cys⁴⁰ (CS Bio Co., Californie, ESA) : Ethanol absolu EMPROVE® (Merck, Darmstadt Allemagne), Acétate de sodium trihydrate (Merck), NaCl 0,9% (Aguettant, Lyon, France), HCl 0,1M (E&Z). Pour le contrôle qualité, les réactifs utilisés en HPLC et CCM étaient : Acide Trifluoroacétique, Acétonitrile, et Acétate d'ammonium, Méthanol respectivement.

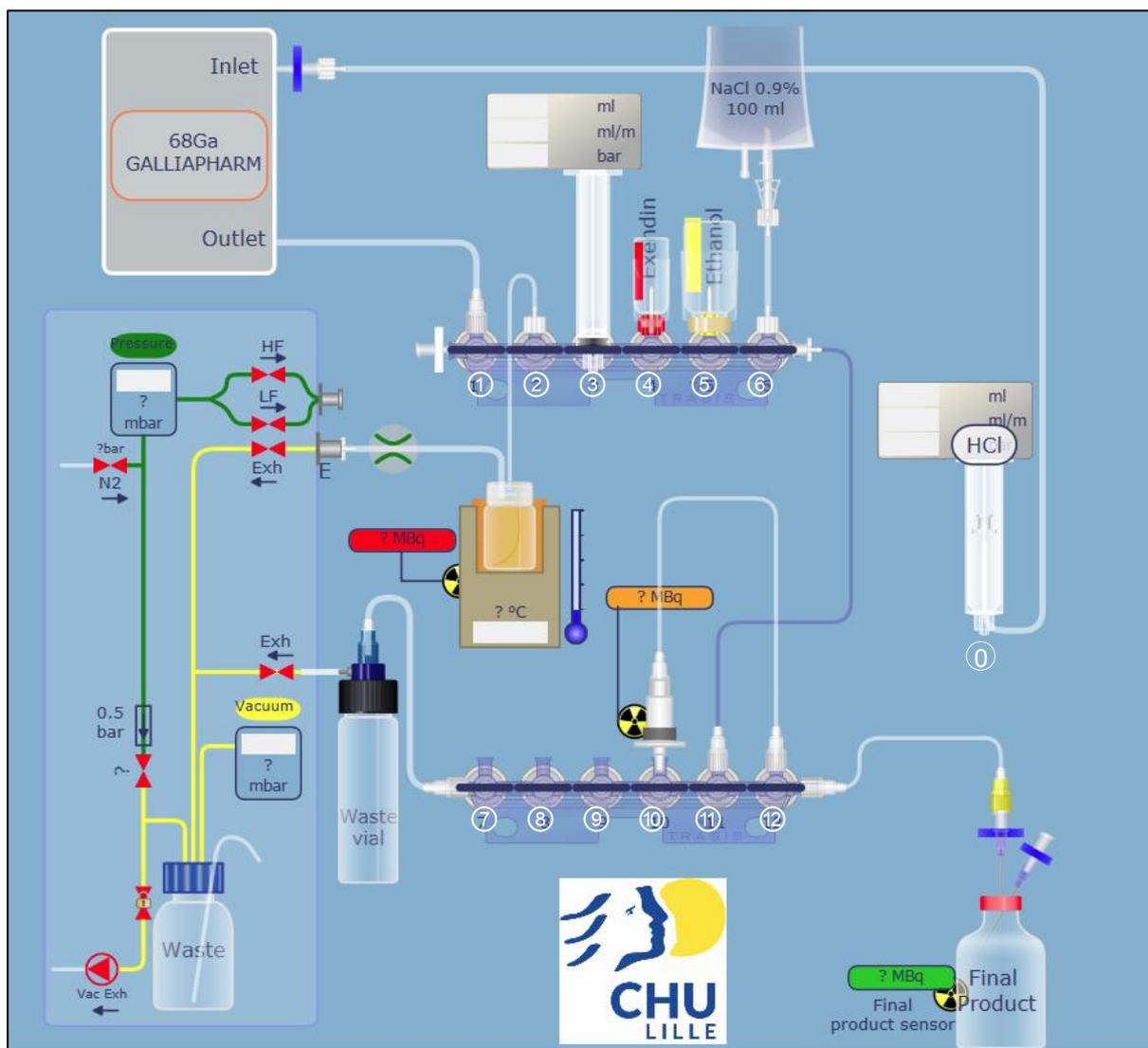


Figure 15 : Représentation de la disposition du matériel dans le logiciel pilotant l'automate MiniAIO®.

B. Schéma de synthèse de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO3A-VS-Cys}^{40}\text{-Exendin-4}$

Préalablement au radiomarquage, la première étape consiste à formuler le flacon d'éthanol absolu et à reconstituer le peptide dans 1 mL d'acétate 0.7M (pH 4,6) sous flux air laminaire de Classe A (BPP). La solution contenant le peptide (10 nmol, 50 μ g) est transférée vers le flacon réactionnel. Le générateur de ^{68}Ga est élué par l'injection de 5mL d'HCl 0,1 M contenu dans la seringue en position 0 et l'éluat ($[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$) est transféré dans la seringue située en position 3. L'éluat est injecté dans le flacon réactionnel qui est ensuite chauffé à 80°C pendant 15 minutes. Après cette étape, le milieu réactionnel est refroidi dans la seringue (Pos. N°3) par dilution dans un volume de 5mL de NaCl 0,9%. Le produit contenu dans la seringue (Pos. N°3) est ensuite transféré vers la cartouche de purification (Oasis SEP-Pak HLB).

Le flacon réactionnel est rincé avec 4mL de NaCl 0,9% et le produit de ce rinçage est transféré vers la cartouche SPE (extraction en phase solide, Pos. N°10). Lors de l'étape de purification utilisant la cartouche, les impuretés radiochimiques (^{68}Ga libre et colloïdes de ^{68}Ga) sont envoyées dans le flacon déchet. Puis, la cartouche SPE est éluée avec 1mL d'éthanol pour récupérer le ^{68}Ga -DO3A-VS-Cys40-Exendin-4. Enfin, 9,5 mL de NaCl 0,9% sont transférés vers le flacon stérile au travers de la cartouche et du filtre stérilisant 0.22 μm pour la formulation du produit final. Le processus du radiomarquage est représenté dans la figure 2.

Après l'étape de formulation, un test d'intégrité du filtre stérilisant est réalisé en percutant le filtre monté de l'aiguille utilisée lors du processus du radiomarquage sur un flacon stérile ventilé.

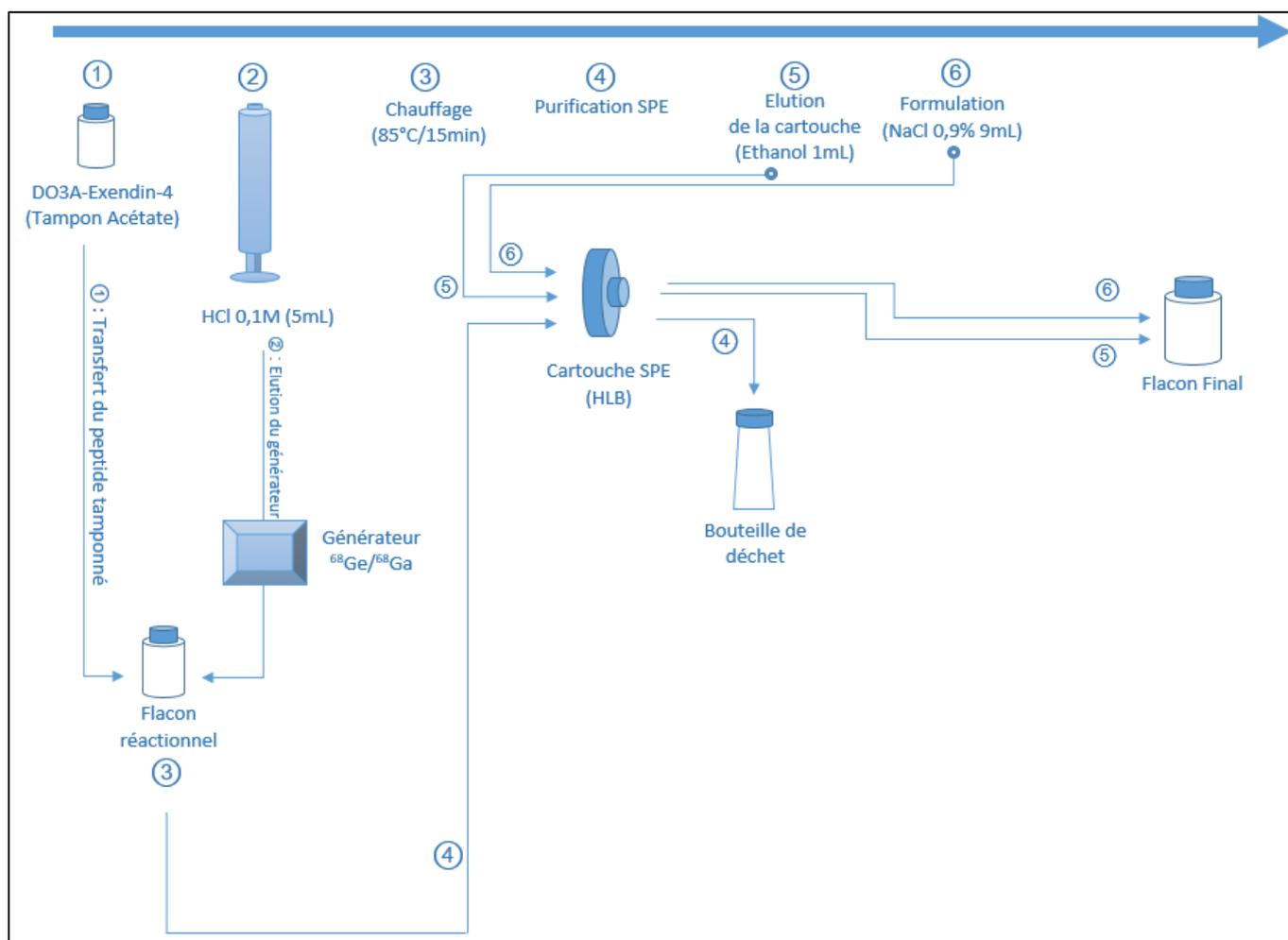


Figure 16 : Diagramme du processus de radiomarquage de l'Exendin-4.

C. Contrôle qualité et mesures d'activité

Avant le radiomarquage, une inspection visuelle de la cassette ainsi que les tests automatisés d'étanchéité furent réalisés.

Pendant le radiomarquage, un contrôle du rendement d'élution avait lieu lors du transfert d'activité dans le flacon réactionnel. Le rendement d'élution était exprimé en pourcentage de la radioactivité éluee lue par un détecteur de radioactivité, par rapport à la radioactivité totale prévue théoriquement avec correction de la désintégration du ^{68}Ge au moment de l'équilibre séculaire.

Après le radiomarquage, l'activité totale du flacon final était mesurée à l'aide d'une chambre à ionisation (Isomed 2010). Un prélèvement était effectué à partir du flacon final sous flux air laminaire de Classe A (BPP) pour le contrôle de qualité selon les paramètres suivant : Identification du radioélément par mesure de la demie vie, pureté chimique et évaluation microbiologique (pH, stérilité et endotoxines), stabilité à température ambiante pendant 4 h (par HPLC) et pureté radiochimique (par HPLC et CCM). Afin d'éviter l'effet inhibiteur de l'éthanol durant les essais d'apyrogénicité , un échantillon du produit final a été dilué avec une solution de sérum physiologique stérile et apyrogène dans un rapport 1:20 (v/v). Les essais d'apyrogénicité étaient réalisés selon la méthode de colorimétrie cinétique (Cartouches Endosafe® nexgen-PTS, Charles Rivers, Wilmington, ESA)(28). La limite de quantification des endotoxines était de 0,20 UI/mL après dilution au 20^e de l'aliquote.

Les essais de stérilité étaient réalisés en incubant 1mL de la solution de produit final dans des milieux BHI (*Brain Heart Indicator*) fabriqués au CHU de Lille (Service de Bactériologie, Centre de Biologie & Pathologie) répondant aux essais de fertilité.(29)

Le système HPLC était équipé d'une pompe (2995, Waters), d'un détecteur UV (2996, Waters) couplé en série avec un détecteur de radioactivité (Flow count, Bioscan). La séparation des analytes était réalisée par l'utilisation d'une colonne (Waters, C18, 250 x 4,6 mm x 10 μm). La phase mobile était composée d'un solvant A (Eau, 0,1% TFA) et d'un solvant B (Acétonitrile, TFA 0,1%). Le système utilisait une élution avec gradient linéaire : 0-3min de 3% à 100% de B, 3-9 min à 100% de B, 9-12min de 100% à 3% de B, 12-15min à 3% de B (Tableau 4). Le débit de la phase mobile était de

1mL/min. L'acquisition et la lecture des données issues de l'HPLC étaient réalisées avec le logiciel Quickstart (EM Power, Waters).

| Temps (min) | Composition du mélange (%ACN ; TFA 0.1M/Eau ; TFA 0.1M) |
|--------------------|--|
| 0 – 3 | 3% - 100% |
| 0 – 9 | 100% - 100% |
| 9 – 15 | 100% - 3% |

Tableau 4 : Description de l'évolution du gradient de concentration utilisé dans la méthode de contrôle par HPLC du produit fini.

Pour la radiochromatographie couche mince (CCM), la phase stationnaire était des bandes ITLC/SG (Agilent Technologies, Santa Carla, ESA) et la phase mobile était composée d'un mélange acétate d'ammonium / méthanol (1 :1 ; v/v). La méthode de contrôle par Radio-CCM permet de séparer, le produit radiomarqué détecté au point de dépôt, le Gallium-68 libre migrant au front de solvant.

En l'absence de monographie spécifique, les critères d'acceptation (tableau 6) sont définis par les essais exigés dans les monographies de substances semblables ou, le cas échéant, définis par la littérature.

| Test | Critère d'acceptation | Référence |
|----------------------------------|---------------------------------------|--|
| Pureté radiochimique | >95% <5% d'impureté non identifiée | Ph.Eur.10.0 Texte n°3044 |
| pH | 5 – 8 | Ph.Eur.10.0 Texte n°3044 |
| Activité volumique | 5 – 130 MBq/mL | <i>Velikyan et Al.</i> (14) |
| Activité | 50 – 1300 MBq | <i>Velikyan et Al.</i> (14) |
| Aspect | Incolore | Ph.Eur.10.0 Texte n°3044 |
| Activité spécifique | 1 – 150 MBq/nmol | <i>Velikyan et Al.</i> (14) |
| Pureté radionucléidique | >99,9% | Ph.Eur.10.0 Texte n°3044 Ph.Eur.10.0 Texte n°2464 |
| Traces de ⁶⁸Ge | <0,001% | Ph.Eur.10.0 Texte n°3044 |
| Stabilité (en% PRC) | >95% durant 120 min | <i>Velikyan et Al.</i> (14) |
| Taux d'éthanol | <10% | Ph.Eur.10.0 Texte n°3044 |
| Endotoxines | <15 EU/ml | Ph.Eur.10.0 Texte n°3044 |

Tableau 5 : Références des critères d'acceptation du radiomarquage de l'Exendin.

Enfin, pour observer la répartition de l'activité en fin de synthèse, la mesure d'activité à l'aide de l'Isomed 2010 a été réalisé sur la bouteille de déchet, le filtre stérilisant et la cassette dénommée tubulures mais incluant les rampes de robinets 3 voies, le flacon réactionnel et les tubulures.

D. Données et Analyse des données

L'ensemble des expérimentations a été mené en triplicat par les 2 mêmes opérateurs impliqués dans le processus de radiomarquage et de contrôle qualité du produit fini respectivement.

Les valeurs indiquées sont les valeurs moyennes calculées (n=3) avec un intervalle de confiance à 95%. Les valeurs numériques sont présentées sous la forme suivante : Moyenne \pm Intervalle de confiance. Enfin toutes les valeurs d'activité indiquées sont corrigées de la décroissance avec comme heure de calibration, l'heure de fin d'élution du générateur.

IV. RESULTATS

A. Qualification du générateur et de l'équipement

Les contrôles des cassettes (visuel et étanchéité) étaient conformes avant chaque radiomarquage.

L'activité totale de Ga68 éluée était comprise entre 995 MBq et 1074 MBq.

Le rendement d'éluion du générateur Galliapharm® était de $71,84 \pm 2,94$ %.

La demi-vie mesurée de l'éluat était de 68 min.

Le taux de ^{68}Ge résiduel par rapport à la radioactivité totale était de $1,9565 \cdot 10^{-8} \pm 1,8688 \cdot 10^{-8}$ %.

B. Contrôle qualité du produit fini

Le produit final possédait un pH de 4,5. Le rendement de marquage était de $53,36 \pm 0,87$ %. L'activité du produit fini était de $614,19 \pm 32,24$ MBq. La répartition de l'activité dans le filtre, la cartouche SPE, la bouteille de déchet et les tubulures était respectivement de $156,10 \pm 23,25$ MBq, $75,11 \pm 12,57$ MBq, $64,70 \pm 8,25$ MBq et $124,22 \pm 23,15$ MBq.

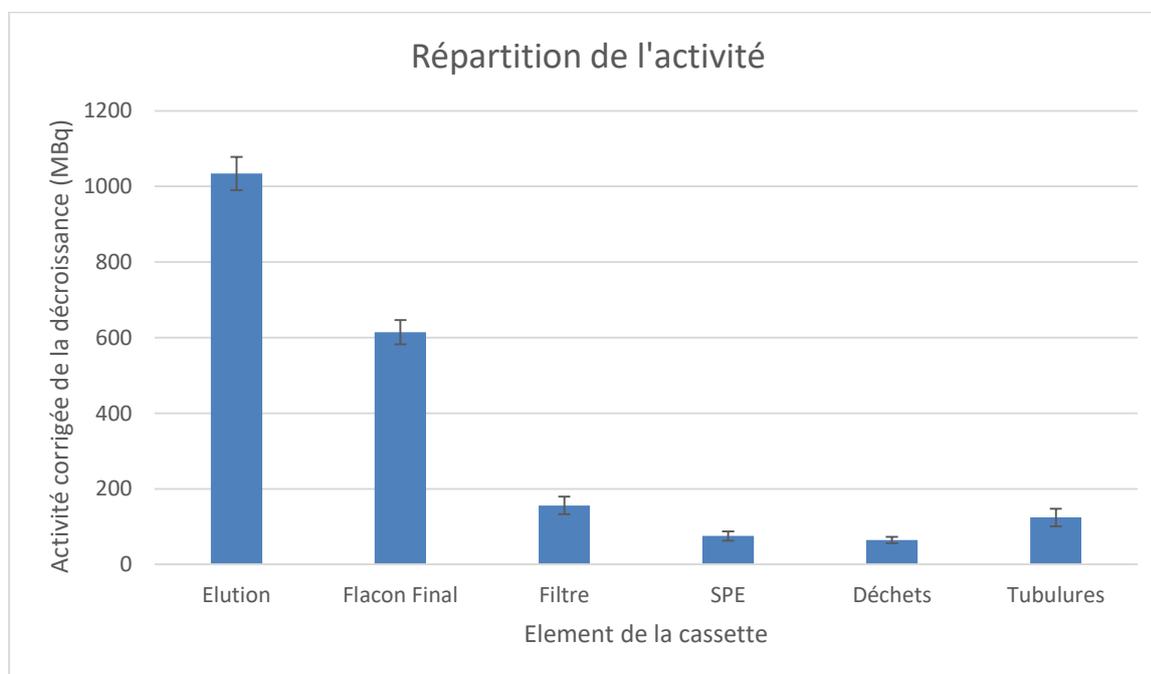
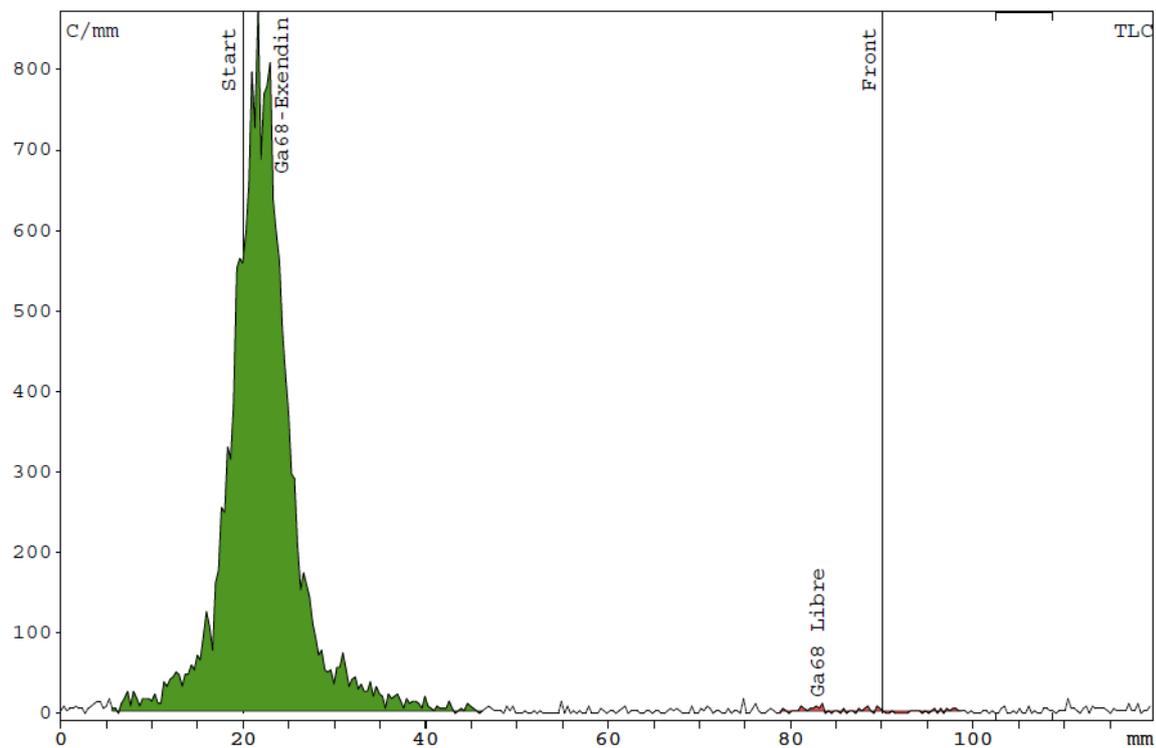


Figure 17 : Répartition de l'activité (MBq) corrigée de la décroissance ($T_{cal} = T_{fin}$ éluion) en fonction des éléments de la cassette.

La méthode de contrôle par Radio-CCM rapportait une pureté radiochimique de $99,19\% \pm 0,81\%$.



Intégration TLC

| Substance | R/F | %Total % | Type | Aire Counts | %Aire % |
|-----------------|-------|----------|------|-------------|---------|
| Ga68-Exendin | 0,033 | 98,83 | DD | 5727,842 | 99,79 |
| Ga68 Libre | 0,896 | 0,21 | DD | 12,316 | 0,21 |
| Sum in ROI | | | | 5740,158 | |
| Aire totale | | | | 5795,895 | |
| Aire RF | | | | 4318,053 | |
| BKG1 | | | | 2,6898 | |
| Remainder RF | | | | -1422,11 | -32,93 |
| Remainder (Tot) | | | | 55,74 | 0,96 |

Figure 18 : Radiochromatogramme (CCM) du produit final contrôlé à t_0 = fin du processus de radiomarquage.

La méthode de contrôle par Radio-HPLC, le gallium-68 libre a été détecté à $t_R = 3,7$ min, le gallium-68 lié à L'Exendin-4 a été détecté à $t_R = 8,6$ min. Il n'y avait pas d'impuretés radioactives détectées autre que le ^{68}Ga libre avec cette méthode Radio-HPLC (Figure 4). La Radio-HPLC a montré que la pureté radiochimique de l'Exendin-4 marquée était de $98,40\% \pm 0,51$.

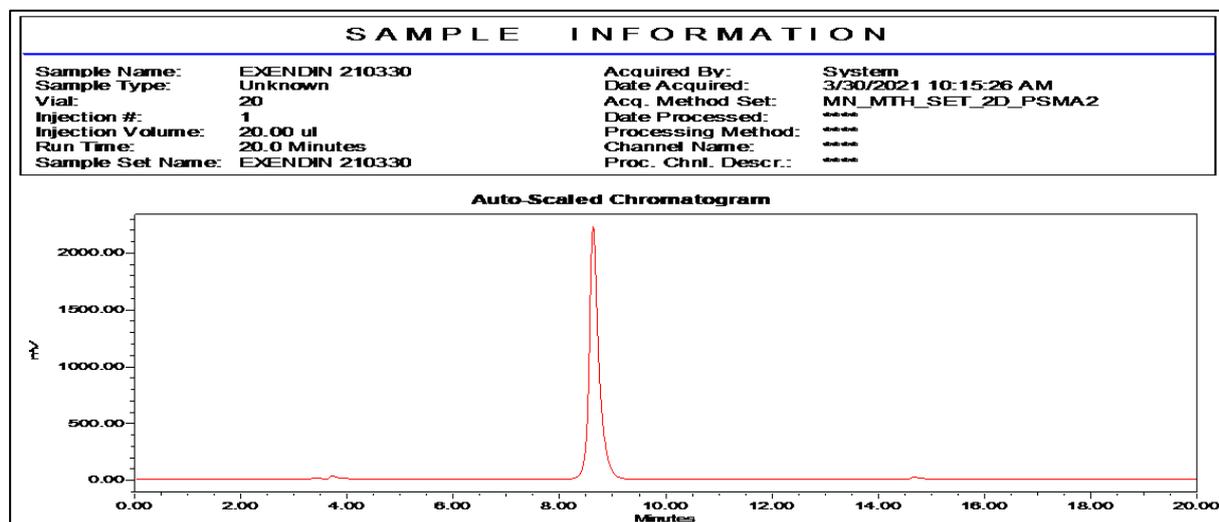


Figure 5 : Radiochromatogramme (HPLC) du produit final contrôlé à t_0 = fin du processus de radiomarquage (30/03/2021).

C. Stabilité radiochimique

La pureté radiochimique de [68Ga]Ga-DO3A-VS-Cys40-Exendin-4 était de $97.87 \pm 0,85\%$ 2 heures après la fin du radiomarquage.

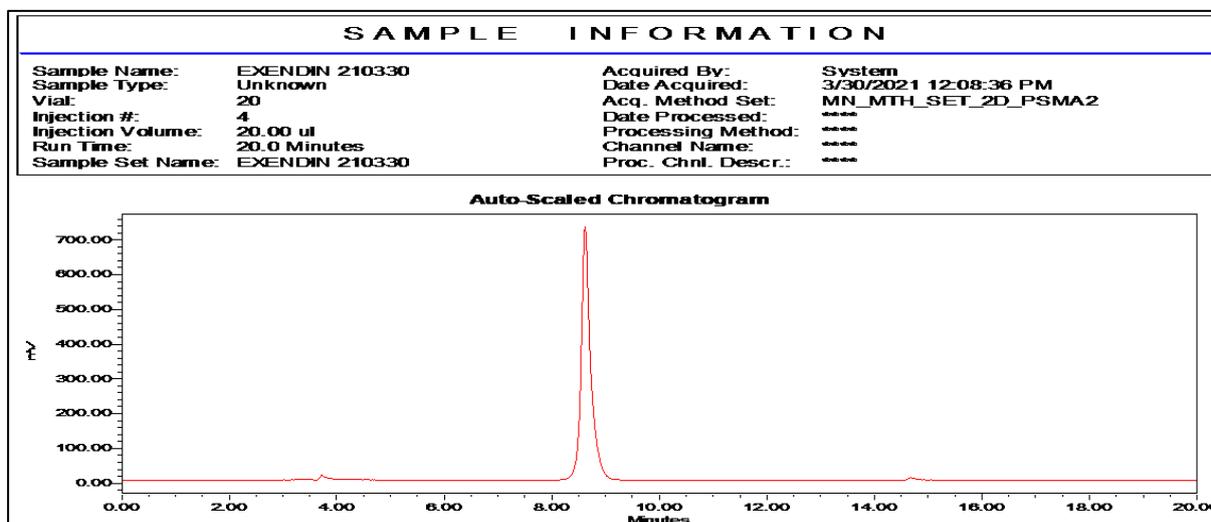


Figure 19 : Radiochromatogramme (HPLC) du produit final contrôlé à $t = t_0 + 2h$.

D. Evaluation microbiologique

Les essais de stérilité et d'apyrogénéité ont révélé l'absence de contamination microbiologique du produit de radiomarquage.

Le taux d'endotoxine détecté était inférieur à 0,200 UI/mL.

| Test | Critère d'acceptation | [⁶⁸ Ga]Ga-DO3A-VS-Cys40-Exendin-4 |
|-----------------------------------|---------------------------------------|---|
| Pureté radiochimique (PRC) | >90% <5% d'impureté non identifiée | 98,40% ± 0,51 |
| pH | 4 – 8,5 | 4,5 |
| Activité volumique | 5 – 130 MBq/mL | 61,42 ± 32,24 MBq/mL |
| Activité | 50 – 1300 MBq | 614,19 ± 32,24 |
| Aspect | Incolore | Incolore |
| Activité spécifique | 1 – 150 MBq/nmol | 61,42 ± 32,24 MBq/nmol |
| Pureté radionucléidique | >99,9% | > 99.9% |
| Traces de ⁶⁸Ge | <0,001% | 1,9565 x10 ⁻⁹ ± 1,8688x10 ⁻⁹ % |
| Stabilité (en% PRC) | >95% durant 120 min | >95% durant 120 min |
| Taux d'éthanol | <10% | <10% |
| Endotoxines | <15 EU/ml | <0,200 EU/ml |

Tableau 6 : Critères d'acceptation et caractéristiques de l'Exendin radiomarquée

V. DISCUSSION

A. Qualification du générateur de ^{68}Ga

Le Gallipharm® est un générateur qui possède une colonne inorganique à base de titane (TiO_2). Le chlorure de ^{68}Ge , élément père du ^{68}Ga , est adsorbé sur cette colonne. La solution de chlorure de ^{68}Ga pour radiomarquage est obtenue par l'élution de cette colonne par une solution de chlorure d'hydrogène. Le Gallipharm® possède une AMM dont le RCP indique le respect des spécifications de la Pharmacopée Européenne pour la solution éluee.(30) Ainsi, pour les radiomarquages décrits, le taux de contamination métallique en Fer et en Zinc (limité à $10\mu\text{g}/\text{GBq}$) n'a pas été exploré. Seuls les taux d'impureté en ^{68}Ge et le rendement d'élution étaient contrôlés.

Conformément aux spécifications du fabricant, le taux d'impureté (limité à 0,001% de l'activité totale éluee) en ^{68}Ge était contrôlé par une mesure d'activité 48h après chaque élution. Pour limiter le relargage en ^{68}Ge , le générateur était élué quotidiennement.

Enfin, pour assurer un rendement d'élution quasi-maximal, l'intervalle de durée entre deux élutions était compris entre 4 heures et 24 heures afin d'obtenir un facteur d'accumulation en ^{68}Ga d'au moins 0,91 selon le RCP du Gallipharm®.

B. Automatisation du radiomarquage

La publication n°103 de la Commission internationale de protection radiologique recommande de maintenir les expositions aux rayonnements aussi bas que possible compte tenu des facteurs socio-économiques. Le principe d'optimisation de la radioprotection connu sous l'acronyme ALARA (As Low As Reasonably Achievable) cautionne l'emploi d'automates pour le radiomarquage de traceurs. En effet, le processus de radiomarquage de l'Exendin nécessitant de nombreuses étapes, les automates de synthèse apparaissent donc comme des ressources qui permettent de réduire la dosimétrie des opérateurs.

De plus, inhérent au processus de radiomarquage, l'automatisation réduit la variabilité inter-opérateur des opérations de transfert des réactifs, de durée et température de chauffage, de purification et de filtration stérilisante. La seule intervention humaine dans le processus de radiomarquage consiste à reconstituer l'Exendin-4 dans le

tampon acétate. L'automatisation permettra donc de limiter les risques d'erreur lors de ces étapes critiques ce qui faciliterait une potentielle qualification BPF de ce processus de radiomarquage.(31)

C. Statut et disponibilité du précurseur

La DO3A-Exendin-4 de qualité BPF n'était pas disponible chez CS Bio au début des essais de mise au point (Septembre 2020). Cependant, la matière première utilisée pour l'automatisation de ce radiomarquage était fournie par le même fabricant et la pureté peptidique était supérieure à 95%. Les résultats obtenus lors de cette étude pourront être exploités pour optimiser le radiomarquage de la DO3A-Exendin-4 de qualité GMP dans le cadre d'un usage clinique.

L'utilisation clinique de ce radiotracteur est limitée à un approvisionnement en matière première de qualité BPF. En effet, aucun dérivé de l'Exendin ne possède de monographie à la Pharmacopée Européenne. De plus, l'article L5138-3 du Code de Santé Publique mentionne que pour la fabrication de médicaments à usage humain, les Pharmacies à Usage Intérieur « *Veillent à n'utiliser que des substances actives fabriquées et distribuées, y compris lorsqu'elles sont importées, conformément aux bonnes pratiques de fabrication et de distribution mentionnées au premier alinéa.* ».

Enfin, en l'absence d'AMM et d'ATU, l'utilisation de ce radiotracteur reste limitée aux essais cliniques. Cette autorisation s'obtient après le dépôt d'un Dossier de Médicament Expérimental (DME) et qui est également requis pour la demande d'autorisation d'essai clinique.

D. Activité spécifique et effets indésirables

Dans les conditions de haute de température (>75°C), la réaction d'incorporation du gallium-68 est influencée par sa durée et par la concentration de peptide introduite. En effet, il a été démontré qu'à partir de 15 minutes de réaction et pour une concentration supérieure à 5µM de peptide, l'incorporation du Gallium-68 était supérieure à 95%.(16) Ainsi, l'utilisation d'une concentration inférieure de peptide provoquerait un risque d'augmenter la concentration de gallium-68 libre dans le produit fini et d'altérer l'interprétation des images obtenues.

A contrario, l'augmentation trop importante de la quantité de peptide ne doit pas induire une injection d'une quantité de peptide supérieure à 10µg chez un patient. L'Exendin faisant parti de la famille des incrétino-mimétiques dont les effets indésirables (vomissement, nausée, hypoglycémie) pourraient compromettre la réalisation de l'examen d'imagerie.(32)

Augmenter l'activité spécifique du produit fini permet alors d'injecter une activité suffisante permettant la détection de lésions tout en limitant la quantité de peptide. L'activité spécifique peut être augmentée en utilisant un éluat de $^{68}\text{GaCl}_3$ à haute activité volumique obtenu par élution fractionnée et ou par la purification SPE de l'éluat.(33).

E. Cassettes et dispositifs médicaux

Deux types d'automates de synthèse sont distingués, les premiers ont leur module constitué de matériel fixe, la seconde inclut des automates dont le module de synthèse repose sur l'emploi de cassette à usage unique. L'utilisation de cassettes permet de limiter le risque de contamination croisée et de contamination microbiologique.(34)

La cassette pour radiomarquage commercialisée par Trasis® (S7577) inclut un filtre stérilisant 0,22µm, un flacon de réaction en verre et une cartouche de purification SPE de type HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance). Cette cartouche permet une rétention importante du peptide (>99,9%) mais un recouvrement moyen (<65%) lorsqu'elle est éluee avec une solution d'éthanol diluée (50% H₂O, v/v). L'emploi d'une cartouche SPE de type RP-SPE (C2) permet d'obtenir un recouvrement très important (>94%) avec une rétention élevée du peptide (97%).(16)

La filtration stérilisante est l'une des étapes qui retient le plus d'activité avec environ 15% de l'activité totale éluee lors de nos expériences. Pour optimiser la quantité d'activité transférée, il faudrait étudier l'impact de l'emploi de filtre ayant une membrane d'épaisseur plus fine.

Enfin, l'activité restant dans la cassette en fin de synthèse pourrait être diminuée en employant un tensioactif comme le polysorbate pour maximiser le transfert d'activité vers la cartouche de purification et le flacon final.

F. Réactifs et contrôle qualité du produit fini

L'éthanol, utilisé pour éluer la cartouche SPE, est un excipient à effet notoire. Le contrôle des résidus d'éthanol dans le produit final nécessiterait d'opérer une analyse par chromatographie en phase gazeuse.(35) Pour limiter le risque lié aux résidus d'éthanol, la formulation du produit comprend une étape de dilution dans un grand volume de NaCl 0,9%. Ainsi la concentration d'éthanol restera inférieure au seuil 10% (v/v) requis pour d'autres peptides radiomarqués au Gallium-68.(36)

La faible quantité de peptide radiomarqué implique une concentration dans le produit fini non détectable par notre chaîne de contrôle HPLC-UV. Afin de permettre un double contrôle analytique, la chromatographie sur couche mince permet de vérifier l'absence de gallium libre. (37)

VI. CONCLUSION

Cette étude démontre la possibilité d'automatiser le radiomarquage de la DO3A-VS-Cys40-Exendin-4 à l'aide d'un automate MiniAIO®. L'utilisation de cet automate permet d'assurer un radiomarquage reproductible, d'une durée raisonnable et limitant l'exposition aux rayonnements des opérateurs. L'automatisation de ce radiomarquage est compatible avec un futur usage clinique.

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Wu Z, Liu S, Hassink M, Nair I, Park R, Li L, et al. Development and Evaluation of ¹⁸F-TTCCO-Cys40-Exendin-4: A PET Probe for Imaging Transplanted Islets. *J Nucl Med*. 1 févr 2013;54(2):244-51.
2. Sanchez-Crespo A. Comparison of Gallium-68 and Fluorine-18 imaging characteristics in positron emission tomography. *Appl Radiat Isot*. juin 2013;76:55-62.
3. ANSM. Répertoire des Spécialités Pharmaceutiques - GALLIAPHARM 0,74 à 1,85 GBq, générateur radiopharmaceutique [Internet]. Répertoire des Spécialités Pharmaceutiques. 2021 [cité 24 févr 2021]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/extrait.php?specid=62091099>
4. Pattou F, Kerr-Conte J, Wild D. GLP-1–Receptor Scanning for Imaging of Human Beta Cells Transplanted in Muscle. *N Engl J Med*. 23 sept 2010;363(13):1289-90.
5. Eriksson O, Velikyan I, Selvaraju RK, Kandeel F, Johansson L, Antoni G, et al. Detection of Metastatic Insulinoma by Positron Emission Tomography With [⁶⁸Ga]Exendin-4—A Case Report. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 mai 2014;99(5):1519-24.
6. Wild D, Mäcke H, Christ E, Gloor B, Reubi JC. Glucagon-like Peptide 1–Receptor Scans to Localize Occult Insulinomas. *N Engl J Med*. 14 août 2008;359(7):766-8.
7. Christ E, Wild D, Forrer F, Brändle M, Sahli R, Clerici T, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Imaging for Localization of Insulinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 nov 2009;94(11):4398-405.
8. Antwi K, Fani M, Nicolas G, Rottenburger C, Heye T, Reubi JC, et al. Localization of Hidden Insulinomas with ⁶⁸Ga-DOTA-Exendin-4 PET/CT: A Pilot Study. *J Nucl Med*. 1 juill 2015;56(7):1075-8.
9. Brom M, Woliner-van der Weg W, Joosten L, Frielink C, Bouckenoghe T, Rijken P, et al. Non-invasive quantification of the beta cell mass by SPECT with ¹¹¹In-labelled exendin. *Diabetologia*. mai 2014;57(5):950-9.
10. Li J, Rawson J, Chea J, Tang W, Miao L, Sui F, et al. Evaluation of [⁶⁸Ga]DO3A-VS-Cys40-Exendin-4 as a PET Probe for Imaging Human Transplanted Islets in the Liver. *Sci Rep*. déc 2019;9(1):5705.
11. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem*. avr 1992;267(11):7402-5.
12. Brom M, Joosten L, Oyen WJG, Gotthardt M, Boerman OC. Radiolabelled GLP-1 analogues for *in vivo* targeting of insulinomas: RADIOLABELLED GLP-1 ANALOGUES FOR GLP-1R TARGETING. *Contrast Media Mol Imaging*. mars 2012;7(2):160-6.

13. Sowa-Staszczak A, Trofimiuk-Müldner M, Stefańska A, Tomaszuk M, Buziak-Bereza M, Gilis-Januszewska A, et al. 99mTc Labeled Glucagon-Like Peptide-1-Analogue (99mTc-GLP1) Scintigraphy in the Management of Patients with Occult Insulinoma. Vella A, éditeur. PLOS ONE. 15 août 2016;11(8):e0160714.
14. Wu Z, Todorov I, Li L, Bading JR, Li Z, Nair I, et al. In Vivo Imaging of Transplanted Islets with ⁶⁴ Cu-DO3A-VS-Cys⁴⁰-Exendin-4 by Targeting GLP-1 Receptor. *Bioconjug Chem.* 17 août 2011;22(8):1587-94.
15. ANSM. Répertoire des Spécialités Pharmaceutiques - GALLIAD 0,74 à 1,85 GBq, générateur radiopharmaceutique [Internet]. 2021 [cité 24 févr 2021]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/extrait.php?specid=60266265>
16. Velikyan I, Rosenstrom U, Eriksson O. Fully automated GMP production of [⁶⁸Ga]Ga-DO3A-VS-Cys⁴⁰-Exendin-4 for clinical use. *Am J Nucl Med Mol Imaging.* juill 2017;7(3):111-25.
17. Velikyan I, Maecke H, Langstrom B. Convenient Preparation of ⁶⁸ Ga-Based PET-Radiopharmaceuticals at Room Temperature. *Bioconjug Chem.* 1 févr 2008;19(2):569-73.
18. Boros E, Ferreira CL, Cawthray JF, Price EW, Patrick BO, Wester DW, et al. Acyclic Chelate with Ideal Properties for ⁶⁸ Ga PET Imaging Agent Elaboration. *J Am Chem Soc.* 10 nov 2010;132(44):15726-33.
19. Berry DJ, Ma Y, Ballinger JR, Tavaré R, Koers A, Sunassee K, et al. Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands. *Chem Commun.* 2011;47(25):7068.
20. Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR, Anderson CJ. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem Rev.* 12 mai 2010;110(5):2858-902.
21. AFFSAPS. Bonnes pratiques de préparation. 2007.
22. Holst JJ. The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiol Rev.* oct 2007;87(4):1409-39.
23. Runge S, Schimmer S, Oschmann J, Schiødt CB, Knudsen SM, Jeppesen CB, et al. Differential Structural Properties of GLP-1 and Exendin-4 Determine Their Relative Affinity for the GLP-1 Receptor N-Terminal Extracellular Domain †. *Biochemistry.* mai 2007;46(19):5830-40.
24. Gotthardt M, Eizirik DL, Aanstoot H-J, Korsgren O, Mul D, Martin F, et al. Detection and quantification of beta cells by PET imaging: why clinical implementation has never been closer. *Diabetologia.* déc 2018;61(12):2516-9.
25. Kalff V, Iravani A, Ackhurst T, Pattison DA, Eu P, Hofman MS, et al. Utility of ⁶⁸ GA-DOTA-EXENDIN -4 PET / CT imaging in distinguishing between insulinoma and nesidioblastosis in patients with confirmed endogenous hyperinsulinaemic hypoglycaemia. *Intern Med J.* 14 déc 2020;imj.15141.

26. Kaeppli SAM, Schibli R, Mindt TL, Behe M. Comparison of desferrioxamine and NODAGA for the gallium-68 labeling of exendin-4. *EJNMMI Radiopharm Chem.* déc 2019;4(1):9.
27. Bauman A, Valverde IE, Fischer CA, Vomstein S, Mindt TL. Development of ⁶⁸Ga- and ⁸⁹Zr-Labeled Exendin-4 as Potential Radiotracers for the Imaging of Insulinomas by PET. *J Nucl Med.* oct 2015;56(10):1569-74.
28. Essai des endotoxines bactériennes (2.6.14). *Pharmacopée Européenne 10.0 / Texte n°20614.*
29. Stérilité (2.6.14). *Pharmacopée Européenne 10.0 / Texte n°20601.*
30. Gallium (68Ga) (chlorure de) pour radiomarquage, (solution de). *Pharmacopée Européenne 10.0 / Texte n°2464.*
31. Velikyan I. Prospective of 68Ga-Radiopharmaceutical Development. *Theranostics.* 2014;4(1):47-80.
32. Fineman MS, Shen LZ, Taylor K, Kim DD, Baron AD. Effectiveness of progressive dose-escalation of exenatide(exendin-4) in reducing dose-limiting side effects in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* sept 2004;20(5):411-7.
33. Decristoforo C, Knopp R, von Guggenberg E, Rupprich M, Dreger T, Hess A, et al. A fully automated synthesis for the preparation of 68Ga-labelled peptides. *Nucl Med Commun [Internet].* 2007;28(11). Disponible sur: https://journals.lww.com/nuclearmedicinecomm/Fulltext/2007/11000/A_fully_automated_synthesis_for_the_preparation_of.8.aspx
34. Aerts J, Ballinger JR, Behe M, Decristoforo C, Elsinga PH, Faivre-Chauvet A, et al. Guidance on current good radiopharmacy practice for the small-scale preparation of radiopharmaceuticals using automated modules: a European perspective: Guideline on automated radiosynthesis. *J Label Compd Radiopharm.* août 2014;57(10):615-20.
35. Identification et contrôle des solvants résiduels. *Pharmacopée Européenne 10.0 / Texte n°20424F.*
36. Gallium (Ga68) PSMA-11 (Solution injectable de). *Pharmacopée Européenne 10.0 / Texte n°3044.*
37. van der Kroon I, Andralojc K, Willekens SMA, Bos D, Joosten L, Boerman OC, et al. Non invasive Imaging of Islet Transplants with 111In-Exendin-3 SPECT/CT. *J Nucl Med.* 1 mai 2016;57(5):799-804.

VIII. ANNEXES

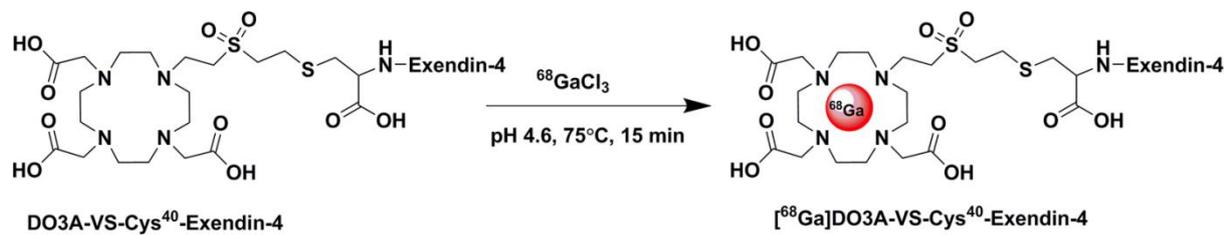
Annexe 1 : Photographie d'une cassette pour le radiomarquage de peptides.



Annexe 2 : Photographie de l'enceinte H700® équipée d'un automate MiniAIO® et d'un générateur Gallipharm®.



Annexe 3 : Représentation graphique de la réaction de radiomarquage de l'Exendin-4-DO3A-VS-Cys⁴⁰ extraite de *Evaluation of [68Ga]DO3A-VS-Cys40-Exendin-4 as a PET Probe for Imaging Human Transplanted Islets in the Liver – Li J et Al. (6)*



Annexe 4 : Certificat d'analyse de l'Exendin-4-DO3A-VS-Cys⁴⁰



Quality Control Record

Product: (DO3A-VS-Cys⁴⁰) Exendin-4
Sequence: His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys(VS-DO3A)-NH₂

Product No.: CS8026 Expected M.W.: 4754.21 Found M.W.: 4755.52 Lot: U508

APPEARANCE: White powder

MOLECULAR WEIGHT VERIFICATION: Confirmed

PURITY: Instrument: Agilent 1260 System 95.08%
Condition: HPLC column in TFA System
Gradient: 30-60% Buffer B in 20 minutes
Buffer A: 0.1% TFA in H₂O
Buffer B: 0.1% TFA in ACN
Wavelength: 214 nm
Column: Phenomenex Luna C18 5µm 100Å,
4.6 x 250 mm

ELLMAN'S TEST: Complies

SUGGESTIONS FOR PEPTIDE DISSOLUTION: Acetonitrile / 0.1% TFA in Water

COUNTERIONS PRESENT: TFA Salt

STORAGE: All peptides should be stored dry at -20°C

This material is not listed as hazardous by *NIOSH/RECS. Therefore, no SAFETY DATA SHEET is required. However, the chemical, physical and toxicological properties of this product have not been thoroughly investigated. Therefore, please exercise due care when handling this material. This action is in compliance with State and Federal OSHA standards and regulations.

Quality Control: 

Date: February 28, 2019

CSBio
20 Kelly Court, Menlo Park, CA 94025 USA
T: (650) 322 1111 • F: (650) 322 2278
www.csbio.com • peptides@csbio.com

DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : BOUKHLEF SAMIR INE : 0903043785G

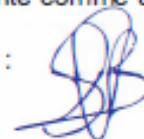
Date, heure et lieu de soutenance :

Le 2/5/2021 à 17h00. Amphithéâtre ou salle : Amphi JOUVET.....
jour mois année

Engagement de l'étudiant - Charte de non-plagiat

J'atteste sur l'honneur que tout contenu qui n'est pas explicitement présenté comme une citation est un contenu personnel et original.

Signature de l'étudiant :



Avis du directeur de thèse

Nom : LEGRAND

Prénom : JEAN - FRANCOIS

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 14.05.2021

Signature: 



Avis du président du jury

Nom : SIMON

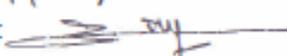
Prénom : NICOLAS

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 07/06/2021

Signature: 

Décision du Doyen

Favorable

Défavorable

9 juin 2021
Le Doyen

B. DÉCAUDIN



NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2020/2021

Nom : BOUKHLEF

Prénom : SAMIR

Titre de la thèse : AUTOMATISATION DU RADIOMARQUAGE AU GALLIUM-68
DE L'EXENDIN-4-CYS40-VS-DO3A EMPLOYANT UN AUTOMATE MINIAIO®

Mots-clés : Exendin-4, GLP-1, Gallium-68, Radiomarquage, Automate MiniAIO

Résumé :

L'automatisation du radiomarquage au gallium-68 de l'Exendin-4-Cys40-VS-DO3A est nécessaire pour une utilisation clinique fréquente. Cette étude démontre que ce radiomarquage peut être réalisée sur un module MiniAIO® muni d'une cassette pour radiomarquage au Ga-68 sans pré-purification et à l'aide d'un générateur Gallipharm®. Tout en assurant une faible variabilité, cette méthode rapporte un radiomarquage de l'Exendin-4-Cys40-VS-DO3A compatible avec un potentiel usage clinique avec une pureté radiochimique du produit radiomarqué supérieure à 95% et stable pendant 2 heures. Le rendement de marquage (corrigé de la décroissance) de $53.36 \pm 0,87$ % rend compatible le transfert de cette méthode pour un usage clinique.

Membres du jury :

Président :

SIMON Nicolas, Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,
Université de Lille – CHU de Lille

Asseseurs :

CHILLON Jean-Marc, Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,
Université d'Amiens – CHU d'Amiens

DEKYNDT Berengère, Pharmacien – Praticien Hospitalier – CHU de Lille

LEGRAND Jean-François, Pharmacien – Praticien Hospitalier – CHU de Lille