



HAL
open science

**EVALUATION DE NOUVEAUX
RADIOPHARMACEUTIQUES Synthèse, évaluation, et
biodistribution de nouveaux radioligands peptidiques de
VCAM-1 et avb3**

Valérie Ardisson

► **To cite this version:**

Valérie Ardisson. EVALUATION DE NOUVEAUX RADIOPHARMACEUTIQUES Synthèse, évaluation, et biodistribution de nouveaux radioligands peptidiques de VCAM-1 et avb3. Médicaments. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00119156

HAL Id: tel-00119156

<https://theses.hal.science/tel-00119156>

Submitted on 7 Dec 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I

U.F.R de Médecine

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Ecole Doctorale : Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

Spécialité : Méthodes de recherche sur l'environnement et la santé

Valérie ARDISSON

EVALUATION DE NOUVEAUX RADIOPHARMACEUTIQUES

**Synthèse, évaluation, et biodistribution
de nouveaux radioligands peptidiques
de VCAM-1 et $\alpha_v\beta_3$**

Directeur de thèse : Dr. Catherine GHEZZI
Co-Directeur de thèse : Dr. Jean-Paul MATHIEU

Composition du jury :

Mr le Professeur Daniel Fagret : Président
Mr le Docteur Jean-claude Madelmont : Rapporteur
Mme le Docteur Louisa Barré: Rapporteur
Mme le Docteur Catherine Ghezzi
Mme le Docteur Marie-Dominique Desruet
Mr le Professeur Pascal Dumy
Mr le Docteur Roberto Pasqualini

**Thèse préparée au sein de l'équipe INSERM 0340 – Radiopharmaceutiques Biocliniques –
Faculté de Médecine de Grenoble – Université Joseph Fourier – Grenoble I.**

Je remercie,

Le Professeur Daniel Fagret, chef du service de médecine nucléaire et responsable de l'équipe INSERM E0340 de radiopharmaceutiques biocliniques, pour avoir considéré mon souhait de rejoindre son équipe, pour m'avoir accueillie dans le service de médecine nucléaire et dans le laboratoire.

Le Docteur Cathrerine Ghezzi, pour avoir accepté de diriger cette thèse, et pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Mr Jean-Paul Mathieu, co-directeur de cette thèse, pour avoir dirigé mon travail, m'avoir fait bénéficier de ses conseils et de sa grande curiosité scientifique et littéraire, et de son encadrement quotidien au laboratoire.

Marie-dominique Desruet pour m'avoir soutenu pendant ces 6 années dans le service de médecine nucléaire et m'avoir permis d'effectuer ma thèse en toute sérénité.

Mr le Docteur Jean-claude Madelmont et Mme le Docteur Louisa Barré d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux.

Mr le Professeur Pascal Dumy et Mr le Docteur Roberto Pasqualini de participer à mon jury.

Didier Boturyn qui nous a fourni les molécules indispensables à cette étude.

Tous les membres du LER et particulièrement ceux qui ont participé à ma formation et qui m'ont aidé à réaliser ce travail. Lucie, pour la culture cellulaire et l'expérimentation animale chez la souris, Alexis pour les électrophorèses et les études précliniques sur le lapin.

Je remercie Pascale, Laurent, René, Catherine, Danièle, pour leur extrême serviabilité, leur gentillesse et leur bonne humeur quotidienne.

EVALUATION DE NOUVEAUX RADIOPHARMACEUTIQUES

**Synthèse, évaluation, et
biodistribution
de nouveaux radioligands peptidiques
de VCAM-1 et $\alpha_v\beta_3$**

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	4
ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION	8
INTRODUCTION GENERALE	9
LES RADIOPHARMACEUTIQUES	11
STRATEGIES DE MARQUAGE.....	14
I) CRITERES DE SELECTION DE L'ISOTOPE	14
I-1) Le rayonnement	14
I-2) La période physique.....	15
I-3) L'isotope de décroissance.....	15
I-4) Le mode de production	15
I-5) Caractéristiques idéales d'un isotope.....	15
I-6) Les radioéléments potentiellement utilisables	16
II) STRATEGIE DU MARQUAGE A L'IODE	17
II-1) Isotopes principalement utilisés	17
II-2) Propriétés physico-chimiques des halogènes	19
II-3) Les principales réactions de marquage à l'iode	20
II-4) Les agents d'iodation	28
II-5) Utilisation des agents oxydants	30
II-6) Le marquage des protéines et des peptides.....	35
II-7) Stabilité de la liaison halogène-vecteur <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	39
II-8) Contrôle de la pureté radiochimique et purification.....	40
III) LE MARQUAGE AU TECHNETIUM 99m (^{99m} Tc)	42
III-1) Propriétés physico-chimiques et obtention du technétium.....	44
III-2) Les complexes organométalliques technétiés.	46
III-3) La synthèse du complexe	49
III-4) Structure générale des complexes technétiés	51
LES CIBLES	68
I) LA PLAQUE D'ATHEROME « VULNERABLE ».....	68
I-1) L'athérosclérose.....	69
I-2) VCAM-1 et athérosclérose	75
I-3) La médecine nucléaire et l'athérome	78
I-4) Conclusion.....	84
II) L' ANGIOGENESE	85
II-1) Angiogenèse et cancer	87
II-2) Les intégrines	89
II-3) Les traceurs radiomarqués de la néoangiogenèse	93
II-4) Les traitements anti-angiogéniques	98
II-5) Conclusion.....	99
MATERIEL	101
I) RADIOPROTECTION	102
II) INSTRUMENTS POUR LES ETUDES ANALYTIQUES.....	102

III) LES PEPTIDES.....	104
III-1) Généralités	104
III-2) Synthèse chimique des peptides.....	106
III-3) Les marqueurs de VCAM-1.....	108
III-4) Les marqueurs de $\alpha v\beta 3$	109
IV) LES REACTIFS ET LES PRODUITS CHIMIQUES	112
V) LES ANIMAUX	112
METHODES	114
INTRODUCTION	115
LES MARQUEURS DE LA PLAQUE D'ATHEROME	117
I PREPARATION DU TRACEUR : REACTION DE MARQUAGE	117
I-1) Marquage à l'iode de B2702 (75-84/84-75) et B2702(84-75)	117
I-2) Marquage au technétium de B2702(84-75)-H et [(B2702(84-75)) ₄ -Raft-H	122
II) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PEPTIDES MARQUES : ANALYSE <i>IN VITRO</i>	127
II-1) Mesure du pKi de B2702 (75-84/84-75)-[¹²⁵ I]	128
II-2) Mesure du coefficient de partage	128
II-3) Détermination de la répartition sanguine des traceurs.....	129
II-4) Mesure de l'affinité aux récepteurs	130
III ETUDES METABOLIQUES	131
III-1) Etudes métaboliques <i>in vitro</i>	131
III-2) Etudes métaboliques <i>in vivo</i>	135
IV) ETUDES PHARMACOLOGIQUES DES TRACEURS : ETUDES PRECLINIQUES.....	135
IV-1) Evaluation du métabolisme et de la distribution des traceurs iodés	136
IV-2) Evaluation du métabolisme et de la distribution de B2702(85-74)-H-[^{99m} Tc] et [B2702(85-74)] ₄ -Raft-H-[^{99m} Tc].....	138
LES MARQUEURS DE LA NEOANGIOGENESE	139
D) OPTIMISATION DES REACTIONS DE MARQUAGE.....	139
I-1) Préparation de traceurs iodés	139
I-2) Marquage indirecte des peptides « $\alpha v\beta 3$ » au technétium 99m	143
II) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES MOLECULES MARQUEES.....	145
II-1) Mesure du coefficient de partage	145
II-2) Détermination de la répartition sanguine	146
III) ETUDES METABOLIQUES	147
III-1) Etudes métaboliques <i>in vitro</i>	147
III-2) Etudes métaboliques <i>in vivo</i>	150
IV) EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DES TRACEURS : ETUDES PRECLINIQUES	150
RESULTATS	152
LES MARQUEURS DE LA PLAQUE D'ATHEROME.....	153
D) PREPARATION DES MOLECULES MARQUEES	153
I-1) Optimisation du marquage des traceurs iodés	153
I-2) Etude de la réaction de marquage des ligands au technétium 99m.....	158
I-3) Comparaison des méthodes de marquage.....	163
II ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	163
II-1) Propriétés physico-chimiques de B2702(75-84/84-75)-[¹²⁵ I].....	163
II-2) Propriétés physico-chimiques de B2702(84-75)-[¹²⁵ I]	165

II-3) Caractéristiques physico-chimiques des peptides technétiés.....	168
II-4) Conclusion.....	170
III) ETUDE DU « METABOLISME » DES PEPTIDES MARQUES	171
III-1) Etude du « métabolisme » <i>in vitro</i>	171
III-2) Etude de la stabilité <i>in vivo</i> du traceur : analyses du sang et des urines	176
III-3) Conclusion	180
IV) EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DES TRACEURS : ETUDES PRECLINIQUES	181
IV-1) Etudes des cinétiques sanguines	181
IV-2) Etude de la biodistribution des marqueurs de VCAM-1	183
IV-3) Images scintigraphiques.....	186
LES MARQUEURS DE LA NEOANGIOGENESE	189
D) OPTIMISATION DE LA REACTION DE MARQUAGE	189
I-1) Marquage des peptides ligands de « $\alpha_v\beta_3$ » à l'iode 125	189
I-2) Marquage des peptides ligands de « $\alpha_v\beta_3$ » au technétium 99m	194
II) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES MOLECULES MARQUEES	199
II-1) Etude du coefficient de partage	199
II-2) Analyses de la biodistribution sanguine	199
III) ETUDES METABOLIQUES DES TRACEURS EN MILIEU BIOLOGIQUE :	202
III-1) Etude <i>in vitro</i> du métabolisme	202
III-2) Etudes analytiques des prélèvements sanguins et urinaires : analyses <i>in vivo</i>	208
IV) EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DES TRACEURS : ETUDES PRECLINIQUES	213
IV-1) Biodistribution des peptides RGD181-[¹²⁵ I] et RGD-Raft175-[¹²⁵ I].....	213
IV-2) Biodistribution de RGD-Raft-H-[^{99m} Tc]	217
IV-3) Images scintigraphiques.....	218
DISCUSSION ET CONCLUSION	221
DISCUSSION	222
D) LES MARQUEURS DE LA PLAQUE D'ATHEROME : LES LIGANDS DE VCAM-1	224
II) LES LIGANDS DE $\alpha_v\beta_3$	231
CONCLUSION GENERALE	236
D) LES MARQUEURS DE LA PLAQUE D'ATHEROME	236
II) LES MARQUEURS DE LA NEOANGIOGENESE	238
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	241
LISTE DES FIGURES	260
LISTE DES TABLEAUX	268

ABREVIATIONS

CAM	Cell Adhesion Molecule
CAT	Chloramine-T
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CCM	Chromatographie Couche Mince
DT	Pyrosulfite de sodium
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EGF	Endothelial Growth Factor
EMEM	Eagles modified essential medium
HLA	High Lymphocyte Affinity
FGF	Fibroblast Growth Factor
IL2	Interleukine 1
LDL:	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysacharides
MMP	Métalloprotéase
NBS :	N Bromo succinimide
NK Cell	Cellule Natural Killer
PDGF	Platelet Derivate Growth Factor
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAH :	Sérum Albumine Humaine
SCGF	Smooth Cell Growth Factor
SM	Spectrométrie de masse
SVF :	Sérum de Veau Foetal
TEL	Transfert Linéique d'Energie
TEMP	Tomographie par Emission Mono Photonique
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TNF α :	Tumor Necrosis Factor
UV	Ultra-violet
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VLA-4	Very Late Antigen 4, intégrine $\alpha 4\beta 1$

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

Depuis la découverte de la radioactivité à la fin du dix-neuvième siècle par Henri Becquerel puis de la radioactivité artificielle par Frédéric et Irène Joliot-Curie en 1933 (prix Nobel de chimie en 1935), l'utilisation des radio-isotopes n'a cessé de se développer dans différents secteurs. En industrie, les isotopes radioactifs sont utilisés pour l'étude des matériaux, en géoscience ils sont utilisés comme traceurs des processus géologiques, dans l'industrie agroalimentaire l'irradiation des aliments est courante afin d'améliorer leur conservation. Toutefois, c'est le secteur médical qui est le domaine le plus actif. Les composés radioactifs sont utilisés aussi bien dans le secteur de la biologie pour le dosage *in vitro* d'hormones ou de métabolites chez l'homme (sans administration au patient) qu'en clinique, après administration au patient, pour un usage diagnostique et thérapeutique. Depuis les années 1980, leur application *in vivo* s'est diversifiée en relation avec le développement de nouvelles caméras et de nouveaux outils de détection plus performants, avec la mise au point de la chimie des isotopes et notamment de la chimie du technétium 99m et avec la synthèse de nouvelles molécules marquées. Depuis les années 1990, sont apparus les émetteurs de positons avec comme radiopharmaceutique clé le ^{18}F -FluoroDéoxyGlucose.

Le travail de thèse a été réalisé au laboratoire de Radiopharmaceutiques Biocliniques de la faculté de médecine de Grenoble dirigé par Daniel Fagret. Il porte sur la recherche de nouveaux radiopharmaceutiques destinés à la médecine nucléaire et plus particulièrement sur le développement et l'évaluation de nouveaux radioligands marqués au technétium 99m ou à l'iode 125/123. Il a permis notamment d'étudier les méthodes de marquage et la stabilité de la liaison de l'isotope à son vecteur, et d'observer le devenir du radioligand *in vitro* et *in vivo*. Cependant, l'activité et l'efficacité biologique des molécules marquées ne seront pas étudiées, ces recherches étant réalisées en parallèle dans le laboratoire. Deux nouveaux vecteurs ont été étudiés : un petit peptide dérivé de HLAB2702 et ligand de la molécule d'adhésion VCAM-exprimée dans la plaque d'athérome vulnérable, et un petit peptide ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, cette dernière étant surexprimée lors de la néoangiogenèse tumorale.

- Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité en France. Notre objectif est de trouver un traceur permettant par une technique d'imagerie non invasive de détecter la présence de plaques d'athérome dans tous les vaisseaux, d'identifier les plaques vulnérables à l'origine du thrombus et de suivre l'efficacité des traitements.

- La constitution d'un réseau sanguin irriguant la tumeur est indispensable à son développement et à la formation de métastases. Les cellules endothéliales des néovaisseaux expriment une molécule d'adhésion, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui activée par des ligands endogènes, entraîne la migration de la cellule endothéliale et inhibe son apoptose. La mise au point d'un radioligand, sélectif et spécifique du récepteur $\alpha_v\beta_3$, présente d'une part un intérêt diagnostique en aidant au suivi clinique et à la mesure de l'efficacité des traitements de chimiothérapie ou en permettant la visualisation et la quantification du récepteur avant de débiter des traitements anti-tumoraux par les antagonistes de $\alpha_v\beta_3$, et d'autre part un intérêt thérapeutique. En effet, la fixation d'un isotope émetteur β^- sur un antagoniste de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ associe l'effet antiangiogénique du ligand aux effets radiobiologiques et engendre une inhibition de la prolifération et de la migration cellulaire, l'induction de l'apoptose et la radiothérapie métabolique (Dechantsreiter M.A.1999, Giannis A. 1997, Haubner R. 2001, Van Hagen P.M. 2000).

Chacun de ces vecteurs est un petit peptide de quelques kiloDaltons. Le choix d'un petit peptide comme marqueur potentiel en imagerie médicale repose sur plusieurs avantages : c'est une molécule de structure simple et dont la synthèse est bien codifiée, avec la possibilité de faire un marquage à l'iode ou au technétium 99m. Au niveau biologique, sa petite taille fait que la clairance sanguine est rapide ; de plus il est peu immunogène et possède une grande affinité pour son récepteur (Signore A. 2001, Van Hagen P.M. 2000).

Ce manuscrit s'articulera en 3 grandes parties :

- Nous réaliserons tout d'abord en introduction un bref descriptif sur les radiopharmaceutiques et les isotopes radioactifs, ensuite nous aborderons les stratégies existantes de marquage à l'iode et au technétium 99m afin d'explicitier les problèmes liés à la conception de tels composés et enfin nous donnerons un aperçu du rôle des vecteurs étudiés et de leur cibles.
- Les autres parties, matériel, méthodes et résultats seront consacrées aux expériences de marquage, c'est à dire à l'étude des réactions d'iodation ou de complexation, aux études de stabilité *in vitro* et *in vivo*, puis à l'évaluation biologique des peptides par l'étude de la cinétique sanguine et de la biodistribution des molécules radiomarquées. Nous étudierons l'influence des modifications chimiques sur les vecteurs.
- Nous conclurons enfin ce travail en faisant ressortir les principaux résultats de ces recherches ainsi que les perspectives futures.

LES RADIOPHARMACEUTIQUES

Un radiopharmaceutique est un médicament contenant un isotope radioactif destiné à un usage diagnostique ou thérapeutique. Il peut être constitué par l'isotope seul sous forme d'ion qui joue le rôle de traceur et de vecteur (Iode 131 sous forme d'iodure de sodium (NaI) pour la scintigraphie des glandes thyroïdiennes, technétium 99m sous forme de pertechnétate de sodium (NaTcO₄) pour la scintigraphie des glandes thyroïdes et salivaires) mais il est le plus souvent constitué d'un traceur (radio-isotope), qui détermine la répartition spatiale de la molécule, lui-même fixé ou complexé à un vecteur ayant un tropisme particulier pour un organe ou une fonction. Ce dernier détermine la biodistribution de cette molécule et permet d'apprécier la fonctionnalité de l'organe cible. Les radiopharmaceutiques ont principalement un usage diagnostique. Ce sont alors des émetteurs gamma (γ) ou bêta plus (β^+) qui sont administrés à l'état de trace et dont on suit la biodistribution dans l'organisme par détection externe (imagerie TEMP ou TEP respectivement). Cette utilisation représente environ 80 à 90 % de l'activité d'un service de médecine nucléaire. La scintigraphie est un examen non invasif qui donne des informations morphologiques, anatomiques, fonctionnelles et dynamiques par mesure du rayonnement externe émis par l'isotope radioactif.

L'activité thérapeutique est essentiellement représentée par l'iode 131, émetteur gamma (γ) et bêta moins (β^-), administré dans le traitement des hyperthyroïdies et des cancers thyroïdiens. Cet isotope est aussi utilisé en recherche clinique dans des traitements à base d'anticorps marqués. Cependant, l'activité thérapeutique se développe, essentiellement dans le traitement des cancers, avec l'utilisation d'émetteurs β^- tels que l'yttrium 90, le lutétium 177 ou le rhénium 186/188.

Depuis 1992 (loi du 8 décembre 1992, décret du 26 dec 2000), le radiopharmaceutique répond à la législation du médicament. C'est soit « Un médicament qui lorsqu'il est prêt à l'emploi contient un ou plusieurs isotopes radioactifs » soit une « Préparation *in situ* et extemporanée par marquage de molécule vectrice (trousse) avec un radionucléide choisi (issu d'un générateur ou d'un précurseur) ». On distingue les molécules marquées utilisées à l'échelle macroscopique, quelques milligrammes de composé (10^{-6} M), administrées pour tracer une fonction ou étudier la morphologie d'un organe, et les molécules marquées à l'échelle de traces (10^{-9} à 10^{-12} M) pour l'étude des récepteurs (ligand du récepteur à la somatostatine (Octréoscan[®] 10 μ g/ 185 MBq) ou ligands des récepteurs dopaminergiques).

Au commencement de la médecine nucléaire, on a synthétisé de petits complexes technétiés qui constituaient la molécule active avec un tropisme particulier pour un organe du fait des propriétés physico-chimiques du complexe (^{99m}Tc diéthylène triamine pentaacétique pour la scintigraphie rénale). Depuis une dizaine d'années, les radiopharmaceutiques sont des molécules de complexité et de spécificité croissantes : peptides, anticorps ou oligonucléotides antisens, dans lesquelles la molécule à marquer est spécifique d'une activité biologique ou d'un récepteur et l'isotope ne sert que de traceur. Dans ce dernier cas, il doit interférer le moins possible avec la molécule active.

Les émetteurs gamma (traceur TEMP (tomographie par émission monophotonique)) utilisés en clinique se rattachent à deux classes chimiques :

- Les halogènes fixés au substrat organique par une liaison covalente : iode.
- Les métaux de transition et de post-transition polycoordonnés liés aux ligands sous forme de complexes et qui forment plusieurs liaisons métal–ligand : technétium, indium, rhénium et samarium.

Le choix de l'isotope dépend de nombreux paramètres :

- La nature du rayonnement. Le type de rayonnement va être fonction de son utilisation, rayonnement γ pour un usage diagnostique ou β^- pour un usage thérapeutique, mais aussi de ses caractéristiques physiques telles que la demi-vie, l'encombrement stérique ou le transfert linéique d'énergie.
- La nature de ces éléments fils.
- La chimie du marquage qu'il implique. Les métaux notamment, dont la chimie est complexe, peuvent réagir avec de nombreuses molécules de nature variée pour former un chélate. En modifiant ou en changeant le chélate, on modifie les propriétés de la molécule biologique.
- La nature du substrat et ses possibilités de réactions chimiques.
- La mise en œuvre de la réaction de marquage.

Deux isotopes restent prépondérants : l'iode qui fait appel à la chimie de covalence comme tous les halogènes, et le technétium ^{99m}Tc qui fait appel à la chimie de coordination (ou complexation). En raison du faible encombrement stérique de l'iode en comparaison à un chélate technétié, la fixation de l'iode aux substrats organiques est préférée pour le marquage des petites molécules, des molécules métabolisables, et des ligands de récepteurs dont on veut conserver la structure dans l'espace et l'activité biologique. A l'inverse, les traceurs fonctionnels comme les traceurs rénaux, les traceurs myocardiques, les grosses

molécules et toutes les molécules ne possédant pas d'activité biologique sont marqués au technétium (Apparu M. 1998).

La Médecine Nucléaire utilise une large gamme de radiopharmaceutiques de structures chimiques très différentes : des ions, des complexes métalliques, des traceurs biologiques, des protéines ou des colloïdes. Excepté pour les isotopes utilisés tels quels, l'étape de marquage est l'étape prépondérante de la préparation du radiopharmaceutique. Que ce soit pour le technétium 99m ou l'iode, il existe deux méthodes de marquage :

- La méthode directe où l'isotope est fixé directement au vecteur.
- La méthode indirecte, utilisant un synthon bifonctionnel capable de fixer l'isotope à une extrémité et à l'autre extrémité de se lier à la molécule biologiquement active.

Une méthode de marquage, pour être développée et utilisée en radiopharmacie doit être :

- Simple, avec le moins d'étapes possibles, car réalisable sous une enceinte plombée et sur paillasse. Pour une préparation en routine, le marquage doit être réalisé en une ou deux étapes.
- Rapide avec une durée en rapport avec sa demi-vie (réaction de marquage en un maximum de 60 minutes pour le technétium) et si possible ne nécessitant pas d'étape de purification, ceci afin d'éviter une rupture de la chaîne de stérilité et de diminuer le temps de préparation. Si la contrainte de temps est moins lourde que pour les émetteurs de positons, elle doit être prise en compte pour une préparation et une utilisation en routine.
- La pureté radiochimique doit être supérieure à 90 %.
- D'autres limitations interviennent dans la production de radiopharmaceutiques : concentration en biomolécules, solubilisation et dilution de toutes les préparations dans du sérum physiologique ou un tampon susceptible d'être injecté à l'homme, et délivrance du médicament sous forme stérile et apyrogène.

STRATEGIES DE MARQUAGE

I) CRITERES DE SELECTION DE L'ISOTOPE

I-1) Le rayonnement

- Le rayonnement alpha (α) : c'est un rayonnement particulaire constitué de 2 protons et 2 neutrons. C'est un rayonnement très ionisant, c'est à dire qu'il possède un TEL (transfert d'énergie linéique) très élevé ; l'énergie délivrée est très importante, de l'ordre de 6 à 7 Mev et sur une courte distance, 50 à 90 μm . Par contre, il est peu pénétrant et est arrêté par une feuille de papier.
- Le rayonnement bêta (β) : il existe deux types d'émission β , l'émission β^- (ou électron) utilisée en thérapie et l'émission β^+ (ou positon) utilisée en imagerie TEP diagnostique. Les β^- ont un TEL plus faible que les α mais leur pouvoir pénétrant est plus important. Leur parcours est plus ou moins important en fonction de leur énergie, de quelques μm à 10 mm. Ils provoquent de nombreuses ionisations sur leur parcours, ionisations responsables d'altérations cellulaires et nucléaires. Les rayonnements β^+ interagissent avec les électrons du milieu et s'annihilent en donnant deux photons γ de 511 Kev.
- Les électrons Auger : c'est un rayonnement particulaire issu de la désintégration de l'isotope par capture électronique ou conversion interne. Les électrons Auger ont un TEL élevé sur quelques nanomètres puis leur TEL diminue pour atteindre celui des β^- . Leur effet thérapeutique est très localisé et nécessite d'introduire l'isotope à proximité de la cible et donc du noyau cellulaire.
- Le rayonnement gamma (γ) : c'est un rayonnement électromagnétique émis par le noyau. Il est constitué d'un photon de haute énergie à fort pouvoir pénétrant mais son TEL est faible. Il interagit peu avec la matière.

Les rayonnements α et β^- , de faible parcours, sont utilisables exclusivement en radiothérapie métabolique. A l'inverse, les émissions γ qui traversent l'organisme jusqu'à la caméra pourront être détectées. L'émission optimale pour les caméras actuelles se situe autour de 150 Kev (de 10 à 400 Kev).

I-2) La période physique

Un isotope radioactif est caractérisé par sa période radioactive qui est le temps au bout duquel la radioactivité a diminué de moitié. Cette période doit être en relation avec la biodistribution de la molécule biologique (vecteur) à laquelle il est associé et donc à la demi vie biologique du radioligand. La période physique doit être suffisamment longue afin que l'isotope n'ait pas perdu son activité dans le tissu sain avant que le vecteur n'ait atteint sa cible ; à l'inverse elle ne doit pas être trop longue afin de limiter l'irradiation de l'organisme et notamment des organes émonctoires. Ainsi, si la fixation à la cible est sélective et spécifique 24 heures après l'administration de la molécule marquée, on préférera un marquage à l'indium 111 plutôt qu'un marquage au technétium 99m.

I-3) L'isotope de décroissance

La décroissance radioactive de l'élément ne doit pas, de manière générale, aboutir à la formation d'un autre élément radioactif, ceci afin de limiter les irradiations non désirées. La décroissance doit conduire à un isotope stable ou à un isotope de demi-vie longue et peu énergétique.

I-4) Le mode de production

Un autre critère à prendre en compte est le mode de production et le coût qui lui est lié. Tous les isotopes utilisés en médecine nucléaire sont produits à partir de cyclotron (^{123}I), de réacteur nucléaire (^{131}I) ou de générateurs ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). L'utilisation de générateurs permet de produire un isotope à moindre coût sur le site même de son utilisation et avec une grande activité spécifique, l'isotope parent étant isolé de l'isotope fils.

I-5) Caractéristiques idéales d'un isotope

- Pour une utilisation en imagerie diagnostic :
 - En imagerie TEMP, un radionucléide doit émettre un rayonnement γ pur d'une énergie comprise entre 100 et 200 Kev et sa demi-vie doit être relativement courte, comprise entre 6 et 8 heures voire 24 heures.

- Dans le cadre de la scintigraphie TEP, l'isotope doit avoir une durée de vie compatible avec une utilisation en routine (> 1 heure), et l'émission doit être pure afin de limiter les contraintes de radioprotection.

- Pour une utilisation en thérapie :

- Les radionucléides sont des émetteurs β^- dont l'énergie de rayonnement varie entre 0,5 Mev et 2 Mev et dont la composante γ est faible. La demi-vie doit se situer entre 10 heures et 10 jours. La recherche sur l'utilisation de molécules marquées par un émetteur α se développe mais aucune molécule n'est utilisée en routine en médecine nucléaire.

I-6) Les radioéléments potentiellement utilisables

Radionucléide	Emission	Période	Radionucléide	Emission	période
Iode 123	γ	13,3 h	Rhénium 186	β^-, γ	3,77 J
Iode 131	γ, β^-	8,02 J	Rhénium 188	β^-	16,9 h
Technétium 99m	γ	6,02 h	Erbium 169	β^-	9,4 J
Indium 111	γ	67,3 h	Lutétium 177	β^-	6,71 J
Thallium 201	γ	3,05 J	Carbone 11	β^+	20,4 mn
Yttrium 90	β^-	64,1 h	Fluor 18	β^+	108 mn
			Iode 124	β^+, γ	4,18 J

En médecine nucléaire, dans le cadre d'une indication diagnostique, l'isotope de choix est le technétium 99m (^{99m}Tc) de par ses propriétés chimiques et physiques (chapitre III). Les isotopes de l'iode sont également utilisés, iode 131 (^{131}I) et 123 (^{123}I), mais l'iode 131 possède une composante énergétique élevée qui implique des contraintes de radioprotection, et l'iode 123 présente des coûts de production et d'achat élevés ; ces deux facteurs limitent leur utilisation. L'indium 111 (^{111}In) est utilisé pour marquer des vecteurs dont la biodistribution vers l'organe cible est lente ou lorsque le rapport signal/bruit augmente lentement au cours du temps. Le thallium 201 (^{201}Tl), de part ses propriétés biologiques, est essentiellement indiqué dans les scintigraphies myocardiques. Enfin, les émetteurs de positons se développent, en relation avec l'augmentation des sites de production (cyclotron) et des caméras TEP en France, avec un isotope prépondérant, le fluor18 (^{18}F).

Dans le domaine de la radiothérapie métabolique, l'iode 131 est couramment prescrit pour le traitement des cancers thyroïdiens alors que l'yttrium 90, le rhénium186 et

l'erbium 169 sont indiqués dans les synoviorthèses. L'yttrium 90, émetteur β^- pur de haute énergie, est chélaté sur un anticorps dans le traitement des lymphomes (Zevalin® Schering, Cis Bio International). Enfin les isotopes du rhénium et notamment le rhénium 188, voient leur utilisation en recherche progresser.

De nombreuses recherches sont en cours pour étudier d'autres isotopes émetteurs β^+ ou alpha (α). Les études se développent aussi autour des chélates organométalliques comme les chélates du technétium, yttrium ou lutétium. Toutes ces méthodes font appel à la chimie des traces. Cependant, mêmes si les propriétés des isotopes et des chélates sont assimilées, la recherche pour la production de nouveaux radiopharmaceutiques ne pourra se développer qu'à la condition de trouver un ligand sensible et spécifique d'une pathologie ou d'un organe.

II) STRATEGIE DU MAROUAGE A L'IODE

Les isotopes de l'iode présentent un grand intérêt en médecine nucléaire : l'iode 125 peut être utilisé en expérimentation *in vivo* chez le petit animal et *in vitro* pour les études sur culture cellulaire ; l'iode 123 (demi-vie de 13,2 heures et émetteur gamma de 159 Kev) est bien adapté aux gamma-caméras utilisées en clinique, il est utilisé chez l'homme pour les scintigraphies à usage diagnostique (MIBG-¹²³I dans les neuroblastomes ou Ioflupane-¹²³I dans la maladie de Parkinson) ; quant à l'iode 131, émetteur γ et β^- , il est utilisé en thérapie cancéreuse et en diagnostic (Apparu M. 1998).

De plus, cet élément présente un avantage physiologique par rapport aux autres émetteurs : lorsqu'il est libéré *in vivo* par métabolisation de la molécule marquée, il n'est pas retenu au niveau hépatique et rénal, et va se fixer à 40% dans la thyroïde, ce qui limite le bruit de fond et facilite le contraste en imagerie.

II-1) Isotopes principalement utilisés

II-1-1) L'iode 125

L'iode 125 est un radionucléide de demi-vie longue (60 jours) émettant des électrons de conversion interne, des électrons Auger et un rayonnement γ faiblement énergétique de 35 Kev. Il ne peut pas être utilisé en imagerie médicale du fait de

l'atténuation des rayonnements par les tissus et des performances des caméras. Par contre, il est idéal pour la recherche où il est essentiellement employé pour la mise au point des réactions de radiomarquage, l'étude des biodistributions sur les animaux et les tests *in vitro*. L'iode 125 (Na^{125}I) est une molécule peu coûteuse, assez peu ionisante, mais suffisamment énergétique pour que le rayonnement émis soit mesurable. Son émission particulière (électrons Auger) permet d'envisager une utilisation thérapeutique chez l'homme.

II-1-2) L'iode 123

L'iode 123 [^{123}I] est un émetteur γ de 159 Kev (83%) et un émetteur X de 27 Kev. Il décroît avec émission d'électrons de conversion interne. Sa demi-vie est de 13,2 heures. Compte tenu de ses propriétés nucléaires et de la sensibilité maximale des détecteurs des caméras usuelles (de 100 à 300 Kev), il constitue le seul radionucléide capable de concurrencer le technétium [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] en TEMP.

C'est un excellent traceur TEMP ; peu irradiant, il est utilisé chez l'enfant et nécessite peu de contraintes de radioprotection. Cependant, il possède deux inconvénients majeurs :

- Produit en cyclotron, son coût de production est très élevé.
- Sa demi-vie courte limite les possibilités de distribution et d'approvisionnement

du produit prêt à l'emploi.

De ce fait, l'iode 123 est remplacé dès que cela est possible par l'iode 131, le technétium 99m ou l'indium 111.

II-1-3) L'iode 131

L'iode 131 [^{131}I] est un émetteur γ de 637 Kev (83%) et β^- de 606 Kev (90%). Sa demi-vie est de 8,03 jours. Il a été le premier radioélément utilisé *in vivo* et il est le seul radioélément employé en diagnostic (émission γ) et en thérapie (émission β^-).

En diagnostic, le choix est basé sur la simplicité du marquage et le faible coût du radioélément. Le marquage est stable ce qui permet de produire et livrer de grandes quantités sur une longue période.

Il est utilisé en thérapie en raison de son émission β^- de parcours moyen, essentiellement dans le traitement des pathologies thyroïdiennes. Néanmoins, son émission gamma très

énergétique et sa demi-vie longue imposent des contraintes de radioprotection et une gestion des déchets contraignante aussi bien en médecine que dans les laboratoires de recherche.

II-1-4) L'iode 124

L'iode 124 [^{124}I] est un émetteur de positons. Ses caractéristiques nucléaires sont une demi-vie de 4,2 jours, une désintégration β^+ de 1530 Kev (11%) et 2130 Kev (11%) et une émission γ de 511 Kev (50%) et 603 Kev (62%). Son utilisation en clinique pour quantifier la fixation tumorale est à l'étude. Très énergétique, il nécessite des contraintes de radioprotection importantes.

II-2) Propriétés physico-chimiques des halogènes

L'introduction des halogènes, en général par substitution d'un hydrogène, peut modifier la structure, donc les propriétés physico-chimiques et par conséquent l'activité biologique de la molécule. Deux effets peuvent être responsables : l'effet stérique et la charge de la molécule.

- L'effet stérique dépend de la « taille » de la molécule, il est naturellement plus important pour les petites molécules que pour les grosses molécules (anticorps). L'iode substitué à un atome d'hydrogène d'une molécule active ne modifie pas de manière sensible son comportement biologique, à condition que la concentration en iode reste limitée (nombre d'atome d'iode fixé par molécule inférieur ou égal à 1) et que la fixation n'ait pas lieu sur ou à proximité du site actif de la molécule.

- La charge partielle négative des halogènes joue un rôle plus important car elle est responsable de liaisons intermoléculaires. La densité de charge va décroissante du fluor à l'iode, ainsi en phase aqueuse le fluor devient hydrophile et l'iode hydrophobe ; il conviendra donc de lier l'iode dans les zones hydrophobes de la molécule et le fluor dans ses zones hydrophiles. Cet effet est important pour les molécules de petite taille ou les substrats métabolisables (Apparu M. 1998).

II-3) Les principales réactions de marquage à l'iode

Différentes méthodes existent qui seront choisies en fonction de la nature des substrats, des solvants et des conditions de la réaction de marquage. On distingue les réactions par voie directe, l'iode radioactif est fixé directement sur la molécule biologiquement active par liaison covalente, et la méthode dite « indirecte » : le radiomarquage est réalisé par l'intermédiaire d'un groupement prosthétique (Guerreau D. 1998).

II-3-1) Les réactions chimiques par voie directe

La position de l'atome d'iode peut modifier les propriétés biologiques d'une molécule, il est donc parfois nécessaire de contrôler la réaction de marquage afin de définir la régiospécificité et la stéréospécificité du marquage. Ces deux paramètres vont dépendre du type de réactions utilisées.

II-3-1-1) Réaction d'addition

- Addition électrophile de l'iode aux doubles liaisons

C'est une réaction acide/base dans laquelle le réactif est un acide ou un acide de Lewis potentiellement polarisable (ex : iode moléculaire) et la double liaison une base.

Mécanisme

L'iode peut être introduit soit sous forme d'acide iodhydrique ou de chlorure d'iode qui sont des acides protiques, soit sous forme d'iode moléculaire potentiellement polarisable.

- L'iode moléculaire est moins réactif que les autres halogènes, il réagit lentement avec les alcènes. L'électrophilie peut être augmentée par l'ajout d'un catalyseur : BaSO₄, LiBr, BF₃ ou en présence de solvants polaires : acide acétique ou alcool. Cependant, les composés diiodés sont peu stables et se décomposent à la lumière et à température ambiante en libérant de l'iode volatil.

- Les molécules iodo-chlorées sont plus stables et le rendement d'iodation est meilleur. Cette méthode a été utilisée pour le marquage des acides gras (acides oléique, linoléique) avec un rendement de marquage voisin de 100 %.

Ces réactions sont de moins en moins employées ; les réactions de substitution sont préférées.

II-3-1-2) Les réactions de substitution

- La substitution électrophile (SE)

Elle correspond à l'attaque d'un atome d'iode sous forme I^+ sur un groupement donneur d'électrons.

La substitution électrophile aliphatique

La seule méthode consiste à la préparation d'un organoborane par réaction d'un alcène sur du diborane, l'atome de bore est alors facilement substitué par l'atome d'iode I^+ .

La substitution électrophile Aromatique

La réaction de substitution électrophile sur un dérivé aromatique est simple à réaliser et nécessite des conditions de marquage moins dures que les autres méthodes : on réalise certains marquages à température ambiante en solvant aqueux. Cette réaction est essentielle pour le marquage des peptides et des protéines et est utilisée en routine dans les laboratoires de recherche utilisant l'iode radioactif.

Le réactif iodé électrophile peut être un ion positif ou un dipôle. Il attaque le noyau aromatique sur un carbone électronégatif et s'échange avec un hydrogène.

La substitution électrophile dépend de la basicité du noyau aromatique, basicité influencée par ses substituants :

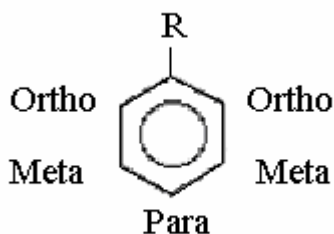
- Les substituant activateurs sont ceux qui produisent un effet inducteur ou mésomère : groupes alkyle, aryle, $-NH_2$, $-NHR$, $-NR_2$, $-OH$, $-OR$

- Ceux qui désactivent : $-N(CH_3)_3^+$, $-NO_2$, $-SO_3H$, $-COOH$; $-COOR$, halogène.

L'orientation est fonction de l'électronégativité des substituants. Les groupes alkyles augmentent la densité électronique en « ortho » et « para » par effet inducteur, les groupes hydroxyles et amines par un effet mésomère. Les groupes désactivateurs augmentent la

densité électronique en « méta » sauf les halogènes qui orientent par effet mésomère en « ortho » et « para ».

Les isomères « para » sont prédominants sur « ortho » en raison de l'encombrement stérique.

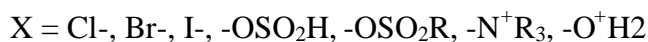


L'activation du cycle par un substituant activateur comme l'hydroxyle conduit souvent à des dérivés pluri-iodés ce qui peut modifier les propriétés biologiques et physico-chimiques de la molécule. Afin de contrôler la position de marquage, on peut substituer l'un des carbones du cycle aromatique par un métal. Différentes espèces organométalliques ont été utilisées pour ioder une molécule : l'étain, le bore, le germanium ou le silicium. On constitue ainsi un dipôle, le carbone étant plus électronégatif que le métal, cible privilégiée de la réaction d'iodation. L'avantage de cette méthode de marquage est la régiospécificité de la substitution, et donc l'absence d'isomères de position. Les arylstannanes, avec notamment le dérivé tributylétain, sont actuellement les plus utilisés, la substitution de l'étain par l'iode étant réalisable à température ambiante et dans de nombreux solvants.

- La substitution nucléophile (SN)

La substitution nucléophile consiste en un déplacement d'un groupe ou atome X par un groupe nucléophile Y chargé négativement (anion ou composé neutre possédant une paire électronique non appariée). Le composé X part du carbone avec un électron de la liaison chimique.

Le groupe partant X est électronégatif et polarisé dans la liaison C-X par un effet induit.



Le groupe nucléophile peut être un halogène, une amine, un alcool



La réaction de substitution nucléophile peut se dérouler en 1 temps : Y et X réagissent en même temps (réaction SN2) ou en deux temps avec formation d'un intermédiaire de

réaction (réaction SN1). Souvent, on observe les deux types de réactions, SN1 et SN2 pour un même substrat mais plus la nucléophilie augmente, plus on observe des réactions de substitution nucléophile de type SN2 (Apparu M. 1998).

La nucléophilie est augmentée dans les solvants polaires. Elle va en augmentant du fluor vers l'iode ($-F < -Cl < -Br < -OH < -NH_3 < -I$) dans les solvants protiques polaires, mais le sens est inversé en présence de solvants polaires aprotiques.

La substitution nucléophile aliphatique

Cette réaction a été très utilisée car les réactions mises en jeu sont simples : substitution par simple chauffage en milieu polaire ou sous acétone en reflux. La cinétique et le rendement de la réaction sont fonction de la facilité avec laquelle le nucléophage (iode froid) quitte la molécule, et de la nature du solvant.

3 types de réactions sont réalisés pour le marquage à l'iode :

- Echange isotopique (I*/I).
- Echange d'halogène (I*/Br).
- Remplacement de sulfonate (I*/OSO₂R).

Dans le cadre de l'échange isotopique (I*/I), on atteint des rendements de marquage supérieurs à 95% en présence d'un excès de substrat. Le principal avantage est l'absence de purification, le substrat étant identique qu'il soit radioactif ou non. Par contre l'activité spécifique est diminuée par dilution de la molécule radio-iodée. Les deux autres méthodes nécessitent une purification après l'étape de radiomarquage (Apparu M. 1998).

La substitution nucléophile aromatique

La substitution nucléophile aromatique, fait appel à trois mécanismes de réaction en fonction des conditions de marquage :

- La réaction d'addition - élimination.
- La substitution via un aryne intermédiaire (triple liaison). Cependant, elle conduit à des isomères de position et est donc peu utilisée aujourd'hui.
- La substitution de sels de diazonium (Apparu M. 1998, Le Gal J. 2004).

o Réaction d'addition - élimination

On réalise soit un échange isotopique soit un échange d'halogène en fonction de la réactivité des halogènes (par ordre croissant I, Br, Cl).

Le cycle aromatique est « activé » par des substituants attracteurs d'électrons qui diminuent la densité électronique en « ortho » et « para ». Les effets inducteurs et mésomères favorisent l'attaque de I⁻ en « para ».

Cette méthode demande des températures élevées. Elle nécessite donc soit l'utilisation de solvants à point de fusion élevé comme l'acétamide ou l'acide benzoïque (F 82°C, T_{eb} 221°C ; F 122°C, T_{eb} 249°C respectivement) soit d'opérer en milieu réactionnel fondu. De plus, le substrat doit d'une part être stable à haute température et le mélange réactionnel doit permettre la dissolution des iodures.

Cette méthode a été utilisée en médecine nucléaire jusqu'en 2005 pour le marquage de la MIBG-¹²³I (Schering-Cis Bio International), traceur analogue de la noradrénaline utilisé pour le diagnostic des tumeurs surrénales. Le marquage est réalisé par échange isotopique en présence de sulfate d'ammonium, entre 120°C et 160°C, en dessous du point de fusion du substrat et du sulfate.

○ *Substitution via une triple liaison*

La méthode est utilisée principalement pour des noyaux aromatiques halogénés qui possèdent des substituants électronégatifs. Elle est favorisée par des milieux très basiques qui entraînent le départ de X formant ainsi une triple liaison. I⁻ attaque les carbones de la triple liaison sur les deux positions ce qui implique la formation de deux espèces différentes.

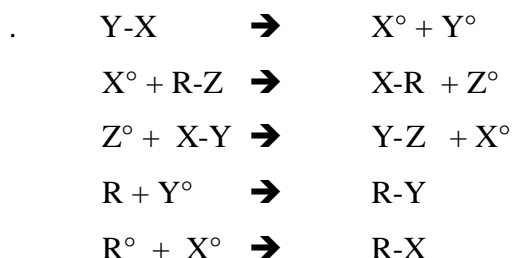
○ *Les sels de diazonium*

Cette méthode permet le radiomarquage sur une position définie du cycle (réaction de SANDMEYER). Cependant elle nécessite des conditions drastiques de température et de pH, et la présence de réactif oxydant ou l'utilisation de solvants organiques qui peuvent dégrader le substrat. Le rendement de marquage est moyen, de l'ordre de 70 à 80 % environ.

II-3-1-3) Marquage par réaction radicalaire

La réaction consiste à provoquer le clivage homolytique d'une liaison chimique X-Y pour former deux entités (X[•] et Y[•]) radicalaire avec un nombre impair d'électrons. Le radical libre contient un ou plusieurs atomes et est généralement très énergétique, et donc très réactif. Il peut réagir avec un nouveau substrat R-Z pour former un nouveau radical qui

lui-même peut réagir avec les composés X-Y pour reformer un nouveau radical X°. On a formation d'une réaction en chaîne classique de la substitution radicalaire, la réaction se produisant jusqu'à ce qu'il ne soit plus possible de former de nouveaux radicaux libres ou que l'on produise des radicaux faiblement énergétiques capturés par les réactifs.



La réaction se produit aussi bien dans les gaz que dans les liquides. Elle n'est pas influencée par les acides et les bases, mais seulement par la polarité du solvant.

L'agent d'iodation, généralement l'iode moléculaire ou le chlorure d'iode, est soit préparé séparément puis ajouté au mélange soit formé directement dans le milieu réactionnel. La substance à marquer et l'agent d'iodation sont alors dissous dans un solvant approprié et traités par l'une des méthodes suivantes :

- Chauffage à des températures comprises entre 200°C et 400°C. La substance doit être thermodynamiquement stable.
- Irradiation dans l'UV et le visible : UV entre 300 et 450 nm.
- Irradiation par des rayons gamma produits par le cobalt 60.
- Utilisation de peroxydes et peracides : ils initient et accélèrent la réaction radicalaire, mais ce sont des oxydants forts susceptibles de dégrader le substrat.

II-3-2) Iodation par voie indirecte : marquage avec des agents couplants

Lorsque certaines molécules ne peuvent être iodées par voie directe car elles sont peu réactives vis à vis des halogènes, ou ne possèdent pas de site d'halogénéation, ou si ce dernier est sur le site actif, ou encore lorsque l'iodation n'est pas stable, il est nécessaire de fixer l'iode sur un groupement prosthétique bifonctionnel. Ce dernier doit posséder d'une part un site d'iodation permettant un marquage stable et d'autre part un site d'ancrage qui réagit avec les groupements NH₂ ou COOH de la molécule à marquer.

Les molécules à marquer sont généralement transformées pour contenir un groupe carboxyle qui se liera à la fonction amine libre de l'agent couplant. Le couplage est

effectué s'il ne change pas trop la structure et les propriétés stéréospécifiques du groupe fonctionnel de la molécule originale ; la position du couplage doit être aussi loin que possible du groupe fonctionnel. L'encombrement de ces groupes doit être faible, le caractère hydrophile ou lipophile déterminé, afin de ne pas perturber les propriétés biologiques de la molécule.

Deux types de réaction sont réalisés :

- Couplage du substrat au groupe prosthétique puis iodation. Cette méthode ne présente un intérêt que si le site d'iodation du synthon est plus réactif que celui de la protéine. Les avantages sont un temps de réaction plus court ce qui diminue l'irradiation du personnel, une réduction des pertes lors des étapes de purification et des rendements chimiques et de marquage élevés. L'activité spécifique obtenue est élevée.

- Marquage à l'iode du groupe prosthétique puis couplage aux substrats (Ex. peptide). On évite ainsi le contact du peptide avec l'agent oxydant. Cependant cette méthode multiplie les étapes de synthèse chimique et n'est donc pas utilisée pour les isotopes à demi-vie courte. Elle est nécessaire si la molécule se dégrade lors des réactions d'halogénéation ou si l'on souhaite une fixation de l'halogène régiosélective.

Les réactifs les plus couramment utilisés sont :

- Le réactif de Bolton-Hunter dont le noyau aromatique est activé par le groupe OH pour permettre l'iodation. L'ancrage est réalisé au niveau de l'hydroxy-succinimide très réactif qui forme un amide avec le site NH₂ libre des peptides.

- Les sels de diazonium aromatiques.

- Les analogues de la tyrosine ou de l'histidine. Différents composés ont été utilisés dont la tyrosine méthyle ester, la tyramine, l'histamine et l'histidine. Ces analogues peptidiques sont souvent employées en raison de la présence d'un noyau aromatiques facilement radiomarqués.

- Les organostanniques vinyliques.

II-3-2-1) Réactif de Bolton-Hunter

Le réactif de Bolton-Hunter ou N-succinimidyl 3-(4-hydroxyphényl) propionate (Figure 1) réagit très facilement avec les acides aminés libres des peptides et des esters peptidiques pour former un intermédiaire p-hydroxy-phénylpropionamide avec libération du dérivé succinimyde.

Ce réactif permet l'acylation des fonctions amines primaires (-NH₂) du peptide. Deux sortes de groupements peuvent donc réagir :

- Le groupement amine terminal du peptide (position α).
- Le groupement aminé primaire de la lysine (K) (position ϵ).

La réactivité de la fonction ϵ -aminée est très supérieure à celle de la fonction α -aminée. L'incorporation aura donc lieu préférentiellement sur les résidus de lysine. Afin de favoriser l'obtention de dérivés marqués en alpha ou bien en epsilon, il est possible de jouer sur le pH réactionnel en milieu aqueux :

- A pH 7, on favorise l'obtention de dérivés marqués en α au niveau de l'extrémité N terminale.

- A pH 8,5, on favorise l'obtention de dérivés marqués sur les résidus de lysine.

Cette technique permet de préserver les propriétés fonctionnelles des peptides dans lesquels l'une des deux fonctions amines est essentielle pour l'expression de l'activité biologique.

Le réactif de Bolton-Hunter est utilisé lorsque l'incorporation directe de l'iode n'est pas possible :

- Si le peptide ne contient ni tyrosine, ni histidine.
- Si l'intégrité du résidu de tyrosine ou d'histidine est cruciale pour l'activité biologique du peptide.

- Si le peptide contient, dans sa séquence, des acides aminés qui sont altérés lors de l'oxydation par la chloramine-T (c'est le cas de la méthionine qui, sous un état oxydé, peut entraîner une diminution de l'activité biologique du peptide).

Dans la première étape, le réactif de Bolton Hunter est iodé en présence de chloramine-T et Na ¹²⁵I en milieu tampon phosphate puis purifié. Le rendement de marquage varie entre 30 et 75 %. Le réactif de Bolton Hunter mono ou diodé est ensuite mis en contact avec la protéine. Le couplage avec les acides aminés libres s'effectue normalement dans un tampon phosphate 0,1M à pH 8,5 pendant 15 minutes à 0°C. La protéine marquée est séparée des réactifs par filtration sur gel. Le réactif est généralement en excès et le rendement de la réaction de couplage est de 30 à 40 %.

C'est une méthode de marquage des peptides très rapide, réalisée en conditions douces car le substrat n'a aucun contact avec un agent oxydant (Bolton A.E 1986).

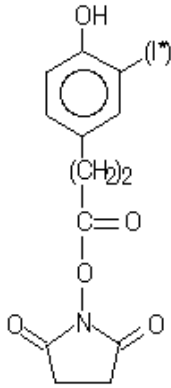


Figure 1 : Structure du réactif de Bolton-Hunter.

II-3-3) Conclusion

En recherche, les réactions de substitutions électrophiles sont très utilisées, notamment pour le marquage de peptides, protéines et anticorps, du fait de la présence de résidus tyrosine facilement marqués. En l'absence d'acide aminé tyrosine, le réactif de Bolton Hunter est souvent préconisé.

II-4) Les agents d'iodation

Différents agents iodés peuvent être utilisés pour introduire l'atome d'iode radioactif sur son substrat :

- L'iodure de sodium (Na^*I).
- L'iode moléculaire ($^*\text{I}_2$).
- L'acide hypoiodeux ($^*\text{IOH}$).
- Le chlorure d'iode (ICl).
- Les composés organiques N-iodés (Iodogen[®]).

II-4-1) L'iode I_2

L'iode moléculaire est utilisé dans 3 types de réactions :

- Addition aux doubles liaisons.
- Substitution de l'hydrogène des groupes aromatiques.
- Substitution de l'atome d'halogène par réaction radicalaire.

L'iode moléculaire radioactif peut être obtenu soit par échange $I_2/*I$ soit par oxydation électrolytique des iodures sous forme de $Na*I$ par divers oxydants : Fe^{3+} , H_2O_2 , KIO_3 , HIO^- soit par oxydation électrochimique. Cependant, son utilisation présente plusieurs inconvénients : d'une part la molécule radioactive est très volatile ce qui nécessite de travailler en dépression, sous hotte blindée ventilée et en atmosphère fermée, et de recueillir tous les gaz dans des filtres en charbon ; d'autres part, l'iodation s'accompagne d'une perte de 50 % de la radioactivité car seul l'anion ou le cation réagit ($*I_2 \rightarrow *I^+ + *I^-$). Il est donc peu utilisé en pratique.

II-4-2) Le chlorure d'iode

Le précurseur radioactif est généré par échange $ICl/Na*I$; la réaction correspond à une oxydation des iodures par l'iode froid. Selon les conditions de la réaction, pH et solvant, le réactif impliqué est soit IO^- soit IOH et IOH_2^+ , en milieu basique et en milieu acide respectivement (Comet M. et Vidal M. 1998).

La molécule étant polarisée ($I^{\delta+} Cl^{\delta-}$), ce précurseur est utilisé pour l'introduction simultanée d'iode et de chlore sur une double liaison ou dans la réaction de substitution aromatique électrophile. Il est plus facilement ionisable et plus réactif que la molécule d'iode I_2 . Cette technique évite la perte de 50 % de la radioactivité.

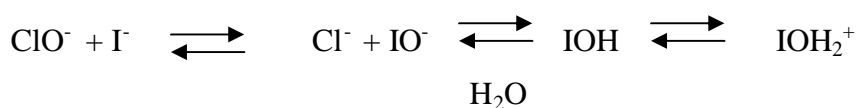
II-4-3) L'iodure de sodium

C'est le composé le plus simple de l'iode et la seule forme commercialisée. Il est utilisé dans les réactions de substitution aliphatique nucléophile des halogénures, des groupes hydroxyles et des composés mercurochlorés, dans les réactions de substitution aromatique nucléophile des halogénures, dans les réactions de substitution des sels de diazonium.

II-4-4) L'acide hypoiodeux *IOH

L'acide hypoiodeux est synthétisé par oxydation de l'iodure de sodium radioactif. Les principaux oxydants utilisés pour le radiomarquage sont la chloramine-T et ses dérivés, l'Iodogen[®], l'Iodobead[®] et le N-bromo-succinimide.

En solution aqueuse les ions hypochlorites générés par ces réactifs oxydent les iodures (I⁻) en acide hypoiodeux qui devient le réactif de marquage.



II-4-5) Les composés organiques N-iodés

Nous considérons les N-iodocarboxamides et N-iodocarboximides. L'iode attaché à l'azote possède une charge positive et peut être utilisé pour des additions et substitutions électrophiles. Le réactif le plus couramment utilisé est le N-iodosuccinimidine et ses dérivés.

L' [¹²⁴I] N-hydroxysuccinimidyl-4-iodobenzoate a été utilisé par Deckker (Dekker B. 2005) pour marquer l'annexine V. Le réactif iodé est préparé par iodo-déstannylation du N-Hydroxysuccinimidyl-4-(tributylstannyl) benzoate en présence de [¹²⁴I] sous forme de NaI puis mis en contact avec la substance à marquer pendant 2 heures à température ambiante.

II-5) Utilisation des agents oxydants

De nombreuses réactions de marquage à l'iode impliquent l'utilisation de l'iode au degré d'oxydation 0 (pour former *I₂) ou au degré d'oxydation (+1) (*IOH, *ICl). L'iode étant essentiellement fourni par les producteurs sous forme NaI* [¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I], l'oxydation des ions *I⁻ est nécessaire.

Différentes méthodes existent, elles seront choisies en fonction de la nature des substrats, des solvants et des conditions de la réaction de marquage.

II-5-1) Oxydation par la chloramine-T

L'iodation par la méthode à la chloramine-T (N-chloro-p-toluene sulfonamide) (Figure 2) est la méthode de choix pour de nombreux composés contenant des résidus tyrosyles dont les peptides, les protéines et les anticorps (Robles A.M 2001). Le radiomarquage est réalisé par substitution électrophile aromatique par addition simple de

chloramine-T et de NaI en présence du substrat puis incubation à température ambiante. La réaction est rapide (quelques minutes) et complète ; elle donne un marquage avec une bonne activité spécifique (Robles A.M. 2001) et avec une exposition minimale du personnel aux radiations (McConahey PJ. 1980). La réaction peut être réalisée en milieu acide, neutre ou basique, bien que la méthode utilisée généralement se déroule dans un tampon basique : la chloramine-T libère HOCl qui est l'espèce oxydante ; cette dernière réagit avec l'iode radioactif présent (NaI) pour former H_2OI^+ en équilibre avec HOI et IO^- . En milieu acide, les iodures sont oxydés en monochlorure d'iode.

On utilisera de l'iode en l'absence de porteur pour minimiser le nombre d'atomes d'iode fixés sur la molécule et éviter d'altérer les propriétés de la molécule native (McConahey P.J. 1980). La réaction peut s'effectuer par oxydation contrôlée, l'oxydation a lieu jusqu'à épuisement de la chloramine-T ou bien l'oxydation peut être stoppée par adjonction d'un réducteur, généralement du bisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$).

Le rendement de marquage va être fonction de la nature du substrat (nombre de résidus tyrosine pour les protéines), de la quantité de chloramine-T et du temps de réaction :

- Les petites molécules, de poids moléculaire inférieur à 50000 Dalton, incorporent un atome d'iode. Si le poids moléculaire est supérieur à 150000 Dalton (plusieurs résidus tyrosine étant présents en général), elles incorporent plus de deux atomes d'iode. Lorsque l'on réalise une iodation d'une immunoglobuline IgG, on obtient en moyenne 0,5 à 3 atomes par molécule.

- La cinétique de l'oxydation est temps dépendante (Robles A.M 2001).

- La radio-iodination est d'autant plus efficace que le volume de la réaction est faible. En général, on utilise un volume inférieur à 100 μl et au maximum de 2 ml.

- Le rendement est proportionnel à la quantité de chloramine-T utilisée. Le ratio réactif/substrat doit être aussi élevé que possible pour augmenter la pureté radiochimique sans dénaturer la molécule.

Toutefois les conditions d'oxydation sont drastiques et provoquent de nombreuses réactions secondaires parmi lesquelles des réactions de chloration, d'oxydation des thiols et des thioéthers avec rupture des ponts disulfures, et de clivage des groupements tryptophane. Ainsi la perte de l'activité immunologique de certaines protéines est liée à l'action sur les ponts disulfures. On peut réduire ces effets en travaillant à très faible concentration en chloramine-T (la réaction est plus lente mais le risque de dégrader la

molécule plus faible) ou en diminuant le temps de contact en ajoutant un réducteur qui stoppe la réaction (Guerreau D. 1998, Robles A.M 2001).

Quand la quantité de chloramine-T est très importante et le temps de réaction trop long, une désiodation est possible. De plus, ce réactif peut entraîner la formation de macro-agrégats. Ce phénomène a d'abord été observé avec le fibrinogène mais il a lieu avec de nombreuses protéines dont l'albumine (HSA, fraction V) ou les gammaglobulines. La formation de ces macro-agrégats a d'abord été attribuée à la production de radicaux libres lors de la réaction d'oxydation de l'iode induisant ainsi une radiolyse. Cependant d'autres expériences ont montré que d'une part si d'autres agents d'oxydation sont utilisés, même avec une haute activité, aucun agrégat n'est observé et d'autre part l'adjonction de chloramine-T pure, sans iode, entraîne aussi la formation d'agréats (Sherman L.A. 1974). C'est donc le réactif en lui même qui est responsable de la formation de ces agrégats.

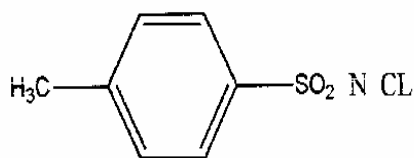


Figure 2 : Structure de la chloramine-T.

II-5-2) L'Iodobeads

L' IodobeadsTM (PIERCE) correspond à de la chloramine-T liée sur un support solide (bille). La réaction est effectuée à température ambiante et le rendement de marquage est excellent (PRC > 95 %). Cette technique est utilisée pour marquer de petites quantités de peptide ; l'agent oxydant greffé sur une bille de polystyrène est éliminé à la fin de la réaction par simple filtration. Les billes peuvent être conservées au froid pendant 6 mois avant utilisation (Guerreau 1998).

II-5-3) L'Iodogen

L'Iodogen (1,3,4,6 tétrachloro-3 alpha,6 alpha-diphénylglycolurile) (Figure 3) est un agent oxydant inspiré de la chloramine-T mais comportant 4 sites actifs. Insoluble dans l'eau, il est dissout dans un solvant organique et introduit dans un flacon de verre. Après évaporation du solvant organique, il se dépose sous forme de film solide sur la paroi de verre. On introduit le peptide et l'iode radioactif en présence d'un tampon basique ou

tampon borate à 0-2 °C ; la réaction se déroule sur une période de 5 à 10 minutes environ (Ünak T. 2001). En fin de réaction, la phase aqueuse est recueillie et séparée de l'Iodogen par filtration ce qui limite le contact entre l'agent oxydant et le peptide. Cette technique est plus douce que la chloramine-T mais les rendements sont plus faibles car la réaction a lieu en surface donc un coté de la chaîne protéique n'est pas accessible.

L'application la plus importante est le marquage des protéines, facilité par le fait que de nombreuses protéines sont solubles dans l'eau. Les inconvénients sont les risques d'oxydation et la présence d'une impureté radioiodée provenant de l'Iodogen lui-même, l'iode radioactif se fixant sur le cycle aromatique du réactif (Ünak T. 2001).

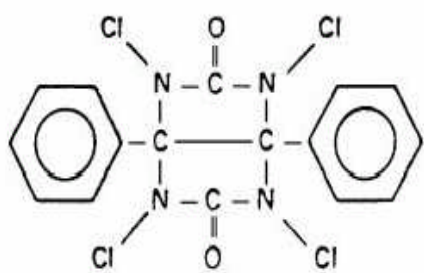


Figure 3 : Structure de l'Iodogen.

II-5-4) Le N-chlorosuccinimide

C'est un agent oxydant comparable à la chloramine-T mais son action est insensible au pH, ce qui facilite certains protocoles. Il est moins dénaturant que la chloramine-T. La méthode de marquage est identique à la méthode de marquage par la chloramine-T.

II-5-5) Oxydation à la lactoperoxydase

L'enzyme lactoperoxydase catalyse l'oxydation des iodures sous forme Na^*I en iode $^*\text{I}_2$ en présence de traces d'eau oxygénée H_2O_2 . Cette méthode a été développée pour le marquage des protéines car elle est moins agressive donc provoque moins de dégradation par oxydation des chaînes peptidiques que les autres méthodes. Le rendement de marquage approche celui de la chloramine-T et de l'Iodogen (Davidson P.F. 1987) et elle permet une iodation sans entraîneur.

Les peroxydases sont des hémoprotéines possédant un atome de fer (Fe^{3+}) susceptible d'être oxydé par le peroxyde d'hydrogène. L'enzyme forme avec H_2O_2 un premier

complexe capable de réagir avec les protéines en formant un deuxième complexe. Ce deuxième complexe active le résidu tyrosine en radical tyrosine accepteur d'iode moléculaire, lui-même résultant de l'oxydation des iodures par H_2O_2 . Durant le marquage, ces deux complexes sont formés alternativement.

Enzyme et protéine forment un complexe avant l'iodation, la formation du complexe est déterminée par le réarrangement spatial de la protéine ce qui implique que le rendement de marquage soit dépendant de sa structure. Seuls les résidus tyrosyles accessibles et stéréochimiquement favorisés sont iodés. Le substrat doit être assez large pour former un second complexe avec l'enzyme. La formation du complexe avec le substrat dépendant de la taille moléculaire, il est difficile de marquer les petites molécules.

Méthode générale : le substrat (essentiellement des peptides) et l'enzyme sont dissous en milieu tamponné, tampon phosphate ou acétate, à température ambiante. La réaction est initiée par l'ajout séquentiel ou simultané de Na^*I à l'activité requise et de peroxyde d'hydrogène en solution. Après un temps déterminé, la réaction est arrêtée soit par addition d'un agent réducteur de H_2O_2 comme la cystéine ou le mercaptoéthanol, soit en diluant le milieu, soit par centrifugation et recueil du surnageant. La solution est immédiatement transférée sur une colonne de perméation sur gel ou sur colonne d'échange d'ions pour éliminer l'iode libre (Karonen S.L. 1990).

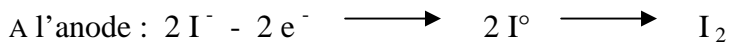
Le rendement et la cinétique de marquage dépendent des quantités de lactoperoxydase et de peroxyde d'hydrogène qui doivent être définies pour chaque substrat. Le temps de réaction est inversement proportionnel à la quantité de lactoperoxydase. Le taux de la réaction est alors proportionnel à la concentration en protéine.

La réaction se déroule généralement en tampon et montre deux maxima de rendement de marquage : le premier en milieu acide, et le second en milieu basique. Le premier maximum est lié à l'effet catalytique de l'enzyme qui augmente quand le pH diminue, le second est lié aux résidus tyrosyles qui sont plus facilement iodés en milieu basique. Les deux effets doivent être considérés quand un pH est choisi pour une protéine particulière mais l'optimum peut être trouvé empiriquement. En général la réaction a lieu à un pH compris entre 5 et 8 en fonction des peptides ; pour un pH entre 7 et 9, le temps de réaction est augmenté pour compenser l'effet de la réduction catalytique de l'activité de la lactoperoxydase.

Même si cette méthode est moins dénaturante que celle à la chloramine-T et ses analogues, deux réactions parasites peuvent se rencontrer : oxydation de certains acides aminés de la chaîne peptidique ou iodation de la lactoperoxydase. Il faut vérifier que l'on peut séparer la molécule à marquer de l'enzyme (Bailey G.S. 1994).

II-5-6) Oxydation électrochimique

La réaction de marquage se déroule au niveau de l'anode. La protéine est dissoute dans la région de l'anode. L'iodure de sodium (NaI*) et le porteur NaI sont ensuite ajoutés à proximité de l'anode et les iodures sont oxydés en iode moléculaire qui réagit avec le substrat.



Cette méthode présente plusieurs avantages : la radio-iodation (plus particulièrement la proportion de I₂ introduite sur la molécule) peut être contrôlée par le courant dans la cellule électrochimique, de grandes dilutions de solution Na*I peuvent être utilisées, la réaction n'utilise pas d'agents oxydants susceptibles de dégrader la molécule, elle peut être réalisée dans des solvants organiques et dans une large gamme de pH (entre pH 6 et pH 8).

Différents facteurs vont influencer le rendement de marquage :

- Le temps de réaction, déterminé pour chaque protéine.
- La nature des solvants (qui par ailleurs vont jouer sur le temps de réaction).
- L'intensité du courant, déterminée pour chaque protéine. Si celle-ci est trop élevée, le courant provoque soit l'adsorption de protéines à la surface des électrodes soit une désiodation.

II-6) Le marquage des protéines et des peptides

La chimie de marquage à l'iode des protéines et des anticorps s'est considérablement développée ces dernières années. Le choix de la réaction de marquage des peptides va dépendre de leur taille, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques et de la présence de groupements réactifs. Deux techniques de marquage peuvent être mises en œuvre : l'iodation directe ou la voie indirecte.

La méthode de marquage doit répondre à plusieurs conditions :

- L'activité immunologique et biologique de la molécule vectrice doivent être conservées.
- Le marquage doit s'effectuer avec une forte activité spécifique.
- Le marquage et la purification des protéines marquées doivent s'effectuer dans des conditions aussi douces que possible.

L'iodation directe, compte tenu de sa simplicité, constitue une méthode de choix. Elle possède cependant quelques inconvénients :

- Le contact avec des oxydants peut dégrader la molécule.
- L'attaque électrophile des groupes amides peut entrer en compétition avec la substitution des groupes aromatiques. Cette réaction conduit à un amide iodé sur l'azote, peu stable et qui se dégrade *in vivo* par hydrolyse.
- La réactivité de la protéine peut être insuffisante.

Lorsque le marquage est impossible par voie directe, il peut être réalisé à l'aide de groupements prosthétiques (voie indirecte).

II-6-1) La tyrosine

La tyrosine est un acide aminé qui possède un groupe aromatique substitué par un groupe hydroxyle donneur. Elle est par conséquent très réactive vis à vis des halogénures. L'acidité du groupe hydroxyle conduit à un état d'équilibre avec l'ion phénoxyde et activation des positions 3 et 5 en «ortho» (Figure 4). De par l'effet inducteur et mésomère, l'halogénéation a lieu en «ortho» de l'hydroxyle et l'on peut obtenir des mélanges mono et diiodés en fonction de la quantité de réactif. Avec un excès d'acide aminé, la réaction est stoppée au stade monoiodé.

Le marquage peut avoir lieu en milieu acide, basique et neutre, cependant l'activation de l'hydroxyle est facilitée en milieu basique ou en présence de base de Lewis. De ce fait, l'iodation est généralement effectuée par substitution électrophile en milieu basique et l'agent d'iodation est I^+ . La réaction est proportionnelle à la concentration en réactif et inversement proportionnelle à la concentration en hydrogène du milieu. En milieu acide, l'agent d'iodation est probablement l'ion iodonium I^+ dans un complexe I^3+ ou I^5+ .

La formation d'un mélange de dérivés mono et diiodés est fonction :

- De la quantité de réactif : plus le rapport iode/tyrosine augmente, plus la formation de dérivé diiodé est importante et rapide.

- Du temps de la réaction : si le noyau aromatique contient déjà un iode, l'attaque par un deuxième atome d'iode est plus difficile et 20 fois moins rapide.

- De la nature du tampon et du pH.

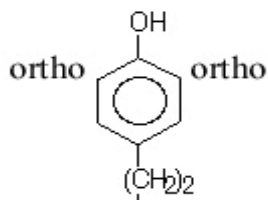


Figure 4 : Site d'halogénéation du résidu tyrosine.

II-6-2) L'iodation directe par substitution électrophile des peptides et protéines

Le radiomarquage s'effectue principalement par substitution électrophile des acides aminés aromatiques de la protéine : tyrosine, histidine et tryptophane par de l'iode à l'état I(0) ou I(+), ou par échange isotopique (Bourdoiseau M. 1986).

L'iodation peut être réalisée avec ou sans entraîneur. Le marquage sans entraîneur fournit une molécule à haute activité spécifique.

L'iode radioactif étant généralement commercialisé sous forme d'iodure de sodium, il devra être oxydé préalablement par des oxydants classiques. Le choix de l'oxydant va conditionner le rendement et la qualité du marquage :

- Marquage avec des agents d'oxydation inorganiques.
- Marquage avec la chloramine-T et ses dérivés (Iodogen, NBS).
- Marquage avec la lactoperoxydase.
- Marquage électrochimique.
- Marquage au chlorure d'iode.

Lorsque l'iode entre en contact avec les protéines, trois réactions différentes peuvent s'observer séparément ou ensemble :

- Une substitution.
- Une addition.
- Une oxydation.

Les deux dernières réactions conduisent à la formation d'impuretés. Ces trois réactions sont décrites ci-dessous.

II-6-2-1) La réaction de substitution

Comme noté précédemment, la tyrosine réagit avec l'iode pour donner des dérivés mono ou diiodés. La réaction est catalysée par l'ion acétate ou phosphate et le taux de la réaction est inversement proportionnel au nombre d'ions hydrogène.

L'introduction d'un atome d'iode ne modifie pas les propriétés biologiques des molécules à condition que le rapport nombre de moles d'iode sur nombre de moles de substrat soit inférieur à 1. Si le degré d'iodination est inférieur à 2, la protéine marquée a généralement les mêmes propriétés biologiques qu'avant le marquage ; quand le degré d'iodination est plus important, la protéine perd ses propriétés physico-chimiques et biologiques et est généralement rapidement éliminée de l'organisme en raison de son pouvoir antigénique.

La réaction d'iodation peptidique conduit à des molécules monomarquées (si le peptide possède plusieurs résidus tyrosine, on parlera d'isomères de position) ainsi qu'à des produits polymarqués. Ces derniers peuvent résulter :

- De l'incorporation de deux atomes d'iode en « ortho » de l'hydroxyle, sur le même groupement phénolique (une telle modification est instable : il se produira un phénomène de radiolyse).
- De la substitution sur plusieurs résidus tyrosine du même peptide.
- De la substitution de différents acides aminés.

L'histidine peut être marquée en milieu acide et basique, cependant le taux de la réaction est ici aussi inversement proportionnel à la concentration en ions hydrogène. L'histidine réagit plus lentement que la tyrosine, par conséquent pour les protéines contenant les deux acides aminés, l'histidine réagit seulement si l'isotope est en large excès par rapport aux résidus tyrosine et si le temps de la réaction est augmenté.

Le tryptophane peut être iodé directement. On connaît des dérivés mono et diiodés. Il réagit plus lentement que la tyrosine et l'histidine, donc rarement.

II-6-2-2) La réaction d'addition

Cette réaction aboutit à la formation d'un complexe ou d'un additif instable ; Elle est plus ou moins important en fonction de la nature de la protéine.

II-6-2-3) La réaction d'oxydation

En milieu acide, l'iode est un agent oxydant fort. Il peut réagir avec les groupements thiols des protéines entraînant une modification de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques avec modification de leur structure tertiaire dans l'espace. C'est une réaction importante car la cystéine est rapidement oxydée en cystine puis en acide cystéique. Le second acide aminé qui peut être oxydé est la méthionine, le groupe thioéther pouvant aisément être converti en sulfoxyde par l'iode.

Le taux de ces réactions est proportionnel à la concentration en ion hydrogène dans la solution.

II-7) Stabilité de la liaison halogène-vecteur *in vitro* et *in vivo*

Durant le marquage et la conservation, différents facteurs sont responsables de la dégradation des traceurs radioiodés (Coenen H.H. 2006):

- La radiolyse. Les radiations et l'énergie déposée peuvent être la cause d'altérations structurelles qui conduisent à la formation de plusieurs formes chimiques.
- La perte de l'iode peut être provoquée par l'oxygène, la lumière, la chaleur, les solvants et le pH.
- Les agents chimiques et les impuretés peuvent dégrader la molécule.

L'iode, compte-tenu de sa polarisabilité, est un bon groupe partant et peut être libéré par hydrolyse. Il conviendra d'éviter la présence d'halogénure libre dans le milieu et de lier l'iode sur un carbone sp² (double liaison). La liaison sp³ ((R)₂-C-I*) d'énergie trop faible est hydrolysée *in vivo* en libérant des iodures radioactifs.

Au problème de stabilité des liaisons s'ajoute la radiolyse primaire lorsque l'énergie émise par l'isotope rompt les liaisons intramoléculaires ou intermoléculaires C-X ou C-C proches et induit ainsi la formation de radicaux libres, ou la radiolyse secondaire liée à la formation de radicaux libres à partir de la molécule mère ou de ses métabolites.

On peut diminuer cette radiolyse en :

- Diminuant l'activité spécifique (limitée à 74-185 MBq/mg pour les anticorps).
- Diluant le traceur.
- Ajoutant des capteurs de radicaux : SAH, éthanol, acide ascorbique.
- Conservant les produits à basse température (-80°C).

- Modifiant les conditions de pH.
- Purifiant la molécule.

La radiolyse est très importante dans le cas des radiopharmaceutiques émetteurs β^- à haute activité spécifique comme l'iode 131. La dénaturation des protéines peut aussi apparaître à faible concentration et en cas de température de conservation élevée. Elle est liée à l'auto-irradiation interne qui fragilise la liaison de l'halogène au carbone, à la formation d'agrégats et à une altération de la structure protéique par formation en solution aqueuse de radicaux H° et OH° et d'espèces réactives H_2O^\cdot , et H_2O_2 .

In vivo, la désiodation souvent observée proviendrait de l'action d'enzymes, les désiodases, sur les groupes tyrosyles marqués. Dans le métabolisme thyroïdien, 3 familles de désiodases sont identifiées. Ces trois familles diffèrent par leur distribution, la cinétique de réaction, la reconnaissance des substrats. Les désiodases de type I sont présentes majoritairement dans le foie, les reins et le muscle squelettique et provoquent une désiodation en 5 et 5' du cycle tyrosine. Les enzymes de type II sont présents dans le cerveau, le tissu pituitaire et la graisse brune. Les isoformes de type III sont localisées dans le système nerveux central. Ces deux dernières isoformes catalysent la désiodation en 5' de la tyrosine.

Du fait de l'analogie de structure avec les hormones thyroïdiennes, les molécules marquées par iodation sur la tyrosine ou par l'intermédiaire du réactif de Bolton-Hunter de structure voisine de l'iodotyrosine, sont reconnues par les enzymes et rapidement métabolisées.

Le groupe hydroxyle du phénol peut être conjugué au niveau hépatique avec le sulfate ou l'acide glucuronique. Cette réaction a lieu principalement dans le foie et à degré moindre dans les reins. Les métabolites résultants sont alors plus facilement éliminés.

II-8) Contrôle de la pureté radiochimique et purification

La mesure de la pureté radiochimique (PRC) est le plus souvent réalisée par analyse radiochromatographique, généralement par chromatographie ascendante sur papier (chromatographie couche mince ou CCM).

II-8-1) Techniques analytiques pour le contrôle des molécules marquées

La détermination du pourcentage de molécules marquées doit prendre en compte le fait que le radioélément est présent à l'état de trace, c'est à dire à des concentrations très faibles de 10^{-9} à 10^{-12} M alors que la molécule vectrice est à des concentrations de 10^{-3} à 10^{-6} M. Les méthodes physico-chimiques usuelles ne sont pas applicables : les méthodes généralement employées sont la précipitation, la chromatographie couche mince (CCM), la chromatographie sur colonne et l'électrophorèse.

- Mesure de la PRC par précipitation

Ce test consiste à faire précipiter les protéines en solution en présence d'une solution d'acide trichloracétique à 20 % (W/ vol) et de BSA 5%. Après centrifugation, le surnageant contenant l'iode libre et le culot contenant la protéine marquée sont recueillis et les activités sont mesurées au compteur gamma.

- La CCM

Cette méthode utilise des supports variés allant de la cellulose à la silice phase greffée. Les diverses espèces se distribuent différemment entre la phase stationnaire, le support et le solvant d'éluion selon leurs interactions avec l'un ou l'autre (polarité, hydrophilie ...).

Les différents produits radioactifs sont révélés soit par découpage et comptage à l'activimètre ou au compteur gamma, soit par lecture à l'aide d'un radiochromatographe ou par impression d'un film sensible. Les résultats sont quantifiés en comptant la radioactivité de chaque tache. La méthode CCM est une méthode simple à mettre en œuvre, qui demande une faible quantité de produit, avec des dépôts limités d'où une faible irradiation et un faible risque de contamination ainsi que peu de déchets.

- La chromatographie sur colonne

- Chromatographie de perméation sur gel

La technique de filtration sur gel est utilisée uniquement pour les produits à haut poids moléculaire, les différentes espèces étant séparées en fonction de leur taille et de leur masse moléculaire. La phase solide est constituée de polysaccharides qui forment des billes poreuses de petite taille ; les molécules de tailles supérieures à celles des pores traversent rapidement le gel et sont éluées, les petites molécules pénètrent à l'intérieur des pores et

sont éluées dans l'ordre décroissant de taille et de masse moléculaire, en fonction du trajet qu'elles parcourent.

- Chromatographie par échange d'ions

Cette technique sépare les espèces en fonction de leur charge. On utilise soit une colonne échangeuse de cations dans laquelle l'iode libre sous forme I^+ est capté par la phase solide, la molécule iodée étant éluée par un solvant approprié, soit une colonne échangeuse d'anions qui capte l'iode sous forme I^- .

- Chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) sépare les produits en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire (colonne) et pour la phase mobile (éluat). La solution est éluée à travers la colonne sous pression et ses différents constituants sont séparés en fonction de leur taille et de leur affinité. Le choix du type de colonne (phase inverse, échangeuse d'ion, chirale) et le choix de l'éluant vont conditionner la séparation des constituants. Sur colonne phase inverse, l'iodure, plus polaire, est élué en premier puis sont éluées les molécules marquées.

II-8-2) Techniques de purification

La purification des molécules marquées à l'iode peut être réalisée par perméation sur gel chromatographique sur colonne phase inverse ou bien par échange anionique avec capture des iodures. L'objectif est d'élué séparément l'iode libre de la molécule marquée et d'éliminer une partie des réactifs.

III) LE MARQUAGE AU TECHNETIUM 99m (^{99m}Tc)

Le but de la médecine nucléaire est l'utilisation de molécules marquées à usage diagnostique ou thérapeutique. Les radionucléides technétium (^{99m}Tc) et rhénium (^{188}Re ou ^{186}Re) présentent un intérêt primordial. Le technétium est le radio-isotope le plus communément utilisé en médecine nucléaire uniquement à visée diagnostique, le rhénium émetteur bêta d'énergie élevée, donc très ionisant, est utilisé en thérapie.

Ce sont tous les deux des métaux de transition, ils présentent des caractéristiques physico-chimiques voisines : ils obéissent tous deux à la chimie des complexes.

En médecine nucléaire, ces radionucléides forment des complexes que l'on peut classer en deux catégories. On distingue :

- Soit le complexe métallique stable dans lequel l'isotope, le technétium 99m essentiellement, fait partie intégrante de la structure active et sans lequel la molécule ne serait pas délivrée à sa cible. Le complexe technétié ne doit pas être métabolisé dans l'organisme. La molécule marquée est utilisée en général pour étudier des fonctions physiologiques et biologiques des organes (fonction rénale, perfusion cérébrale, fonction cardiaque).

- Soit le complexe métallique servant uniquement de traceur et qui est lié à une molécule biologiquement active spécifique d'une fonction ou d'un récepteur. On suit une seule fonction ou une seule voie biologique (ex : étude des récepteurs dopaminergiques dans la maladie de Parkinson). La fixation de l'isotope se fait essentiellement par l'intermédiaire d'un chélate bifonctionnel.

Les complexes technétiés de la première classe sont prédominants. Par contre, les biomolécules utilisées en médecine nucléaire sont généralement marquées à l'iode (^{123}I ou ^{131}I) et rarement par des complexes des métaux de transition. Pour une meilleure utilisation en routine, un meilleur approvisionnement et un coût plus modéré, l'iode devrait être substitué par du ^{99m}Tc pour le diagnostic ou du rhénium ($^{188/186}\text{Re}$) pour la thérapie. Cependant, ce radiomarquage entraîne des modifications physico-chimiques plus importantes du fait de l'ajout d'une structure de grande taille (chélate plus métal) par rapport à l'ajout d'un simple atome d'iode ; l'interférence avec l'activité biologique et les propriétés physico-chimiques augmentant avec la taille du complexe marqué. C'est pourquoi les études doivent tendre vers des complexes de petite taille, stables, avec des propriétés physico-chimiques (hydrophilie et lipophilie) correspondant à celles de la biomolécule. D'autres limitations interviennent dans la production de radiopharmaceutiques au sein d'un service de médecine nucléaire : la durée du marquage doit être courte et en rapport avec la demi-vie du traceur (pour une utilisation optimale des radiopharmaceutiques en routine clinique, la réaction de marquage au technétium doit être inférieure à 60 minutes), la réaction doit être réalisée en une étape pour une préparation en routine, la pureté radiochimique doit être supérieure à 95 % et aucune purification ne doit être nécessaire, ceci afin de diminuer le temps de préparation et éviter tout risque de rupture de la chaîne de stérilité. Toutes les préparations doivent être diluées dans du sérum physiologique ou un tampon susceptible d'être injecté à l'homme (Alberto R.1999).

III-1) Propriétés physico-chimiques et obtention du technétium

La sélection d'un radionucléide à but diagnostique résulte d'un compromis entre ses caractéristiques nucléaires (émission γ comprise entre 100 et 200 Kev compatible avec la gamma-caméra, demi-vie courte, absence d'émission β et α) et sa disponibilité (méthode de production et coût).

Le technétium (Tc, $Z = 43$) est un métal de transition artificiel découvert par Perrier et Ségré en 1937. Parmi les 41 isotopes actuellement identifiés, tous radioactifs, allant de l'isotope 85 à l'isotope 115, seul le technétium 99m (^{99m}Tc) est utilisé en clinique (Du Moulinet d'Hardemare A 1998). Le technétium présente un intérêt médical pour l'analyse scintigraphique car c'est un émetteur γ pur de 140 Kev parfaitement adapté aux γ -caméras avec une demi-vie de 6,023 heures, permettant d'administrer aux patients une forte activité, avec pour conséquence de bonnes images scintigraphiques sans risque d'irradiation excessive. Il est produit par un générateur de molybdène ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) permettant l'obtention du technétium ^{99m}Tc quotidiennement et pour un coût limité. Ses propriétés chimiques lui permettent de former facilement des complexes organiques. L'ensemble de ces caractéristiques fait que les molécules technétiées représentent plus de 70% des radiopharmaceutiques utilisés en médecine nucléaire et que le technétium 99m reste le radioélément de choix pour la synthèse de nouveaux traceurs à usage diagnostique (De Jonge F.1996, Jurisson S. 1999).

Le technétium 99m provient de la désintégration du molybdène 99 radioactif. Il s'isomérisse par émission γ pure en Technétium 99 lui-même émetteur β^- ($E_{\beta_{\max}}$ 300 Kev) de période longue ($2,1 \cdot 10^5$ ans).

Le ^{99}Tc est obtenu à partir du molybdène par voie directe (13 %) et à partir de ^{99m}Tc (87%) par voie indirecte (Figure 5).

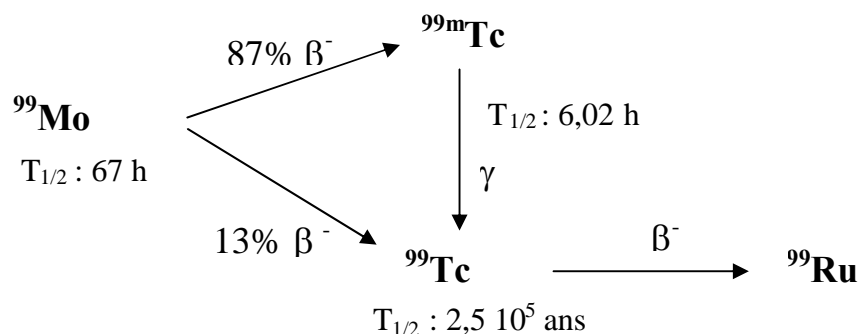
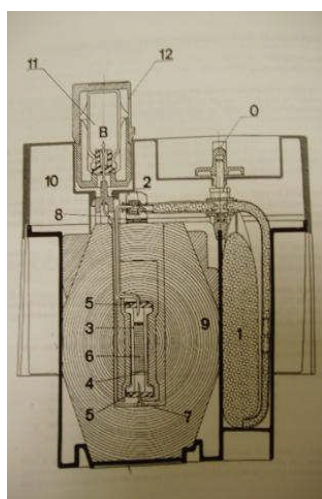


Figure 5 : Schéma de la désintégration du Molybdène 99.

En pratique, le technétium est obtenu par décroissance de molybdène-99 fixé sur une colonne d'alumine contenue dans une petite colonne de verre. L'ensemble, placé dans une protection plombée constitue le générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. Le molybdate polymérisé $[\text{}^{99}\text{Mo}_7\text{O}_{24}]^{6-}$ fortement adsorbé sur la colonne échangeuse d'ion décroît continuellement en technétium $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]$ et $[\text{}^{99}\text{Tc}]$. Cette colonne est éluée par une solution stérile de NaCl 0,9 % qui va entraîner sélectivement les ions technétium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et ^{99}Tc , présents sous forme de pertechnétate ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ou $\text{Na}^{99}\text{TcO}_4$) faiblement fixés, alors que le molybdène est retenu sur l'alumine (Jurisson S. 1999) (Figure 6).



- 0 robinet d'ouverture de la tubulure reliant la poche de perfusion à la colonne
- 1 poche de NaCl 0.9%
- 3 colonne chromatographique
- 6 Alumine
- 9 Protection plombée
- 11 Flacon d'éluat



Figure 6 : Générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Elumatic III, Schering-Cis bio International).

III-1-1) Chimie du technétium

Le technétium (Tc) est un métal de la deuxième série des éléments de transition appartenant au groupe VIIB : comme le manganèse et le rhénium, il possède sept électrons « s » et « d » sur la couche de valence (configuration électronique $[\text{Kr}] 4d^5 5s^2$). Comme tous les éléments de transition, sa chimie est dominée par la formation de complexe métal/ligand donneur.

Le technétium existe à différents degrés d'oxydation de (-I) à (+VII), cependant seuls les états (+I), (+III), (+V) et (+VII) sont stables en présence d'eau ; les autres degrés d'oxydation ne se forment qu'en présence de ligands autres que l'eau. En solution aqueuse, à potentiel élevé et à pH physiologique, sa forme stable est l'anion TcO_4^- (+VII), seule forme commerciale (Dewannjee M. 1990, Du Moulinet d'Hardemare A. 1998). En médecine nucléaire, il est fourni par un générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ sous forme d'un éluat de NaCl 0,154 M contenant l'espèce $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- \text{Na}^+$ (VII) à concentration inférieure à 10^{-6} M.

C'est la seule forme chimique disponible et toute la chimie du métal s'organise à partir de cet ion.

Le technétium 99m peut se coordiner avec un grand nombre de chélates incluant une grande variété de ligands tétradentates N ou S (N_2S_2 , N_3S avec un cœur donneur) et les dérivés de l'éthylène triamine pentaacétique (DTPA).

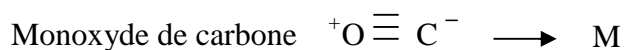
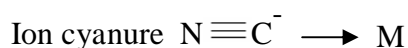
III-2) Les complexes organométalliques technétiés.

On appelle complexe un édifice polyanionique dans lequel un ion métallique est lié à plusieurs ions ou molécules par l'intermédiaire d'atomes possédant des doublets électroniques non partagés. Qu'ils soient neutres ou le plus souvent ioniques, les complexes comportent toujours une entité appelée «accepteur» qui accepte le ou les doublets électroniques (cation métallique M) et une ou plusieurs entités «donneurs» de doublets (ligands ou coordinats L_n). Les donneurs d'électrons (ions ou molécules) réagissent avec les métaux ou leur ion pour donner des complexes.

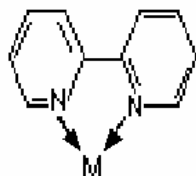
Le nombre d'atomes lié à l'atome central est appelé l'indice de coordination. Les complexes ont des indices de coordination allant de 1 à 9 mais la plupart sont d'indice 2, 4, 5, 6 et décrivent dans l'espace respectivement un modèle plan, carré, pyramidal à base carrée ou octaédrique. Le complexe le plus fréquent est l'octaèdre de degré 6.

Le nombre de liaisons entre le métal et le ligand est appelé «denticité». Un ligand qui forme une liaison avec l'atome central est dit unidenté, bidenté lorsqu'il donne 2 liaisons. Il existe aussi des ligands tri, tétra, penta et hexadentés. Lorsqu'un ligand possède plusieurs atomes donneurs pour un seul métal et que la liaison forme un ou plusieurs cycles, il est appelé chélate.

Ligand monodenté



Ligand bidenté



- **La stabilité du complexe**

La stabilité des complexes dépend de l'équilibre cinétique et thermodynamique, c'est-à-dire de la vitesse à laquelle le complexe se forme et se dissocie et de l'énergie nécessaire à la liaison métal-ligand.

- La stabilité du complexe est accrue lorsque les ligands sont associés entre eux (effet coopératif de N_2S_2).
- La stabilité est augmentée avec le nombre de cycles autour du métal.
- La stabilité augmente avec les systèmes rigides (macrocycle).

Théorie de Pearson

La réaction entre le métal et ses ligands est potentiellement réversible et est caractérisée par une constante de stabilité thermodynamique. La stabilité du complexe est conditionnée par le nombre d'atomes donneurs (denticité) et la nature de l'atome donneur (dureté).

- Les bases dures dont l'atome donneur est de petite taille, très électronégatif, faiblement polarisable, se lient plus facilement avec les centres métalliques acides durs (de petite taille, peu électronégatifs et faiblement polarisables). La liaison est une liaison de type ionique.
- Les bases molles avec un atome donneur peu électronégatif et fortement polarisable donnent des liaisons fortes avec les métaux à caractère acide mou. La liaison est de type covalente.

Cependant, la consistance des ligands et des centres métalliques peut être influencée par la présence de substituants. Ainsi, la mollesse d'un composé peut être réduite par la présence de substituants durs. Ce complexe permet d'orienter le choix des atomes donneurs à introduire dans le ligand en fonction du radionucléide. Ainsi, pour le technétium $99m$, les atomes les plus souvent utilisés sont N, S, P, O ou Cl et Br, et un deuxième choix est ensuite effectué en fonction du degré d'oxydation du métal.

- Exemple de dureté des ions métalliques M (acide) et des ligands (Base) :
 - Acide dur : H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Al^{3+} , In^{3+} .
 - Acide mou : Pd^{2+} , Pt^{2+} , Tl^+ .
 - Base dure : RNH_2 , NH_3 , $CHCOO^-$, ROH , RO^- .
 - Base molle : H^- , R^- , CN^- , R_2S , RSH , RS^- .

Effet stérique

La stabilité est augmentée avec la basicité des groupes donneurs, or cette dernière augmente lorsque le degré de substitution est élevé. Cependant si l'ajout de groupements substituants sur l'atome donneur augmente la basicité, il augmente l'encombrement stérique de la molécule ce qui peut déstabiliser le complexe. On diminue cet encombrement stérique en reliant les atomes donneurs par une chaîne alkyle, généralement un groupe éthylène. Ces deux paramètres, basicité et chaîne alkyle, que l'on rencontre dans la structure éthylène-diamine permettant d'obtenir des complexes stables.

- **Les liaisons dans le complexe**

La liaison entre le métal et le ligand fait intervenir les orbitales «d», l'interaction est soit de type covalente avec mise en commun des doublets électroniques, soit ionique.

- **Le degré d'oxydation du complexe**

Dans un complexe, le technétium peut se présenter à tous les degrés d'oxydation, de Tc (+VII) [TcO_7] à Tc (-I). Les états d'oxydation qui dominent sont (+I), (+III) et (+V). Le degré d'oxydation obtenu va dépendre de nombreux paramètres de la réaction : nature du réducteur, nature des ligands et coligands et des conditions de réaction : pH et température. Par exemple, la réduction du pertechnétate par l'étain stanneux en présence d'un ligand tétradentate type cyclam produit un complexe technétié à l'état (+V) alors qu'en présence d'un alkyl isonitrile (MIBI) un complexe est formé avec le technétium à l'état (+I). Le ligand bidentate phosphine, DMPE, donne à pH acide et à température ambiante un complexe Tc(+V), à pH acide et à température élevée un complexe Tc(+III), à pH basique et à température élevée un complexe Tc(+I).

Cependant, le facteur le plus important est la nature de l'atome donneur. Les « ligands durs » stabilisent les formes «acides durs» du métal, donc les degrés d'oxydation élevés ; à l'inverse les ligands mous se complexent préférentiellement au métal de degré d'oxydation inférieur. D'autre part, les ligands π -donneurs stabilisent les complexes avec un degré

d'oxydation élevé alors que les complexes avec un technétium à faible état d'oxydation (+I à +III) sont stabilisés par l'introduction de ligands π -accepteurs (phosphine, isonitrile, alcène) (Nowotnick D.P.1996).

Le ^{99m}Tc à l'état d'oxydation (+V) donne préférentiellement des complexes dans lesquels le métal est lié à un ou deux atomes d'oxygène, avec quatre ou cinq sites de coordination libres permettant de se lier aux atomes donneurs des ligands. Les complexes à cœur dioxo se lient aux ligands durs tandis que le cœur mono-oxo se lie aux ligands mous (Nowotnick D.P.1996).

- **La charge globale du complexe**

La charge du complexe varie en fonction de la nature du cœur ; ainsi un ligand dianionique donne avec le cœur « oxo » un complexe cationique et avec le cœur «nitruro» un complexe neutre. Elle varie en fonction des ligands, les ligands neutres comme les amines produisent des complexes cationiques et les ligands anioniques comme les carboxylates et les thiols produisent des complexes anioniques. Elle dépend également du pKa du complexe et éventuellement du pH de la solution dans le cas des complexes susceptibles d'exister à l'état acide / base.

Les complexes neutres ou chargés négativement sont essentiellement des complexes de type $[\text{Tc}=\text{O}]$ de structure bipyramidale. Ceux chargés positivement sont essentiellement de type $[\text{O}=\text{Tc}=\text{O}]$ avec 4 ligands neutres ; ils sont de structure octaédrique (Liu S. 1999).

La charge du complexe détermine sa nature physico-chimique, elle est importante pour le devenir du complexe. Les complexes neutres sont lipophiles, les complexes anioniques sont basiques et les complexes cationiques acides.

III-3) La synthèse du complexe

Pour pouvoir former des complexes, le technétium doit être réduit à des degrés d'oxydation inférieurs à VII ce qui forme des orbitales « d » vides lui permettant ainsi de se lier à des ligands donneurs d'électrons N, S, P, carboxylates, avec un nombre de coordination de 4 à 9. Comme mentionné précédemment, le degré d'oxydation va dépendre de nombreux paramètres : nature du réducteur, conditions de réaction (pH et température) et surtout de la nature des ligands et coligands (Verbeke K. 2003).

Les formes réduites du technétium doivent être complexées par le ligand dès leur formation sinon elles réagissent avec les molécules d'eau et l'oxygène pour donner des espèces cationiques qui évoluent en complexe de type $^{99m}\text{TcO}_2$ ou de ses formes hydroxylées. Ces derniers n'interagissent pas avec les molécules biologiques (Nowotnick D.P.1999).

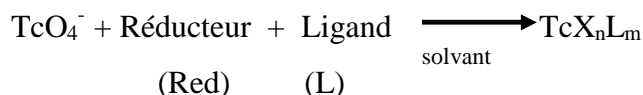
III-3-1) La réduction du pertechnétate

De nombreux réducteurs peuvent théoriquement être utilisés : Fe(II), Cu(II), thiols, phosphines (ligand et réducteur), borohydrure de sodium ou bisulfite de sodium. Cependant le plus utilisé reste l'étain stanneux (Sn^{2+}) disponible sous forme de chlorure d'étain (stable, soluble dans l'eau, peu toxique). Le choix du réducteur va dépendre de la molécule à marquer. Ainsi, le borohydrure de sodium et les thiols sont préjudiciables aux peptides cycliques contenant un pont disulfure, le cuivre forme des complexes stables avec les ligands N_2S_2 , l'étain donne par hydrolyse, essentiellement en milieu basique, des colloïdes ($^{99m}\text{TcO}_2/\text{SnO}_2$) (Nowotnick D.P.1999, Liu S. 1999).

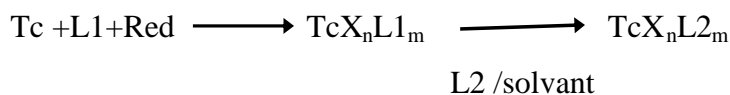
Dans le milieu réactionnel, on ajoute parfois des agents auxiliaires : des antioxydants comme l'acide ascorbique qui évite la radiolyse, des ligands intermédiaires gluconate et tartrate, ce dernier stabilisant les ions Sn^{2+} et les empêchant de précipiter, des stabilisateurs type tricine, des molécules d'oxalate ou de citrate qui favorisent la réaction de complexation, et des solutions tampons (Le Gal J. 2004).

III-3-2) Les voies de synthèse

La chimie des complexes utilisée en médecine nucléaire est une chimie à l'état de trace (10^{-11} à 10^{-12} M). Deux méthodes sont utilisées, le marquage «direct» où le pertechnétate est réduit en présence du ligand et la méthode de synthèse dite «indirecte» lorsque le ligand «actif» est un ligand faible. Dans ce cas, on réalise en premier lieu un complexe intermédiaire peu stable puis on effectue un échange de ligand. Le choix de la méthode sera fonction des propriétés thermodynamiques et cinétiques du complexe actif avec pour contrainte la nécessité de complexer rapidement le technétium afin d'éviter son oxydation par l'oxygène de l'air et les interactions avec les molécules d'eau.

Marquage direct : complexation rapide

Le solvant est généralement de l'eau si le ligand est hydrophile, ou un mélange alcool/eau. Le réducteur est fréquemment du chlorure d'étain en milieu acide ou du tartrate d'étain en milieu basique. On aboutit à la formation de $[\text{TcO}_2]^+$ ou $[\text{TcO}]^{3+}$ à l'état (+V) capable de se lier à 4 coordinats.

Marquage indirect : complexe intermédiaire

Le marquage est réalisé par échange de ligands en 2 étapes. Au cours de la première étape, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ est réduit en présence de L1 en excès afin de synthétiser, par une réaction rapide, un complexe peu stable. Puis dans un deuxième temps, le ligand biologiquement actif L2 est ajouté ce qui donne un complexe plus stable avec une meilleure affinité mais qui se forme plus lentement. Cette technique évite la réaction rapide de l'eau sur le technétium et donc la formation de l'espèce réduite TcO_2 .

III-4) Structure générale des complexes technétiés

La formule générale des complexes technétiés est soit $[\text{Tc X}_n \text{L}_m]$ avec TcX cœur du complexe, X= oxygène, soufre ou azote et L le Ligand, soit $[\text{Tc X}_6]$ avec X = Br, Cl, CN

Les cœurs de technétium les plus fréquents sont :

- $[\text{TcO}_2]^+$ cœur transdioxoTc
- $[\text{TcO}]^{3+}$ cœur monoxoTc
- TcN cœur nitruroTc

Comme dans le cas de l'iode, le marquage au technétium 99m peut être réalisé soit par complexation directe du métal sur une molécule qui possède des ligands donneurs (complexes originaux ou «metal essential»), soit par l'intermédiaire d'un ligand bifonctionnel (synthon ou «BFCA» pour Bifonctionnel Chelating Agent). Dans le premier

cas, la biodistribution de la molécule marquée dépend des propriétés physico-chimiques du complexe formé par l'association métal-molécule, c'est à dire de sa taille, de sa charge, et de sa lipophilie. La taille va influencer le passage transmembranaire et les voies d'élimination, la charge et la lipophilie le passage de la barrière hémato-encéphalique et la perméabilité membranaire. Dans le deuxième cas, le complexe sert uniquement de traceur et il est vectorisé jusqu'au site d'action par l'intermédiaire d'une molécule biologique ; le radiomarquage ne doit pas modifier les mécanismes biologiques du vecteur.

III-4-1) Les complexes ^{99m}Tc originaux (« Tc essential »)

Ils constituent actuellement la majorité des complexes commercialisés, essentiellement au degré d'oxydation +V, +IV et +I. Cette liste n'est pas exhaustive et nous n'aborderons que les complexes technétiés rencontrés en médecine nucléaire.

III-4-1-1) Complexes de degré d'oxydation I, et III

Ces complexes ont pour caractéristique une liaison du métal vers le ligand à forte densité électronique. Ce sont donc essentiellement des ligands qui possèdent une double ou une triple liaison : isonitrile, imines, aromatiques.

- **Complexes Tc (+I)**

Le plus connu en médecine nucléaire est le ^{99m}Tc -Sestamibi (Sestamibi ou MIBI ou métoxy-isobutyl-isonitrile, Cardiolite[®]) utilisé dans la scintigraphie cardiaque, la scintigraphie des parathyroïdes et la recherche de tumeurs cérébrales (Figure 7). Le ligand de type alkyle-isonitrile est riche en groupes accepteurs. Ce complexe très stable et hydrosoluble est obtenu avec un excellent rendement de marquage.

L'équipe d'Alberto et Schibli (Alberto R. 1999) a développé un complexe carbonyle dans lequel le technétium ou le rhénium à l'état I sont liés à trois molécules de monoxyde de carbone et à trois ligands donneurs ; il est utilisé aujourd'hui comme synthon bifonctionnel dans de nombreuses études (aquaion tricarbonyle) (Chapitre III-4-2-3).

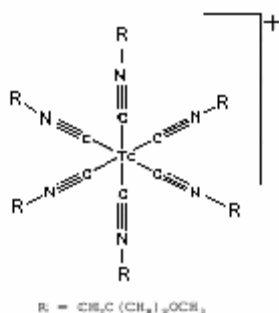


Figure 7 : Structure d'un Complexe Tc (+I) : le MIBI-[^{99m}Tc] (Cardiolite®).

- Degré d'oxydation III

C'est un degré d'oxydation intermédiaire et de ce fait le métal peut se coordonner avec des « ligands mous » tels que les phosphines ou « des ligands durs » stabilisant des degrés d'oxydation plus élevés comme les carboxylates ou thiolates. La structure du complexe est de type octaédrique avec 6 coordinats.

III-4-1-2) Complexe de degré d'oxydation IV

Ces complexes sont de formule générale [TcO₂, xH₂O] et [TcX₆]²⁻. Ils sont constitués lors des réactions de synthèse en milieu acide et en présence de traces de réducteur. Les complexes de degré IV sont les premiers complexes à avoir été utilisés en médecine nucléaire pour les scintigraphies osseuses. Le technétium est lié généralement à des ligands alkyldiphosphonates (MDP, HMDP..) et forme un complexe à tropisme osseux qui va se fixer aux cristaux d'hydroxyapatite de l'os en formation.



III-4-1-3) Complexes Tc (+V)

Ce sont les complexes les plus fréquemment rencontrés en médecine nucléaire. Ils sont essentiellement représentés par les cœurs [TcO₂]⁺, [TcO]³⁺ et [TcN]²⁺. Ils sont synthétisés le plus souvent par voie directe.

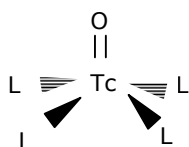
La formation d'un cœur [TcO₂]⁺ ou [TcO]³⁺ préférentiellement va dépendre :

- De la nature des ligands qui vont stabiliser le complexe en position « CIS » (même côté du plan). Les ligands anioniques π donneurs favorisent le cœur $[\text{TcO}]^{3+}$ alors que les ligands sans effet π stabilisent le cœur $[\text{TcO}_2]^+$.

- Des contraintes stériques, le cœur $[\text{TcO}]^{3+}$ étant formé lorsque la structure octaédrique est impossible.

Les principaux ligands sont situés dans les lignes supérieures et sur les colonnes de droite du tableau périodique de Mendeleev: O, N, S, P. Les complexes technétiés ont une structure pyramidale à base carrée ou octaédrique en fonction du type de complexe formé.

- Cœurs de technétium $[\text{TcO}]^{3+}$



Le cœur «mono-oxo» est le plus répandu et se forme facilement au cours de la réduction du pertechnétate en milieu aqueux légèrement acide. Le métal est considéré comme penta-coordonné avec le métal légèrement au-dessus du plan, plan constitué par les quatre atomes ligands. Le sixième ligand est souvent considéré comme étant en dehors de la sphère de coordination et est très labile.

Ces complexes sont essentiellement constitués d'un ligand tétradentate, ligand π donneur (O, S, Cl) qui stabilise la liaison, ou ligand σ ($-\text{NR}_2$, $-\text{NHR}$). Ce sont des chélates « durs », ils sont stables en solution aqueuse et ils sont souvent inertes. Ils sont souvent de charge neutre ou négative.

En médecine nucléaire, le ligand se présente sous forme N_4 , N_3S ou N_2S_2 (Figure 8). Le radiopharmaceutique le plus connu est l'examétazine (HMPAO ou PnAO) Ceretec[®] utilisé pour la scintigraphie cérébrale ou le marquage des polynucléaires.

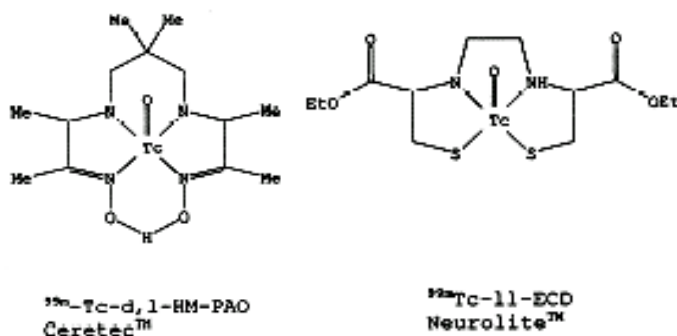


Figure 8 : Structure de deux complexes à cœur de technétium $[\text{TcO}]^{3+}$: l'HMPAO- $[\text{Tc}]^{3+}$ et l'ECD- $[\text{Tc}]^{3+}$.

La recherche porte aujourd'hui sur les ligands tétradentés N, S et les ligands mixtes (3+1) utilisés comme ligands bifonctionnels.

Les ligands tétradentés N, S sont des molécules possédant des atomes d'azote et au minimum un groupement thiol. Les ligands les plus connus sont les ligands N₂S₂ de type diaminedithiols (DADT), monoamidemonoaminedithiols (MAMA) et diamidedithiols (DADS).

- Cœurs de technétium [TcO₂]⁺

Le cœur [TcO₂]⁺ se forme essentiellement en milieu basique. Les ligands sont soit des ligands π accepteurs : -C ≡ N, phosphines (Figure 9), pyridine, soit des ligands σ bidentés (amine) ou tétradentés (cyclam).

Tous les dérivés à cœur «TRANS» (De part et d'autre du plan) dioxo sont hexacoordonnés, ils sont généralement de charge positive.

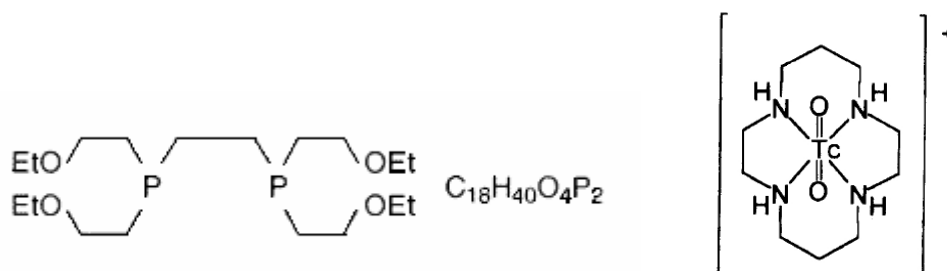


Figure 9 : Ligands à cœur [TcO₂]⁺. A gauche le ligand phosphine Tetrofosmin [6,9-bis (2-ethoxyethyl)-3,12-dioxa-6,9-diphosphatetradecane (Myoview[®]), à droite un ligand amine tétradenté (cyclam).

- Autres cœur de technétium

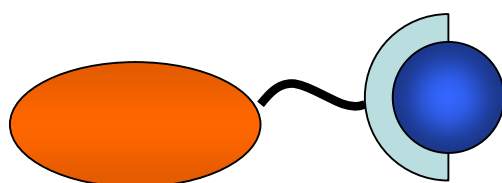
Le degré d'oxydation V est également représenté par les cœurs nitruro technétium (TcN), et sulfido technétium (TcS). Ils sont moins employés, du fait de difficulté de préparation en milieu stérile ou de leur faible stabilité en milieu aqueux. Parmi les cœurs nitruro technétium, on peut citer le NOET qui est un traceur myocardique et l'HYNIC qui est utilisé comme synthon bifonctionnel, mais aucun n'est utilisé en médecine nucléaire.

III-4-2) Le radiomarquage par l'intermédiaire de synthon bifonctionnel

Un synthon est un ligand possédant à une extrémité les propriétés d'un ligand multidenté permettant la coordination du métal et à une deuxième extrémité un groupe fonctionnel permettant une liaison covalente avec la molécule à marquer. Il doit donner des complexes stables.

L'utilisation de synthon permet de marquer les molécules biologiques et d'étudier les récepteurs cellulaires. Le mécanisme de biodistribution fait appel à la reconnaissance : anticorps-antigène, ligand-récepteur. Les radiopharmaceutiques sont spécifiques d'une cible : cellules tumorales ou récepteurs dopaminergiques pour l'étude des maladies cérébrales.

Ces radiopharmaceutiques vectorisés sont constitués d'un vecteur biologique, d'un synthon, parfois d'un « spacer » ou bras espaceur, et du métal (Figure 10).



Molécule biologique cible « spacer » chélate métal

Figure 10 : Représentation schématique de l'approche BFCA.

- Le technétium 99m sert uniquement à la détection, il n'intervient pas dans le mécanisme de reconnaissance.
- Le chélate bifonctionnel permet de coupler le technétium au vecteur. En fonction de la structure du chélate, on peut modifier les propriétés physico-chimiques du radiopharmaceutique et sa biodistribution.
- Un « spacer » est parfois utilisé afin de limiter l'interaction vecteur biologique-chélate/métal ; on utilise souvent une chaîne hydrocarbonée ou une chaîne peptidique. Certaines études ont présenté un bras métabolisable afin de faciliter l'élimination de l'isotope.
- Le vecteur transporte le technétium jusqu'à la cible. De nombreuses molécules ont été radiomarquées, physiologiques ou non, anticorps, peptides ou hormones.

De nouveaux synthons sont particulièrement étudiés : les systèmes Tc(V) oxo tétradentate amino et/ou amido $N_xS(4-x)$ et le système TcO(3+1) utilisant une

combinaison d'un ligand linéaire tridentate et d'un thiol monodentate. De nombreuses équipes développent des dérivés du MAG3 et de l'HYNIC, ce dernier étant surtout utilisé dans les premières étapes de développement des nouveaux traceurs. Une nouvelle approche inclue l'utilisation de complexe Tc(I) avec un cœur $Tc(CO)_3^+$; deux structures ont été sélectionnées les $CpTc(CO)_3$ où la molécule active est liée à un cycle pentadienyle par une liaison ionique et les $facTc(CO)_3$ dans lesquels la sphère octaédrique est complétée par des ligands choisis. Des phosphines solubles dans l'eau servent aussi de chélate bifonctionnel. Différents facteurs doivent être pris en compte dans le choix du chélate :

- Les aspects physico-chimiques.
- La stabilité thermodynamique.
- La stabilité cinétique.
- La stabilité de l'état d'oxydation.
- Les sites de liaison : extrémités N ou C terminales et/ou chaînes latérales.
- La préservation de l'activité biologique de la molécule marquée.

III-4-2-1) L'HYNIC

L'HYNIC (hydrazino(pyridine-3-carboxylic) ou 2-hydrazinonicotinamide) (Figure 11) possède à une extrémité une fonction acide (activée ou non par un dérivé N-hydroxysuccinimide) qui se lie aux amines primaires des vecteurs, et à l'autre extrémité une fonction hydrazine qui se complexe au technétium pour donner un cœur diazotechnétium.

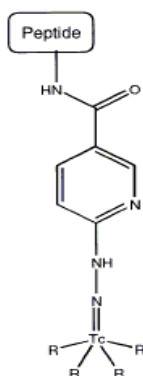


Figure 11 : Structure du complexe $[^{99m}Tc]$ -HYNIC-molécule.

Il a été utilisé pour marquer de nombreuses biomolécules : IgG, analogues de la somatostatine, oligonucléotides, sérum albumine humaine, annexine V. Le marquage à

l'HYNIC est applicable à tous les peptides, cependant il est utilisé essentiellement pour le marquage des protéines de grande taille car la fixation de HYNIC sur les résidus amines libres de l'acide aminé terminal ou des résidus lysine peut modifier la reconnaissance de la cible.

La réaction a lieu en milieu aqueux par ajout de technétium en présence d'un réducteur. Le temps de réaction, le pH et la température sont à déterminer pour chaque peptide.

Le complexe HYNIC- [^{99m}Tc] est peu stable, il est nécessaire de former un complexe mixte technétié en présence de coligands. Plusieurs coligands ont été décrits, comme la tricine, le glucoheptonate, l'acide éthylène diamine diacétique (EDDA) (Ono M. 2001, Ferro-Flores G 2006), les phosphines, ainsi que des systèmes ternaires contenant une association tricine-phosphines hydrosolubles ou tricine-N imine-hétérocycle (Jurisson S. 1999, Nowotnick D.P. 1999). Ces coligands complètent la sphère de coordination, maintiennent la structure et stabilisent le technétium à l'état d'oxydation V. Le principal inconvénient est que l'addition de coligands, en raison de la taille du chélate, influence la biodistribution, entraîne des perturbations biologiques et pharmacocinétiques de la molécule biologiquement active, voire inhibe l'activité biologique ou la reconnaissance de la cible. Il est indispensable de contrôler la réaction afin de limiter le nombre de groupements HYNIC par molécule, entre 0,5 et 1.

Le choix du coligand est important : en présence de tricine, on synthétise une molécule marquée très hydrosoluble avec un marquage stable, en présence d'EDDA on augmente le lipophilie de la molécule qui va se distribuer dans le foie, l'intestin et le sang.

D'autre part, l'ajout de HYNIC provoque une fixation protéique importante pour les molécules de faible poids moléculaire par échange de ligands tricine/ protéines du plasma.

Ce synthon est surtout utilisé en recherche pour le marquage de biomolécules en début de développement ou pour étudier leur biodistribution. En effet, si le marquage est réalisé aux conditions de pH et de température normales, il nécessite un processus en plusieurs étapes peu compatible avec un marquage en routine dans un service de médecine nucléaire.

- Les systèmes binaires et ternaires

La sphère de coordination est complétée par deux molécules soit identiques (système binaire) soit différentes (système ternaire) qui stabilisent l'ensemble (Liu S. 1999, Ono M., 2001). Les coligands les plus fréquents sont la tricine et le glucoheptonate. DuPont

Pharma[®] a développé un système ternaire ^{99m}Tc HYNIC-tricine-phosphine. Ce dernier présente une excellente stabilité et permet de modifier la lipophilie de la molécule marquée en modifiant la nature des phosphines, cependant sa fabrication nécessite une étape de chauffage à 95°C qui risque de dégrader les peptides (Jurisson S. 1999) (Figure 12).

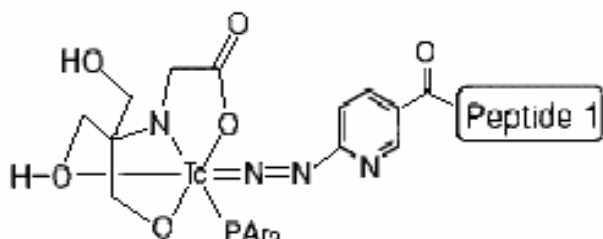


Figure 12 : Marquage par $\text{TcO} (+\text{V})$ en présence de coligands (tricine, phosphine).

- Synthon bifonctionnel : S-6-HYNIC

Abrams *et al* (Abrams M.J. 1990) furent les premiers à utiliser le succinimidyl-6-hydrazino pyridine 3-carboxylate (ou S-6-HYNIC) pour marquer les immunoglobulines humaines (IgG) avec d'excellents résultats. On obtenait ainsi un rapport HYNIC/IgG de 3/1 avec une pureté radiochimique supérieure à 98%. Cette méthode a été reprise par l'équipe de Blanckenberg et Verbeke pour marquer l'annexine V. Le S-6-HYNIC réagit avec les groupements amines libres des résidus lysine et forme une liaison hydrazinique stable (Blanckenberg F.G. 1998, Verbeke K. 2003).

Certains paramètres doivent être déterminés :

- La quantité de peptide et de réducteur : le rapport HYNIC/peptide doit être optimum afin d'avoir une bonne activité spécifique (nombre de moles de peptide froid non marqué le plus faible possible) sans modifier les propriétés biologiques du peptide. Le nombre de moles d'HYNIC introduites sur un peptide doit être compris entre 0,5 et 1 pour les petits peptides (Verbeke K. 2003).

- Les conditions de la réaction : température, temps, pH. Le pH doit être légèrement alcalin (entre 7,5 et 8,5) afin que le groupe amine libre de la lysine ne soit pas ionisé tandis que l'arginine, qui a un pKa plus élevé ($\text{PKa} > 12$) présente des résidus amine ionisés à ce pH.

Le couplage se fait généralement par méthode indirecte, S-6-HYNIC est lié à la protéine et la solution est purifiée, ^{99m}Tc est chélaté en présence d'un réducteur (SnCl_2) par un ligand

faible qui constituera le coligand (tricine, glucoheptonate). On mélange les deux solutions, le ^{99m}Tc se lie par transmétallation à l'HYNIC et à son coligand.

III-4-2-2) Les chélates $\text{N}_x\text{S}_{(4-x)}$

Trois classes principales de chélates peuvent être distinguées: les dérivés du MAG3 (mercapto acétyle glycine) complexant triamidethiols (N_3S), les chélates tétradentates N_2S_2 (DAT ou BAT) et les ligands (3+1) tridentates avec un thiol monodentate. Tous possèdent un groupe thiol pour la coordination du technétium, ils complexent le technétium sous forme Tc(V) et donnent un cœur mono-oxo.

La chimie est plus simple que pour l'HYNIC. Les chélates $\text{N}_x\text{S}_{(4-x)}$ présentent l'avantage d'être de plus petite taille et stables. Cependant, des perturbations biologiques restent possibles en fonction de la taille du complexe. De nombreux marquages technétiés de peptides et anticorps avec des systèmes de ligand N_3S et N_2S_2 ont été mis au point. Des modifications chimiques ont été apportées par différents auteurs sur les chélates soit pour modifier leurs propriétés physico-chimiques et par exemple les rendre plus lipophiles, soit pour simplifier les réactions de couplage aux molécules ou pour diminuer les interactions synthon-molécule :

- Adjonction d'une chaîne latérale lipophile.
- Inversion des séquences CO-NH en -NH-CO.
- Modification des acides aminés : glycine /sérine.
- Introduction d'un « spacer ».

Dans la plupart des cas le chélate est conjugué au peptide par une liaison ester. La séquence permettant la chélation du métal doit être incorporée à la molécule biologiquement active sur une position qui n'interfère pas avec le site de fixation au récepteur ; il est donc indispensable de modifier la biomolécule ou d'introduire une séquence permettant la fixation du synthon sur une position déterminée et de contrôler la réaction, ce qui implique plusieurs étapes de synthèse chimique (Jurisson S. 1999, Blok D. 2004). Afin de diminuer les interférences avec le groupe chélatant, on introduit un «spacer» constitué généralement d'une chaîne d'acides aminés. Ceci évite l'encombrement du peptide par le ligand. Du choix du «spacer» vont dépendre les propriétés physico-chimiques de la molécule marquée, une chaîne de polyglycine ou polylysine augmentant l'hydrophilie, une chaîne polycarbonée la lipophilie.

Les deux procédures, marquage après conjugaison ou conjugaison après marquage, ont été utilisées. Le technétium se complexe à l'état (V) avec un cœur oxo en présence de SnCl_2 . Les conditions de la réaction : temps, température variable de 25 à 100 °C, et pH sont fonction de la molécule vectrice.

- Le synthon MAG3

Deux dérivés du MAG3 ont particulièrement été étudiés comme agents chélatants bifonctionnels : le S-acétyl MAG3 et le S-benzoyl MAG3 (bétiatide) (Figure 13). Dans les deux cas, le soufre est protégé afin d'éviter son oxydation. Le S-acétyl MAG3 est déprotégé à température ambiante, le S-benzoyl MAG3 est déprotégé à 100°C (Blok D. 2004).

Certains auteurs ont activé la fonction carboxylique de la glycine terminale par formation d'un ester succinique afin de faciliter la liaison peptidique (Liu S.1999).

Les atomes de soufre et d'azote pouvant se lier au technétium, la molécule marquée peut se présenter sous différents états intermédiaires. Le technétium peut lier quatre souffres (donc 4 MAG3) puis rapidement il forme un complexe 2:1 (2 souffres et 2 azotes de la glycine, donc 2 MAG3), puis un complexe 1:1 (donc 1 MAG3), et la cinétique de ces réactions sera fonction du pH et du temps de réaction.

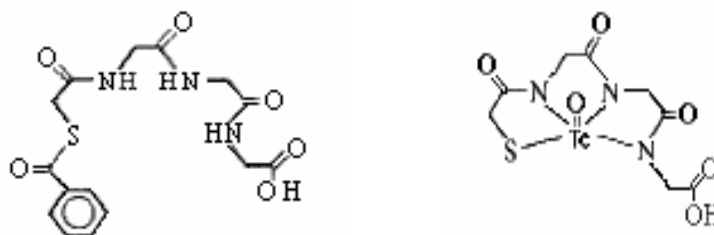


Figure 13 : Exemple de synthon N_3S : MAG3, bétiatide (à gauche) et $\text{MAG3-}^{99\text{m}}\text{Tc}$, mertiatide- $^{99\text{m}}\text{Tc}$) (à droite).

Le MAG3 a été utilisé pour marquer de nombreuses molécules : peptides, protéines, anticorps, ADN et autres molécules biologiques importantes.

III-4-2-3) Le complexe tricarbonyle

La synthèse du complexe tricarbonyle $[M(CO)_3(OH_2)_3]^+$ a été rapportée par Alberto et al en 1998 (Alberto R., 1998 et 1999). Récemment, l'utilisation de dérivés $[M(CO)_3(OH_2)_nX_m]^+$ (où M : ^{99m}Tc ou ^{186}Re et X un halogène) a permis d'incorporer ces isotopes à des peptides par remplacement des molécules d'eau par différents ligands : dérivés phosphines, dérivés thiols ou fonction amine en alpha des acides aminés N terminaux comme l'histidine (Waibel R. 1999). La grande stabilité et la petite taille de ce cœur tricarbonyle comparées à celles des autres cœurs technétiés comme le N_2S_2 en font un excellent candidat pour le marquage de biomolécules de petite taille comme les analogues de la somatostatine ou de la neurotensine et les ligands de récepteurs dopaminergiques ou sérotoninergiques.

La société Mallinckrodt a mis au point un kit de marquage (Isolink[®]) qui produit, en présence de technétium $^{99m}TcO_4^-$, un petit complexe technétié capable de se lier à un grand nombre de ligands, le $[^{99m}Tc(CO)_3(OH_2)_3]^+$. Ce complexe technétié est un « semi-aquaion » stable, dont les molécules d'eau très réactives peuvent facilement être substituées par un ligand donneur d'électrons. Le technétium est stabilisé à l'état d'oxydation (I), il est difficilement oxydable par l'oxygène et ne nécessite pas la présence d'un coligand (Liu S.1999).

$^{99m}TcO_4^-$ doit être réduit de l'état VII à l'état I. On doit utiliser un agent réducteur fort mais qui ne se coordine pas avec le métal réduit et qui est soluble dans les solvants : $NaBH_4$ (Alberto R. 1999). En fait, le kit utilise du sodium ou du potassium boranocarbonate $Na_2(K_2)BH_3CO_2$, agent solide simple qui permet à la fois la production de CO et la réduction du technétium. La réaction est réalisée à pH 10 afin de stabiliser le réactif $NaBH_4$.

A l'état I, en milieu aqueux, trois sites de coordination sont occupés par le monoxyde de carbone et les sites restants sont occupés par des molécules d'eau labiles. Le tricarbonyle précurseur est stable dans l'eau à pH basique mais il échange rapidement ses molécules d'eau avec une grande variété de ligands donneurs (ligands plus forts que l'eau et surtout plus mous) incluant les aromatiques, les amines aliphatiques, les aminocarboxylates, les phosphines, les thiols et thioéthers et les isonitriles. La coordination peut être totale (les trois molécules d'eau sont échangées), et le complexe sera d'autant plus stable que le ligand est tridentate (Alberto R. 1998) (Figure 15). Après coordination avec deux sites donneurs « durs », la troisième position du carbonyle est faiblement réactive ; de ce fait,

même en présence d'un ligand bidentate, seuls des complexes métal / ligand (1:1) sont constitués, et deux formes de complexe peuvent être retrouvées $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)\text{L}]^+$ ou $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{Cl})\text{L}]^+$ (Schibli R. 1999).

Le marquage technétié s'effectue en 2 étapes. La première étape consiste en l'ajout de l'éluat de technétium 99m au kit de marquage contenant le sodium boranocarbonate $\text{Na}_2(\text{K}_2)\text{BH}_3\text{CO}_2$, puis la préparation est chauffée pendant 20 minutes à 100 °C. L'étape de chauffage est indispensable pour augmenter la pression dans le flacon et produire le monoxyde de carbone et pour réduire le technétium 99m. On forme le semi-aquaion $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ stable, «le cœur technétié». Dans une deuxième étape, on ajoute le ligand et ce dernier déplace les molécules d'eau. Les conditions de réaction, : temps, température, et pH doivent être déterminées pour chaque molécule.

Les amines aliphatiques isolées, les carboxylates, et plus largement les anions se coordinent faiblement au cœur carbonyle $\text{fac}[\text{M}(\text{CO})_3]^+$. Thioéthers et thiolates se complexent lentement mais le complexe est très stable. Les N-hétérocycles se fixent facilement au ^{99m}Tc -aquaion. Les amines aromatiques combinent une complexation rapide avec une stabilité thermodynamique et cinétique (Alberto R., 1999). Ces fonctions thioéthers, thiolates et N-hétérocycles correspondent aux chaînes latérales de la méthionine, de la cystéine et de l'histidine et sont donc particulièrement intéressantes pour le marquage des peptides. De nombreux acides aminés peuvent être la cible du complexe, la réaction manque donc de spécificité. Cependant, comme toute réaction de complexation, elle dépend des conditions de stabilité thermodynamique et cinétique (Figure 14).

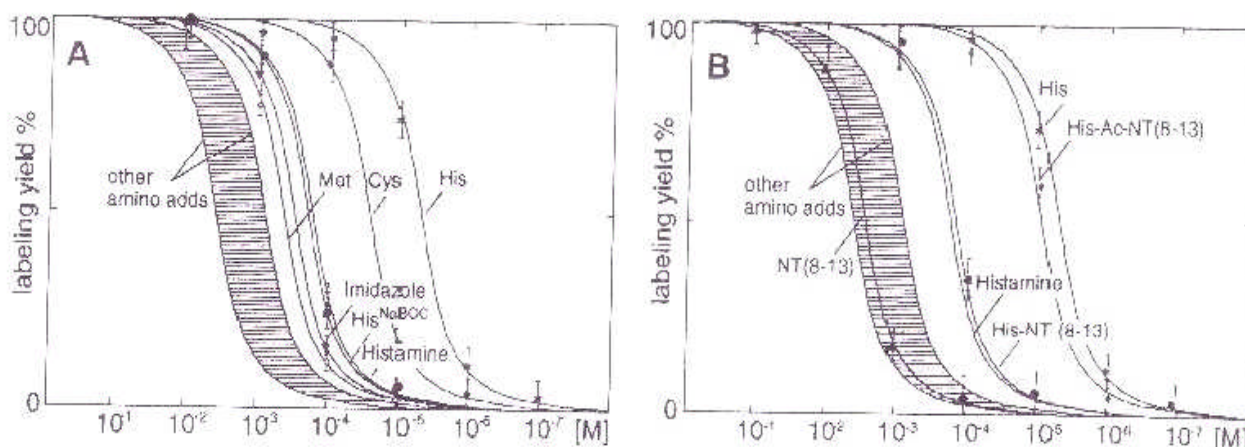


Figure 14 : Rendement de marquage de fonction peptidique dans un milieu tampon phosphate sodique, pH7,4, après 1 heure d'incubation à 37°C. Rendement déterminé par CLHP. (A) acide aminé et fragment histidine. Met = méthionine ; Cys = cystéine. (B) : analogues de la Neurotensine comparés avec leur groupe de coordination. Ac = acétyle. D'après Egli A. 1999.

- Formation d'un complexe avec l'imidazole

La structure imidazole (im) est présente dans la chaîne latérale de l'histidine, acide aminé fréquemment rencontré dans les protéines. Ce petit ligand présente une amine aromatique sp² permettant la liaison de coordination avec le métal.

A 70 °C en tampon phosphate, on observe la présence de complexes [M(im)(OH₂)₂(CO)₃] et [M(im)₂(OH₂)(CO)₃].

- Formation d'un complexe avec l'histamine

L'histamine peut être assimilée au résidu histidine en bout de chaîne peptidique ou protéique et pour laquelle la fonction carboxylique est utilisée dans la liaison peptidique. La coordination avec [M(CO)₃]³⁺ est réalisée avec la fonction amine primaire et l'imidazole. La réaction conduit à la formation d'un complexe thermodynamiquement et cinétiquement plus stable qu'avec l'imidazole : elle est plus rapide, quantitative en 30 minutes et stable. Il se forme un complexe bidentate se présentant sous forme d'un cercle flexible à 6 côtés avec deux fonctions amines.

- Formation d'un complexe avec l'histidine

L'étude des acides aminés a montré que l'histidine se fixe à une concentration inférieure à 1 μmole/l et avec une activité spécifique de 6 TBq/μmole ; les autres acides aminés doivent être mille fois plus concentrés pour donner le même taux de complexe. Seule la cystéine présente une affinité élevée avec seulement une concentration 10 fois plus importante que l'histidine, cependant elle s'oxyde facilement en cystine, forme la plus commune dans les protéines. Cette dernière a une affinité faible, comparable à celle des autres acides aminés. L'histidine est donc le meilleur site de marquage indépendamment de sa position mais la position N terminale est la plus favorable, elle permet d'obtenir un marquage avec un haut rendement, une faible concentration en peptide et stable du fait de la denticité (Egli D 1999).

- Formation de complexe avec une histidine terminale dans les biomolécules

Dans une chaîne peptidique, l'histidine doit être préférentiellement en bout de chaîne, soit C soit N terminale afin d'être facilement accessible et de pouvoir constituer un ligand tridentate qui peut donner ces trois coordinats au complexe sans modification majeure de la géométrie du complexe (Figure 15). De nombreuses études ont montré que le

marquage sur l'histidine est stable, le technétium restant fixé plus de 24 heures sans décomposition. Les trois ligands CO stabilisent la faible valence et l'addition de ligand tridentate protège contre l'attaque des peptides du sérum ou de la transdémétallation (Alberto R.1999).

Pour les biopeptides ne contenant pas d'histidine, on observe en CLHP de multiples espèces indiquant une fixation non spécifique de $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ alors que les analogues peptidiques modifiés en N terminal par fixation d'une histidine montrent une seule espèce.

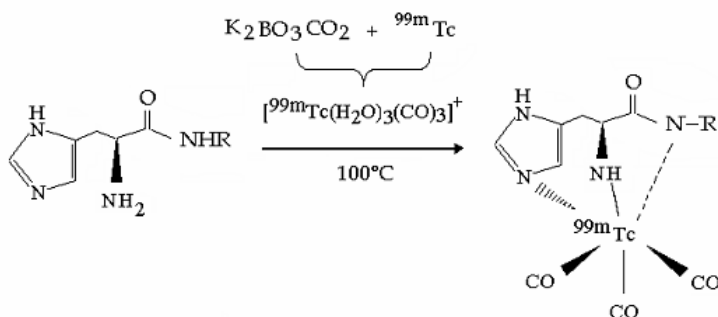


Figure 15 : Schéma de la réaction de marquage au technétium ^{99m}Tc d'un résidu histidine, situé en bout de chaîne peptidique, par l'intermédiaire du kit de marquage Isolink[®] (Mallinckrodt).

Le complexe technétié est petit et hydrophile, il modifie peu les propriétés physico-chimiques et biologiques de la molécule bioactive. Il permet la chélation de nombreuses structures totalement différentes avec un même kit : imidazole, purines, histamine, histidine, cyclopentadiène. De nombreuses molécules ont été étudiées : fragments d'anticorps, traceurs du système nerveux central, ligand des récepteurs tumoraux, hormones.

Sa stabilité est liée à l'inertie du centre métal à l'état d'oxydation I et à une configuration électronique d^6 avec une conformation octaédrique, en général thermodynamiquement inerte, même si cette caractéristique dépend au cas par cas des ligands. Le complexe ne requiert pas de coligand pour stabiliser l'état d'oxydation I.

Sa grande stabilité et sa petite taille par rapport aux autres complexes comme N_2S_2 en font un bon candidat pour le marquage de petites biomolécules comme les stéroïdes et les peptides ligands des transporteurs dopaminergiques, sérotoninergiques, ou des récepteurs à la somatostatine. Les chélatants comme l'histidine permettent un marquage avec une haute activité spécifique ce qui permet le marquage de molécules qui possèdent une activité pharmacologique ou toxique à faible dose (Bullok KE 2002). Un autre de ses avantages

majeurs est qu'il est capable de complexer le rhénium permettant ainsi de synthétiser un vecteur à usage thérapeutique.

Il existe cependant quelques facteurs limitants :

- Le nombre de substitutions : les sites de fixation sont multiples donc il n'existe pas de régiosélectivité surtout pour les grosses protéines.
- La cinétique de formation est lente, et il est souvent nécessaire de travailler autour de 100°C lors de la deuxième étape de synthèse. Cette réaction n'est donc pas utilisable pour les molécules sensibles à la chaleur.

III-4-2-4) Conclusion

De nombreuses stratégies ont été développées pour marquer les peptides avec du technétium 99m : MAG3, DTPA, carbonyle, HYNIC. Les synthons bifonctionnels (ou BFAC) sont idéaux en recherche pour le marquage de petites molécules. Cette méthode nécessite une chimie bien définie car l'agent chélatant doit lier fortement le métal et former une liaison covalente avec le peptide, elle nécessite plusieurs étapes de synthèse chimique. Par contre la liaison de l'isotope est souvent spécifique et contrôlée.

La méthode de marquage peut avoir un effet important sur la biodistribution de la molécule, surtout pour les petits peptides. L'encombrement stérique peut modifier de façon plus ou moins importante la structure originelle de la biomolécule et chaque chélate possède des propriétés propres ; ces deux facteurs peuvent modifier les propriétés physico-chimiques et biologiques des molécules marquées. Ainsi Rusckowski (Rusckowski M. 2001) a montré qu'un même peptide, le HNE 6,7 KD conjugué avec le MAG3, le MAS3, le DTPA ou l' HYNIC a une biodistribution différente. La clairance sanguine est similaire entre les trois complexes, par contre les fixations rénale et hépatique peuvent varier de 50 % ; le peptide HNE-MAG3-^{99m}Tc se concentre de façon plus importante dans le foie que les autres complexes alors que HNE-HYNIC-^{99m}Tc et HNE-MAS3-^{99m}Tc sont éliminés préférentiellement par les reins. De même, le choix de la séquence peptidique « spacer » entre la molécule biologique et le synthon est important car la séquence peut être la cible d'enzymes notamment hépatiques *in vivo* (Anderson C.J. 2001). Il est donc nécessaire de choisir le synthon en fonction de la molécule à marquer (structure, taille, hydrophilie, site actif) et d'effectuer des études *in vivo* sur différentes espèces animales pour chaque chélate utilisé. Les propriétés du synthon doivent être prises en compte lors de l'analyse des

résultats. Cependant, des modifications sur le synthon peuvent aussi être volontaires afin de modifier la pharmacocinétique de l'ensemble synthon plus vecteur (Zhang Y-M. 2003). Ainsi, un synthon avec une chaîne carbonée peut être synthétisé afin d'augmenter la lipophilie de la molécule ;, on peut ajouter une chaîne polylysine ou polyglycine pour augmenter l'hydrophilie ou une chaîne polyéthylène glycol afin de diminuer l'extraction des hépatocytes.

Les radiopharmaceutiques technétiés sont utilisés en routine en médecine nucléaire. Ce sont souvent de petites molécules organiques ou inorganiques. Mais ce peuvent aussi être des macromolécules comme des anticorps monoclonaux. Le succès du pentétréotide (^{111}In - pentétréotide, Octreoscan[®], MallinckrodtTM) dans le diagnostic des tumeurs surexprimant des récepteurs à la somatostatine a intensifié la recherche dans les radiopharmaceutiques et les petites molécules spécifiques de cible : les ligands de récepteurs. Depuis quelques années, de nombreux peptides marqués au technétium 99m ont été développés pour l'imagerie du thrombus, de l'inflammation et de l'infection. Le marquage des petits peptides reste attractif à cause de leurs propriétés biologiques et physiques : absence d'effet antigène, site unique de reconnaissance aux récepteurs, clairance sanguine rapide. L'un des challenges est de trouver un ligand bifonctionnel qui ne modifie pas les propriétés des molécules marquées, permet un marquage à haute activité spécifique avec un marquage stable et régiosélectif. C'est pourquoi les études doivent tendre vers des complexes de petite taille, stables, et avec des propriétés physico-chimiques (hydrophilie et lipophilie) correspondant à celles de la biomolécule.

LES CIBLES

Comme nous l'avons précisé précédemment, le développement de la médecine nucléaire passe par l'étude de nouveaux chélates et de nouveaux marqueurs mais surtout par le développement de nouveaux ligands ou vecteurs spécifiques de cibles, notamment moléculaires.

L'équipe INSERM 340 « Radiopharmaceutiques Biocliniques » développe parmi ses thématiques deux axes de recherche : l'imagerie de la plaque d'athérome et l'imagerie de l'angiogenèse tumorale. Elle recherche des vecteurs susceptibles de visualiser par des méthodes non invasives des cibles biologiques qui sont surexprimées lors de processus pathologiques. En collaboration avec l'équipe du Professeur Dumy du LEDSS 5, des peptides ont été synthétisés comme ligands potentiels dans les deux pathologies sus-citées : la maladie athéromateuse et l'angiogenèse tumorale. Le radioligand ciblant la plaque d'athérome vulnérable est un petit peptide dérivé de la molécule biologique HLA B2702, sa cible est une glycoprotéine VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), molécule d'adhésion. Le traceur de la néoangiogenèse tumorale est un peptide cyclique possédant une séquence d'acides aminés RGD et qui cible l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ présente à la surface des cellules endothéliales activées. L'objectif du programme de recherche réalisé par l'ensemble des équipes du laboratoire INSERM E0340 est dans un premier temps d'optimiser le marquage des peptides à l'iode puis au technétium 99m, d'étudier les propriétés physico-chimiques de ces traceurs, et d'analyser la stabilité du marquage par des études *in vitro* et *in vivo*. Ces expériences sont poursuivies par des études précliniques sur différentes espèces animales afin d'étudier la biodistribution et d'analyser la spécificité et l'affinité du ligand pour sa cible. Ces études sont complétées par des études *in vitro* sur cultures cellulaires.

I) LA PLAQUE D'ATHEROME « VULNERABLE »

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité en France, avec 180 000 décès par an, soit 32% du nombre total des décès. A elles seules, les cardiopathies ischémiques, et notamment l'infarctus du myocarde, sont responsables de plus du quart de ces 180 000 décès. Les maladies cardiovasculaires représentent donc un véritable problème de santé publique.

Jusqu'à présent, on considérait que les différents événements cliniques de l'ischémie résultaient d'un déséquilibre entre l'apport et la demande en oxygène du myocarde, lié à la présence d'une sténose coronaire supérieure à 50 %. Depuis une décennie, de nombreuses études ont amélioré la connaissance de la physiopathologie de l'athérosclérose (Ross R.1999) : elle est considérée aujourd'hui comme une pathologie inflammatoire chronique, différenciée en plusieurs stades en fonction de la composition de la plaque (Stary H. 1995). L'utilisation d'animaux transgéniques a permis de découvrir de nouvelles cibles et d'étudier les facteurs de risque (Glass C.K. 2001). La plaque d'athérome vulnérable est caractérisée par d'importants phénomènes inflammatoires, une large plaque lipidique et une fine capsule fibreuse. Cette plaque, sujette à rupture, est rendue responsable des principaux événements coronariens.

Actuellement, aucune méthode d'imagerie non invasive ne permet de mettre en évidence ces plaques d'athérome coronaires vulnérables. La Médecine Nucléaire peut apporter ses méthodes. De nombreux traceurs ont été étudiés (LDL-^{99m}Tc, LDL-¹²³I, anticorps anti-récepteur Fc des macrophages ...) mais aucun n'est suffisamment spécifique des plaques vulnérables. L'objectif de ce projet est de mettre au point un radiopharmaceutique permettant de détecter la présence et le nombre de plaques vulnérables pour prédire la probabilité d'événements coronariens chez un patient donné et pouvoir ainsi adapter la thérapeutique aux risques du patient. La cible choisie, VCAM-1, est impliquée dans les phénomènes inflammatoires au sein de la plaque d'athérome vulnérable. Elle est exprimée précocement par les cellules endothéliales vasculaires.

I-1) L'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie **chronique inflammatoire**, mettant en jeu le recrutement et l'accumulation de monocytes, de macrophages et de cellules dendritiques dans les parois vasculaires où ils se chargent de lipoprotéines modifiées et agrégées.

Elle implique des interactions complexes entre les composés sanguins et les cellules des vaisseaux sanguins se traduisant par une perturbation cellulaire et métabolique de la paroi artérielle avec prolifération cellulaire et accumulation de lipoprotéines LDL dans l'intima (tunique externe de la paroi artérielle) (Berliner J.A 1995). L'athérosclérose se développe tôt dans la vie d'un individu, elle touche d'abord les artères élastiques (aorte carotide et iliaque) et des larges artères musculaires coronaires et poplitées puis se traduit

éventuellement dans les décennies suivantes par une occlusion thrombotique ou thromboembolique.

Différents facteurs à l'origine de la formation de la plaque ont été identifiés :

- Un dysfonctionnement endothélial au niveau des bifurcations vasculaires. On y observe : une augmentation conjointe de l'apoptose et de la prolifération des cellules endothéliales, la sécrétion des facteurs vasoconstricteurs, et l'expression de molécules d'adhésion (Malek A. 1999).

- L'élévation du taux de cholestérol. Ce dernier est transporté dans le plasma par les lipoprotéines de faible densité (LDL) qui se retrouvent en excès. Sous forme oxydée, ces LDL, qui ne sont plus reconnues par leur récepteur du fait d'une modification de l'Apo B, s'accumulent. Elles sont responsables de l'initiation de phénomènes inflammatoires (Chia C.M. 1998, Ross R. 1999).

Au stade précoce de l'athérosclérose, les LDL_{ox} s'accumulent dans la paroi vasculaire au niveau des sites de dysfonctionnement endothélial et ce en raison d'une augmentation de la perméabilité de la paroi. D'autres facteurs peuvent augmenter cette perméabilité comme l'hypertension artérielle et le tabac (Nielsen L.B. 1996, Chia C.M. 1998).

A un stade plus tardif, les monocytes et les cellules musculaires lisses qui se sont accumulés dans la paroi secrètent des métalloprotéinases qui dégradent la matrice et augmentent la perméabilité de l'endothélium aux LDL.

Les LDL oxydées sont reconnues par les récepteurs scavengers des macrophages et des cellules musculaires lisses et captées par ces cellules.

- Le recrutement des monocytes dans la paroi artérielle. Les monocytes présents dans la paroi artérielle se différencient en macrophages et sont responsables, en condition normale, de l'élimination des LDL_{ox} et des cellules en apoptose. Mais l'excès de LDL conduit à l'accumulation de macrophages chargés en LDL_{ox} et à la formation de la plaque. Ces événements sont régulés par l'expression de facteurs de croissance, SCGF, PDGF, cytokines, et de molécules d'adhésion exprimées à la surface de l'endothélium : VCAM-1, sélectine, intégrines et immunoglobulines qui activent au niveau de la lésion le recrutement, l'attachement puis la migration dans l'intima des monocytes ainsi que la colonisation de la paroi par les cellules musculaires lisses altérées (O'Brien K.D 1993, Chia C.M. 1998, Huo Y. 2001). Les macrophages riches en lipides sont sensibles aux facteurs de croissance et aux cytokines. Ils vont, à leur tour, sécréter des facteurs de prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (Iiyama K 1999).

Les sélectines sont responsables du phénomène de roulement ("rolling") des monocytes à la surface de l'endothélium, par établissement et rupture des liaisons établies entre les sélectines et leurs récepteurs à la surface des monocytes. Ce phénomène de "rolling" ralentit les monocytes qui vont alors pouvoir se fixer sur les molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales vasculaires par l'intermédiaire de leur intégrine de surface. Parmi les molécules d'adhésion, on peut citer les molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM-1,2, et 3), la molécule d'adhésion endothéliale et plaquettaire 1 (PECAM-1), et la molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM-1). Les macrophages, après migration à travers l'endothélium, et les cellules musculaires lisses présentent dans l'intima prolifèrent. Les macrophages se transforment en cellules spumeuses par accumulation de lipides et de cholestérol (Chia C.M.1998, Cybulsky M.L. 1991). Ces dernières peuvent libérer des lipides et des substances toxiques et sont à l'origine de la plaque d'athérome (Ross R.1999). La progression dans le temps de la lésion se traduit, soit par la formation d'un "core" nécrotique riche en lipides et en cellules qui s'étend vers la lumière et diminue le diamètre du vaisseau, soit par la rupture de cette plaque vulnérable, rupture qui conduit à la formation d'un thrombus plaquettaire. Cette rupture est induite par des facteurs mécaniques qui affaiblissent la structure, par la réaction inflammatoire qui entraîne l'apoptose des cellules, et par la sécrétion matricielle de métalloprotéinases (MMP). L'apoptose des macrophages contribue à la croissance de la plaque lipidique, l'apoptose des cellules musculaires lisses diminue la formation de la plaque fibreuse stabilisante, celle des cellules endothéliales augmente le risque de fissure. Les métalloprotéinases sécrétées par les macrophages et les cellules spumeuses déstabilisent la plaque en dégradant la matrice ou la capsule fibreuse, et en facilitant l'infiltration des cellules inflammatoires. Lors de la rupture, des substances pro-thrombotiques dont le facteur tissulaire sont libérées dans le sang, ce qui provoque la formation d'un thrombus avec accumulation de plaquettes et de fibrine (Figure 16). Ce dernier est responsable d'une phase aiguë clinique par occlusion mais surtout par embolie (Berliner J.A.1995, Madjid M. 2004).

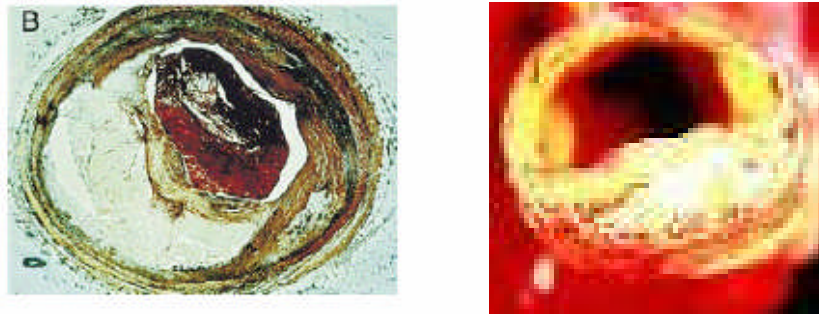


Figure 16 : Rupture de la plaque et formation du thrombus dans une artère coronaire (Glass 2001).

La plaque d'athérome vulnérable a trois composants principaux : les cellules telles que les cellules musculaires lisses, les macrophages et les lymphocytes ; le tissu de connexion à la matrice extracellulaire constitué notamment de collagène, protéoglycane et fibronectine, et les dépôts de lipides intra et extracellulaires. La lésion basique consiste en une plaque située dans l'intima et constituée d'un cœur riche en cholestérol, phospholipides, collagène et produits de dégradation cellulaire et d'une capsule fibreuse couvrante constituée de cellules musculaires lisses, macrophages et collagène. **Les plaques contenant un cœur mou et large ainsi qu'une fine capsule fibreuse sont vulnérables à la rupture et à la formation d'un thrombus au contact du sang. Les plaques dures qui contiennent des fibres musculaires lisses, du collagène et moins de lipides sont moins susceptibles de rupture** (Berliner J.A.1995, Vallabhajosula S.1997) (Figure 17).

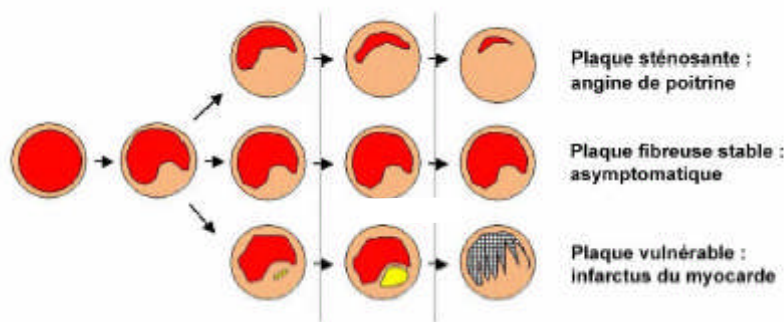


Figure 17 : Evolution de la plaque d'athérome.

Le terme de plaque d'athérome « vulnérable » désigne l'ensemble des plaques susceptibles d'entraîner la formation d'un thrombus ou d'évoluer très rapidement (Naghavi M. 2003). Les principaux critères utilisés pour les distinguer sont : l'inflammation, une fine capsule fibreuse (<100 µm) et un large cœur lipidique et nécrotique (>40% du volume de la plaque), des zones de dénudation endothéliale avec de l'agrégation plaquettaire

superficielle, une fissure de la capsule fibreuse, ou une sténose sévère. Des études cliniques ont montré que dans 2 infarctus du myocarde sur 3, on ne retrouve pas de sténose coronaire supérieure à 50 % sur la coronaire responsable de l'infarctus (De Franco A.C. 2001).

■ Représentation schématique du développement de la plaque d'athérome

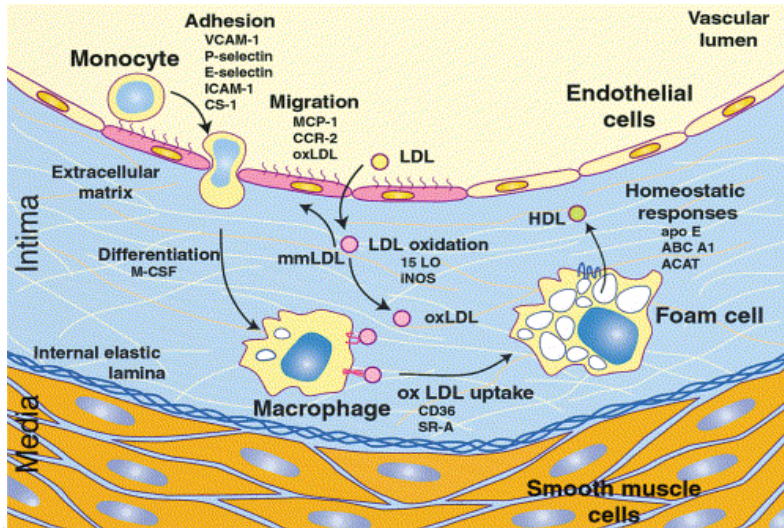


Figure 18 : Initiation de l'athérosclérose (Glass C.K. 2001). (VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1, ICAM-1 : Intercellular Cell Adhesion Molecule 1, M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor, MCP-1 : Macrophage Chemoattractant Protein 1, 15LO : 15 Lipoxygénase, SR-A : Scavenger Receptor A, ApoE : Apolipoprotéine E, ACAT : Acyl CoA Cholesterol Acetyl Transférase.

Les LDLox induisent le recrutement de monocytes aux sites de dysfonction endothéliale par l'intermédiaire des molécules d'adhésion. Les monocytes macrophages captent les LDL oxydés et se transforment en cellules sumeuses dans l'intima (Figure 18).

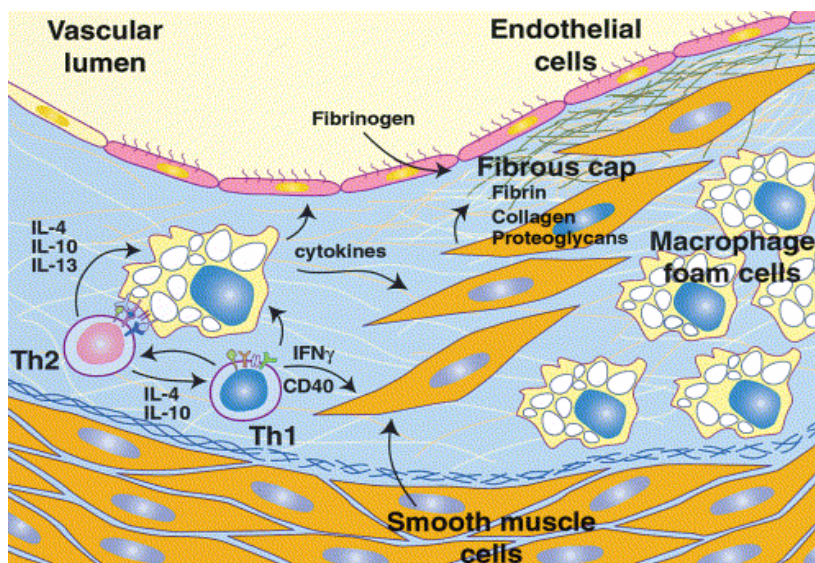


Figure 19 : Développement de la plaque d'athérosclérose (Glass C.K. 2001). (IL : interleukine, IFN γ : interféron γ)

L'interaction entre les macrophages et les lymphocytes Th1 et Th2 engendre la production d'un grand nombre de cytokines pro- et anti-inflammatoires (interleukines, interféron γ) qui vont moduler l'inflammation et agir sur de nombreuses cellules au sein de la paroi artérielle. Ces molécules vont notamment stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses et leur migration depuis la média vers l'intima. Ces cellules musculaires lisses intimes dégradent la matrice extracellulaire afin de pouvoir proliférer et captent les LDLox, participant ainsi à la formation des cellules spumeuses. Elles jouent également un rôle stabilisateur de la plaque par la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire - fibrinogène, collagène et protéoglycanes - qui recouvrent la plaque d'athérome d'une capsule fibreuse (Ross R. 1999, Glass C.K. 2001) (Figure 19).

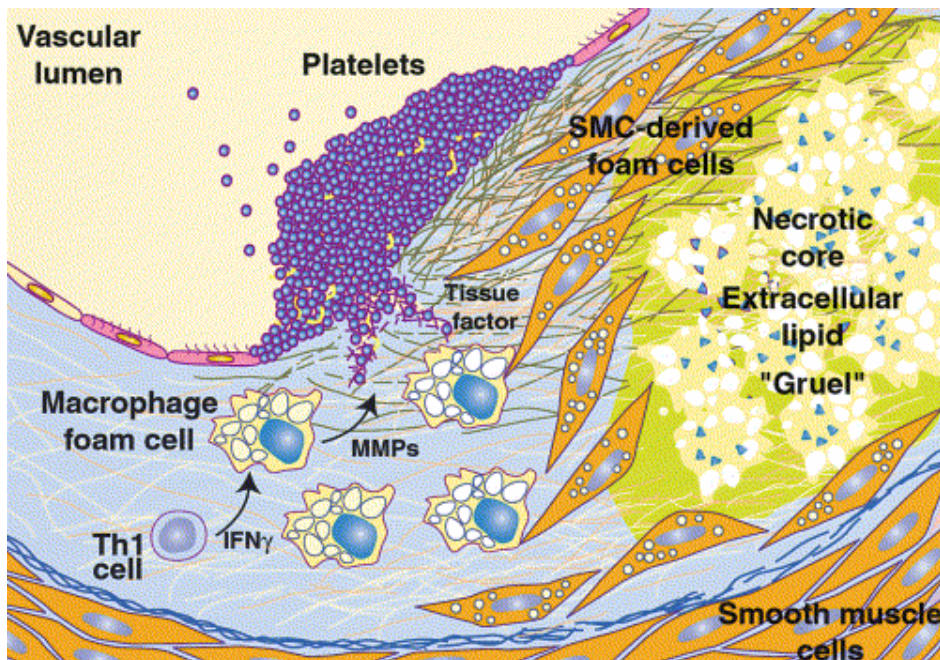


Figure 20 : Déstabilisation et rupture de la plaque d'athérome (Glass 2001).

Les cellules spumeuses issues des macrophages et des cellules musculaires lisses entrent en apoptose et forment une plaque lipidique et nécrotique instable. Les métalloprotéases (MMPs) produites par les macrophages dégradent la matrice extracellulaire. Les pressions exercées sur la plaque conduisent à sa rupture. Lors de la rupture de la plaque, les facteurs pro-thrombotiques comme le facteur tissulaire (TF) induisent la formation du thrombus plaquettaire (IFN γ : interféron γ) (Figure 20).

I-2) VCAM-1 et athérosclérose

Les mécanismes d'adhésion cellulaire sont impliqués dans une grande variété de phénomènes biologiques tels que l'embryogenèse, l'inflammation, la cicatrisation, la thrombose et le cancer. Deux types d'adhésion peuvent être différenciés :

- L'adhésion intercellulaire. Celle-ci est réalisée soit par l'intermédiaire de jonctions morphologiquement différenciées soit par l'intermédiaire de «molécules d'adhésion». Ces dernières sont, soit dépendantes du calcium : les cadherines, protéines adhésives latérales, qui maintiennent la continuité de l'endothélium et protègent les cellules de l'adhésion plaquettaire et les sélectines qui interviennent dans le recrutement des leucocytes lors de la réponse inflammatoire, soit indépendantes du calcium : les CAM (cell adhesion molecule) dont ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire) et VCAM-1 (molécule d'adhésion des cellules vasculaires) (Cybulsky M.L.2001).
- L'adhésion extracellulaire des cellules à la matrice extracellulaire s'effectue par l'intermédiaire de molécules d'adhésion : les intégrines.

L'adhésion des leucocytes à l'endothélium et leur passage dans la paroi nécessitent une interaction entre les immunoglobulines exprimées à la surface des cellules endothéliales et les intégrines exprimées à la surface des leucocytes.

VCAM-1 est une glycoprotéine de surface appartenant avec ICAM à la superfamille des immunoglobulines cytokines inductibles et fixant l'intégrine. Cette famille est caractérisée par une série de motifs extracellulaires communs avec les Ig G. Les ligands des CAM, les intégrines, sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité β liée par une liaison non covalente à une sous-unité α . Les intégrines formées de la sous-unité $\beta 1$ sont aussi appelées antigènes très tardifs (VLA, Very Late Antigen).

VCAM-1 est une glycoprotéine de 110 KD, inductible, et exprimée à la surface de l'endothélium (Rice G.E. 1989, Osborn L 1989). Elle est constituée de 6 ou 7 domaines transmembranaires dans lesquels les domaines 1 et 3 sont homologues respectivement dans leur structure et leur fonction aux domaines 4 et 6 (Figure 21). La fixation de VCAM-1 à l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ ou VLA-4, son ligand principal, implique le domaine 1 et le domaine 4 (Cybulsky M.L.1991, Jones E.Y. 1995).

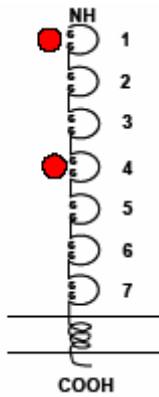


Figure 21 : Structure de VCAM-1. VCAM-1 possède deux sites de liaison pour VLA-4 au niveau des domaines extracellulaires 1 et 4 (cercles). D'après Cybulsky 2001.

Exprimée par les cellules endothéliales activées, VCAM-1 est responsable de l'adhésion intercellulaire avec les lymphocytes B et T, monocytes, polynucléaires éosinophiles et basophiles par l'intermédiaire des intégrines $\alpha_4\beta_1$ (ou VLA-4) et $\alpha_4\beta_7$ exprimées par ces cellules. Par contre, elle n'interagit pas avec les polynucléaires neutrophiles qui ne possèdent pas VLA-4 ce qui le différencie de ICAM-1 (Rice G.E. 1990, Cybulsky M.L.1991 et 2001). VCAM-1 joue un rôle essentiel dans l'adhésion des leucocytes et leur infiltration au niveau des sites inflammatoires. La surexpression de VCAM-1 au niveau des cellules endothéliales vasculaires activées augmente le recrutement des leucocytes exprimant VLA-4 au niveau du site de stimulation (Huo Y. 2001) (Figure 22).

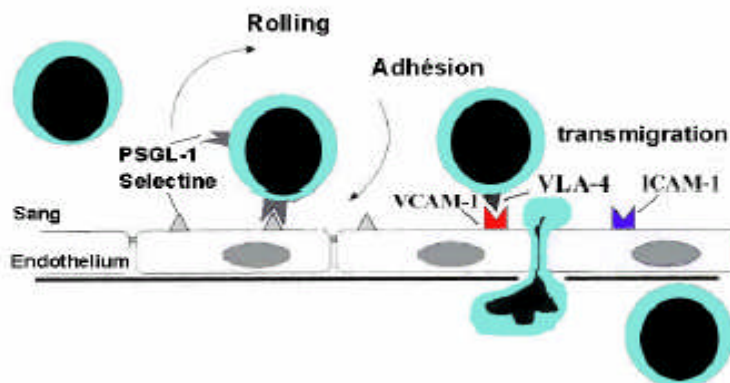


Figure 22 : Recrutement d'un leucocyte dans la paroi artérielle. La liaison des sélectines avec leur ligand entraîne un phénomène de « rolling », puis les liaisons immunoglobulines-intégrines permettent une adhésion ferme du monocyte à la surface de l'endothélium et la transmigration du monocyte. PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein 1, VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1, VLA-4 : Very Late Antigen 4, ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule.

Dans la plaque d'athérome, l'interaction cellules endothéliales - monocytes adhérents -lipides modifiés, va générer des facteurs de croissance et stimuler l'expression de cytokines comme TNF α (Tumor Necrosis Factor), IL1 (Interleukine 1) et IL6. Celles-ci stimulent les cellules endothéliales et entraînent l'expression d'intégrines et de VCAM-1.

VCAM-1 active alors le recrutement et l'adhésion « robuste » des monocytes et des lymphocytes, principalement des lymphocytes T, puis leur migration transendothéliale et l'infiltration dans l'intima (Ley K 2001, O'Brien K.D 1993) (Figure 22).

VCAM-1 est un marqueur de l'athérogénèse. En effet, il n'est pas ou peu exprimé en condition basale mais apparaît au stade précoce de la pathologie qui précède le recrutement des leucocytes. Au stade précoce de la pathologie, il est exprimé de manière prédominante par les cellules endothéliales et les cellules spumeuses à la périphérie de la lésion, et au stade tardif par les macrophages et les cellules musculaires lisses localisées dans l'intima dans la portion profonde de la plaque (Cybulsky M.L. 2001, Iiyama K.1999, O'Brien K.D. 1993).

Son expression est régulée par différents facteurs comme l'hypercholestérolémie, l'inflammation, et tout stress vasculaire, qui stimulent l'expression des gènes de la cellule endothéliale vasculaire par l'intermédiaire de chémokines et cytokines (IL1, IL4, TNF α et LPS). Il joue un rôle essentiel dans la formation de la plaque d'athérome mais aussi dans la pathogénicité de l'inflammation et des métastases car on le retrouve dans les aires de néovascularisation en association avec un infiltrat de cellules inflammatoires (Chia C.M.1998, O'Brien K.D 1993). Une déficience en VCAM-1 diminue significativement la formation de lésions cellulaires spumeuses et la taille de la plaque d'athérome (Cybulsky M.L. 2001).

VCAM-1 exprimé tôt dans l'athérogénèse peut être considéré comme une manifestation d'un dysfonctionnement de l'endothélium. C'est un marqueur précoce de l'athérogénèse ce qui explique l'intérêt de posséder un traceur spécifique et sensible de ce récepteur.

I-2-1) Le peptide B2702(84-75) marqueur de VCAM-1

B2702(84-75) est un petit peptide dérivé de la région constante de l'hélice α de HLA B2702, molécule du système majeur d'histocompatibilité de classe 1 (ou système HLA de classe 1 pour High Lymphocyte Affinity). HLA B2702, molécule de présentation des antigènes, est présente à la surface de presque toutes les cellules. Peptide immunomodulateur, il intervient dans le système de présentation de l'antigène et le rejet de greffe en bloquant la différenciation du précurseur des lymphocytes T cytotoxiques et en inhibant l'activité des lymphocytes T et des cellules NK cytotoxiques. Il inhibe la lyse

induite par la fixation des cellules cibles sur les cellules NK, sans affecter significativement la liaison de l'effecteur à la cible.

Différents récepteurs cellulaires ont actuellement été identifiés : l'ImmunoBinding Protéine (IBP), membre de la famille des *heat shock proteine* (HSP70) et VCAM-1 (Nossner E. 1996, Ling X.2000) ainsi que d'un récepteur enzymatique : l'hème oxygénase 1 (HO-1) (Lyer S.1998). La fixation de B2702 au récepteur VCAM-1 s'effectue par l'intermédiaire des 10 acides aminés de l'extrémité C terminale 75-84, qui interagissent avec les domaines 1 et 4 de la glycoprotéine VCAM-1. La forme inversée B2702(84-75) possède aussi un effet immunomodulateur, elle ne reconnaît pas HSP70 mais reconnaît HO-1 et VCAM-1 (Ling X.2000).

Cependant, différentes études ont montré que son activité immunomodulatrice n'est pas liée à sa fixation aux HSP70 ni à une interaction directe avec les cellules cytotoxiques. Plusieurs mécanismes ont été décrits :

- L'activation de l'hème oxygénase 1 (HO-1, HSP32). HO-1 catalyse la dégradation de l'hème en biliverdine, inhibiteur du complément, puis en bilirubine qui possède un pouvoir antioxydant et inhibe la production d'IL2 et d'anticorps cytotoxiques (Lyer S.1998, Nossner E. 1996).

- L'activation de la polymérisation suivie d'une inhibition de la dépolymérisation de la tubuline, protéine majeure des microtubules impliquées dans les mouvements cellulaires, les phénomènes de phagocytose et l'apoptose (Tarazona R. 2000).

- La fixation de B2702(74-85) à VCAM-1 inhibe par compétition la fixation de VLA-4 leucocytaire et l'activation leucocytaire. *In vitro* et *in vivo*, B2702 inhibe la fonction lymphocytaire suggérant que cette fixation est fonctionnelle. Le rôle établi de VCAM-1 dans le rejet de greffe et la capacité des anticorps anti-VCAM-1 à inhiber ce dernier peut suggérer un rôle thérapeutique de ce peptide en interrompant la liaison VCAM-1 / VLA-4 (Ling X. 2000, Woo J. 1994,).

I-3) La médecine nucléaire et l'athérome

De très nombreuses molécules radiomarquées ont été proposées comme traceurs potentiels de la plaque d'athérome vulnérable. Elles ont pour cibles différentes molécules ou mécanismes impliqués dans la formation de la plaque d'athérome vulnérable (Narula J. 2005).

I-3-1) Imagerie des composants de la plaque

I-3-1-1) Les lipides

L'accumulation massive subendothéliale des lipides joue un rôle majeur dans la formation de la plaque d'athérome. Elle entraîne l'expression de marqueurs inflammatoires, la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi que la formation et l'apoptose des cellules spumeuses et la rupture de plaque (Ross R.1995, Tsimikas S.1999). La plaque d'athérome vulnérable est caractérisée par la présence d'une plage lipidique et nécrotique importante occupant plus de 40% de son volume.

Différents marqueurs lipidiques ont été étudiés : les LDL natives, les LDL oxydés reconnus par les récepteurs scavengers des monocytes macrophages, et les anticorps anti-LDL. D'autres composants comme les esters de cholestérol ou l'apoprotéine B ont été marqués. Aucun n'est utilisé en clinique.actuellement

- Les LDL natives

Des études réalisées *in vivo* chez l'homme ont permis de mettre en évidence une accumulation des LDL natifs et oxydés marqués à l'iode 125, à l'indium 111 et au technétium 99m dans les plaques d'athérome au niveau des artères carotidiennes, iliaques et fémorales. Cette accumulation est corrélée aux plaques d'athérome contenant un grand nombre de cellules spumeuses et de macrophages. En revanche, les plaques d'athérome fibreuses ne sont pas visibles en imagerie (Narula J. 2005).

- Les Anticorps anti-LDL

Des anticorps spécifiques d'épitopes des LDL oxydés ont été évalués comme radiotraceurs de la plaque d'athérome vulnérable. MDA-2 est un anticorps murin monoclonal dirigé contre les épitopes malondialdéhyde-lysine des LDL oxydés. MDA-2 ne lie ni les LDL natifs, ni les HDL, ni les VLDL. *In vivo*, MDA-2 marqué à l'iode-125 ou au technétium-99m s'accumule dans les plaques d'athérome en progression chez les lapins et les souris hypercholestérolémiques (Tsimikas S. 1999 et 2002). Cette fixation est d'autant plus importante que la plaque est riche en cellules spumeuses et en lipides. Cependant, comme pour tous les anticorps, la cinétique d'élimination est lente (plusieurs heures) et la

fixation non spécifique doit être limitée par l'injection d'antigène froid à haute dose (10mg) (Figure 23).

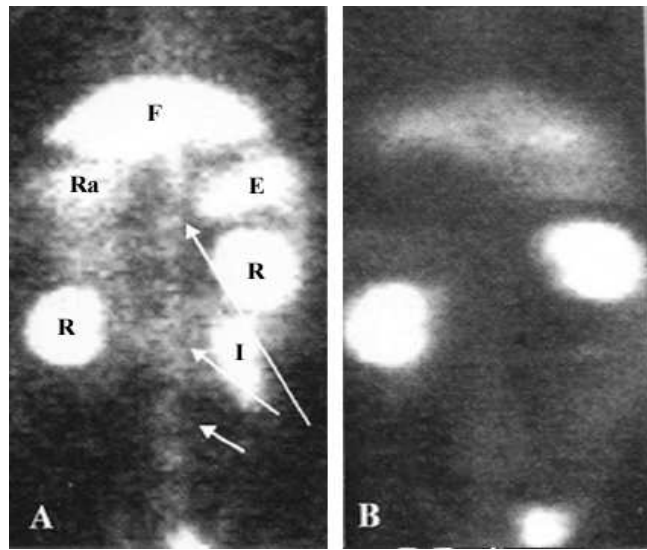


Figure 23 : Images dorsales obtenues *in vivo* chez le lapin avec MDA2, 16 heures après l'injection de MDA2-^{99m}Tc. L'aorte abdominale est bien visible chez les lapins hyperlipidémiques (flèches en A) comparativement aux lapins contrôles (B). F : Foie, Ra : Rate, E : Estomac, R : Rein, I : Intestin. (Tsimikas S. 2002).

I-3-1-2) Les macrophages

Les macrophages jouent un rôle prépondérant dans la formation et le développement de la plaque d'athérome vulnérable. Ces cellules sont notamment responsables de la formation des cellules spumeuses, du recrutement et de l'activation des lymphocytes T, de la formation d'un corps nécrotique et lipidique, ainsi que de la synthèse de métalloprotéinases et de la « C-Reactive Protein » (CRP). Les macrophages fragilisent la plaque d'athérome et la forte densité de ces cellules à la base des plaques correspond à la zone de rupture préférentielle des plaques d'athérome vulnérables.

- Le [¹⁸F]-Fluorodéoxyglucose

Le [¹⁸F]-Fluorodéoxyglucose (¹⁸FDG) est un analogue du glucose marqué au fluor 18, émetteur de positon, détectable en imagerie TEP (tomographie par émission de positon). Il s'accumule dans les cellules consommatrices de glucose. Or, les macrophages recrutés au sein de la plaque d'athérome présentent un métabolisme exacerbé qui nécessite une forte consommation de glucose. Ce radiotracer couramment utilisé en cancérologie a donc été évalué pour l'imagerie des plaques d'athérome riches en macrophages. Dans une

étude réalisée chez le lapin hyperlipidémique, le ^{18}F FDG s'accumule au niveau des lésions aortiques et permet leur visualisation en imagerie TEP (Ogawa M.. 2004). Chez l'homme, il permet la visualisation des plaques d'athérome carotidiennes infiltrées par les macrophages (Rudd J.H. 2002). Néanmoins, le ^{18}F FDG s'accumule physiologiquement dans les cellules cardiaques et le bruit de fond élevé est problématique pour la détection des plaques situées au niveau des artères coronaires. Une fibroscopie avec une sonde sensible au fluor 18 a été mise au point : chez le lapin, elle permet de détecter l'infiltration des macrophages (Lederman R.J. 2001).

- Les analogues des purines

Les purines s'accumulent au niveau des lésions d'athérosclérose par deux mécanismes : fixation aux plaquettes via le récepteur P2T et fixation aux cellules musculaires lisses, aux macrophages et aux monocytes qui possèdent les récepteurs P2x et P2y. L'utilisation de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ diadénosine tétraphosphate (et dérivés) permet de visualiser les plaques d'athérome chez le lapin déendothélialisé, cependant le récepteur est présent dans de nombreux tissus (Elmaleh D.R. 1998).

I-3-1-3) Les cellules musculaires lisses (CML)

Le fragment F(ab')_2 de IgM Z2D3 humanisé est dirigé contre un antigène surexprimé exclusivement par les cellules musculaires lisses présentes dans la plaque d'athérome. Il a été marqué à l'indium 111 et au technétium 99m et évalué comme radiotracteur de la plaque.

Les radiotraceurs ^{111}In -Z2D3 F(ab')_2 et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Z2D3 Fab' ont été évalués *in vivo* sur un modèle expérimental d'athérosclérose induite chez le lapin par une déendothélialisation de l'aorte abdominale associée à un régime hyperlipidémique. Les lésions sont visibles en imagerie 48 heures après injection du radiotracteur pour ^{111}In -Z2D3 F(ab')_2 (Figure 24) et après 12 heures pour $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Z2D3 Fab' (Narula J. 1997 et 2005). *In vivo* chez l'homme, l'accumulation de ^{111}In -Z2D3 F(ab')_2 dans les plaques carotidiennes est visible dès 4 heures malgré une cinétique sanguine très lente ($t_{1/2} = 920$ minutes) (Carrio I. 1998).

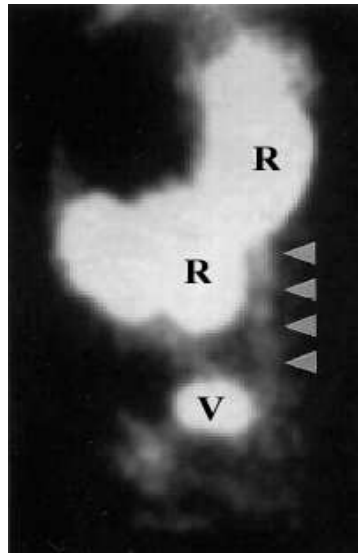


Figure 24 : Image latérale obtenue *in vivo* chez le lapin avec [^{111}In]-Z2D3-Fab'. 12 heures après l'injection, l'aorte abdominale est visible chez les lapins hyperlipidémiques. R : Rein, V : Vessie. (Narula 1997).

I-3-2) Les marqueurs de la rupture de plaque

I-3-2-1) MCP-1

Les monocytes sont attirés au niveau des plaques d'athérome par diverses substances chémoattractrices. Parmi celles-ci, le MCP-1, un peptide monomérique produit par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages, lie le récepteur CCR-2 exprimé par les monocytes et les macrophages. Le MCP-1 marqué à l'iode ou au technétium 99m a été évalué comme radiotracer des macrophages recrutés au sein des plaques d'athérome. Chez le lapin déendothérialisé, [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-MCP-1 se fixe spécifiquement sur les zones riches en lipides (autoradiographie). Cette fixation est proportionnelle au nombre de macrophages mais pas à celui des cellules musculaires lisses (Ohtsuki K. 2001, Narula J. 2005).

I-3-2-2) Les métalloprotéases

Les métalloprotéases (MMP) constituent une famille d'endopeptidases qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire et destabilisent la plaque. Elles peuvent être synthétisées par les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules musculaires lisses et les lymphocytes. Le CGS 27023A est un inhibiteur des MMP. Différents radiotraceurs ont été synthétisés à partir de cette molécule : le [^{123}I]-HO-CGS 27023A a été retenu par

l'équipe de Schäfers en raison de sa bonne affinité *in vitro* pour les MMP-2 et MMP-9. Il permet de visualiser les plaques sur des lésions abdominales *in vivo* chez la souris hyperlipidémique apoE^{-/-}. Cette fixation est corrélée au taux de MMP-9 de la plaque d'athérome (Scäfers M. 2004, Dobrucki LW. 2005).

I-3-2-3) L'apoptose

L'apoptose des macrophages joue un rôle important dans la rupture des plaques d'athérome et constitue donc une cible potentielle pour son diagnostic (Kolodgie F.D 2003). En effet, les plaques d'athérome vulnérables sont caractérisées par une large plage lipidique et nécrotique recouverte par une capsule fibreuse fine. Or, l'apoptose des cellules spumeuses contribue largement à la formation de la plage lipidique et nécrotique, et l'apoptose des cellules musculaires lisses entraîne l'amincissement de la capsule fibreuse. Dans les cellules apoptotiques, les phosphatidylsérines de la membrane plasmique se retrouvent exposées sur la face externe des membranes de ces cellules qui sont alors reconnues et phagocytées par les macrophages. L'Annexine V se lie fortement aux phosphatidylsérines, c'est pourquoi cette molécule radiomarquée au ^{99m}Tc ou à l'iode est utilisée comme radiotraceur de l'apoptose. Ce radiotraceur a permis de visualiser *in vivo* les plaques d'athérome induites par déendothélialisation au niveau de l'aorte abdominale chez le lapin (Kolodgie F.D. 2003). Les lésions sont visibles en imagerie 2 heures après l'injection de [^{99m}Tc]-Annexin V (Figure 25). La fixation est parallèle au taux de macrophages mais pas à celui de cellules musculaires lisses.

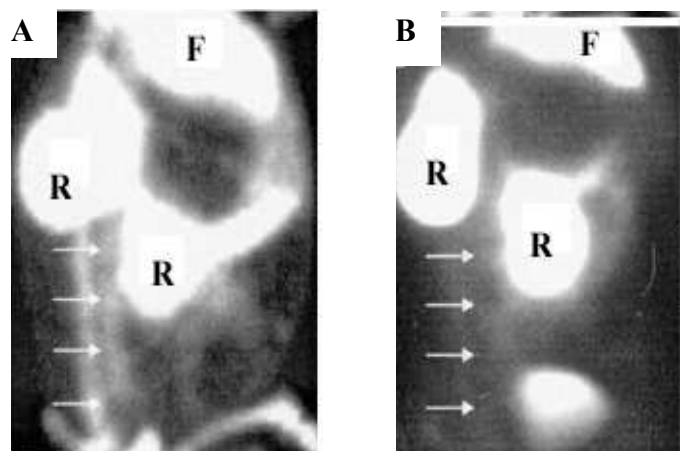


Figure 25 : Images scintigraphiques obtenues *in vivo* chez le lapin avec [^{99m}Tc]-Annexin V. Image à 2 heures chez le lapin déendothélialisé (A) et chez le lapin du groupe contrôle (B). F : foie, R : rein (Kolodgie F.D. 2003).

Chez l'homme, une étude préliminaire réalisée sur 4 patients a montré que l'apoptose dans les plaques d'athérome carotidiennes pouvait être visualisée six heures après l'injection de [^{99m}Tc]-Annexin V (Kietselaer B.L. 2004).

I-3-2-4) Les gènes

Au stade précoce de la plaque d'athérome, différentes chaînes de signal sont activées et des facteurs de transcription cellulaires sont exprimés, notamment les proto-oncogènes *c-myc* et *c-fos*. Ces facteurs de transcription régulent l'expression des gènes de prolifération cellulaire responsables notamment de la prolifération et de l'apoptose des cellules musculaires lisses et des cellules de l'endothélium. L'oligo ASONs marqué au technétium est un antisens qui se fixe sur la séquence complémentaire *c-myc mARN*. Injecté à des lapins hypercholestérolémiques, il s'accumule dans les artères thoraciques et abdominales au niveau de la plaque d'athérome (Qin G 2005).

I-3-2-5) La néoangiogenèse

La néoangiogenèse correspond à la formation de néovaisseaux. Elle est physiologique (cicatrisation) ou pathologique (cancer). Les intégrines et particulièrement $\alpha_v\beta_3$ sont apparues comme des cibles potentielles des marqueurs de la plaque. De nombreuses molécules ont été étudiées, l'indium111 quinolone RP748 et dérivés (Sadeghi M.M. 2004), et les cyclopeptides «RGD» et dérivés marqués à l'iode, à l'indium 111 ou au technétium 99m (Haubner J. 2005, Dobrucki L.W. 2005).

I-4) Conclusion

De très nombreuses modalités d'imagerie, invasives ou non invasives, sont actuellement à l'étude pour le diagnostic de la plaque d'athérome vulnérable. La résolution constitue la principale limitation de l'imagerie morphologique. Il est en effet indispensable de pouvoir caractériser très finement sa structure afin de pouvoir discriminer les plaques vulnérables des plaques stables. La médecine nucléaire, grâce à sa haute sensibilité et son approche métabolique, semble tout à fait adaptée au diagnostic de la plaque d'athérome vulnérable.

De nombreux radiotraceurs ont été ou sont actuellement évalués. La principale limitation provient d'un rapport signal sur bruit trop faible pour permettre l'obtention d'images scintigraphiques en détection externe. Il existe deux principales causes à ceci :

- La cinétique sanguine lente de certains radiotraceurs (anticorps, LDL).
- La fixation non spécifique. En effet, la taille des plaques d'athérome est de l'ordre de 1 mm^3 , et une fixation non spécifique dans le tissu myocardique environnant, même faible, peut rendre l'imagerie de la plaque difficile malgré une bonne spécificité du radiotraceur pour sa cible.

Dans la plupart des études, la fixation est localisée dans les grosses artères (aorte abdominale ou carotides). La mise au point d'un radiotraceur possédant une forte spécificité pour la plaque d'athérome vulnérable associée à une faible fixation non spécifique et à une cinétique sanguine rapide, et donc possédant un rapport signal sur bruit suffisamment élevé *in vivo*, constitue toujours un enjeu majeur en médecine nucléaire.

II) L'ANGIOGENESE

L'angiogenèse ou néovascularisation est un processus par lequel de nouveaux capillaires sanguins sont formés à partir d'un réseau existant. Elle est impliquée dans des processus physiologiques comme l'embryogenèse et la cicatrisation, ou pathologiques comme l'inflammation chronique, la rétinopathie diabétique, le développement des tumeurs et la formation de métastases (Risau W. 1995).

Le vaisseau sanguin est constitué de cellules endothéliales quiescentes qui délimitent la lumière du vaisseau. Ces cellules sont recouvertes d'une membrane basale et d'une matrice extracellulaire contenant les cellules musculaires lisses. L'angiogenèse débute par l'activation, sous l'effet de différents facteurs de croissance, des cellules endothéliales qui se différencient. La lamina et la matrice extracellulaire sont localement dégradées par les métalloprotéinases ce qui va, d'une part libérer un espace où vont migrer les cellules et d'autre part libérer de nouveaux facteurs de croissance stockés dans la matrice extracellulaire tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), et le FGF (Fibroblast Growth Factor). Les cellules endothéliales et les péricytes migrent à travers la matrice extracellulaire et prolifèrent. Ils constituent de nouveaux vaisseaux sanguins qui fusionnent avec le réseau adjacent et sur lesquels vont se développer une nouvelle membrane basale et la matrice extracellulaire (Figure 26).

Durant ce processus, la membrane basale exprime plusieurs protéines d'adhésion incluant le facteur de von Willbrand, la fibronectine et la fibrine. Les vaisseaux sanguins impliqués dans les processus d'angiogenèse expriment certains marqueurs dont l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ exprimée par les cellules endothéliales néoformées et plus faiblement par les cellules musculaires lisses. L'interaction $\alpha_v\beta_3$ -matrice active l'intégrine et entraîne la transmission de signaux intracellulaires ayant un rôle dans la survie, la prolifération et la migration cellulaire (Brooks P.C. 1994).

L'angiogenèse est régulée par plusieurs facteurs endogènes. Il a été identifié plusieurs régulateurs positifs : VEGF, FGF et TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) et des régulateurs négatifs comme le PF-4 (Platelet Factor-4), l'angiostatine et la thrombospondine (Risau W. 1995). VEGF se lie aux récepteurs VEGFR-1 et 2 et induit la différenciation et la prolifération des cellules endothéliales ainsi que leur migration lors de la constitution des néovaisseaux. Il augmente la perméabilité vasculaire et induit l'expression de deux systèmes de protéases : le système activateur du plasminogène et celui des métalloprotéinases de la matrice (Ferrara N. 2002). FGF est synthétisé par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses puis stocké dans la matrice extracellulaire ; il stimule l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ entraînant la migration et la prolifération des cellules endothéliales et a un effet mitogène sur les cellules musculaires lisses (Mattot V. 1997).

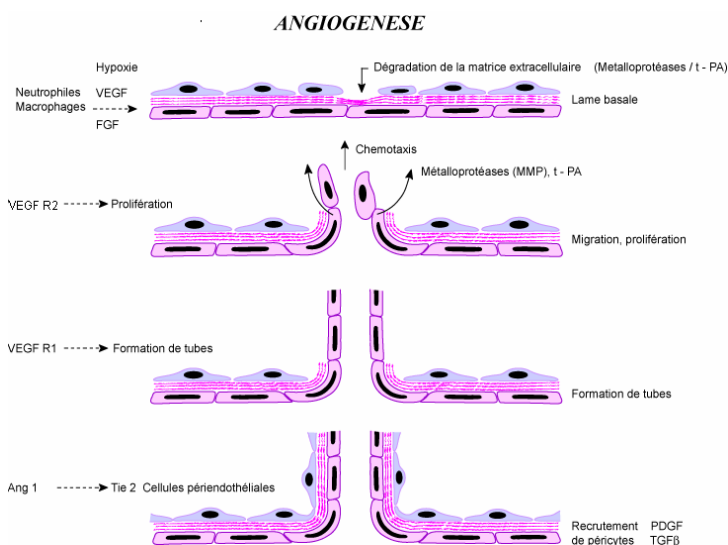


Figure 26 : Représentation schématique de l'angiogenèse physiologique.

II-1) Angiogenèse et cancer

Une tumeur ne peut pas se développer au-delà d'une taille limite (1 à 3 mm³) à moins qu'elle n'obtienne une réponse angiogénique permettant la formation d'un réseau vasculaire et la connexion avec le système sanguin (Folkman J.1971). Dans un premier temps, les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de dégrader et remodeler localement la matrice extracellulaire ; ceci leur permet de proliférer de manière anarchique en profitant des vaisseaux sanguins les plus proches. Puis rapidement, du fait de leur surnombre, elles se retrouvent en hypoxie et induisent l'angiogenèse. Le nouveau réseau vasculaire contrôle l'apport de l'oxygène et des nutriments indispensables à la survie et à la prolifération cellulaire ainsi que l'élimination des déchets toxiques ; plus tard, le réseau constitue un passage vers le système sanguin permettant la circulation de cellules cancéreuses à l'origine de métastases et l'invasion de la tumeur par des leucocytes (Wenjun G. 2004).

Ce réseau sanguin est un réseau structurellement et fonctionnellement anormal (Figure 27). On observe un réseau chaotique, en remodelage constant, alternant des phases de croissance et de régression. Le diamètre des vaisseaux est irrégulier et inégal en fonction de la compression de la paroi immature par les cellules tumorales adjacentes. Le nombre de fenestration, de vésicules internes ou de cellules murales est hétérogène et l'expression des molécules d'adhésion variable, ce qui le différencie du vaisseau sain qui présente une structure externe et interne homogène. Ces variations s'observent entre différents types de tumeurs, entre la tumeur et ses métastases, mais également entre différentes zones tumorales. Le résultat de cette hétérogénéité, selon la localisation ou d'un jour à l'autre, est un débit sanguin chaotique avec une distribution des nutriments et des drogues très variables, limitant ainsi l'action des drogues cytotoxiques (Jain R.K. 2002 et 2003).

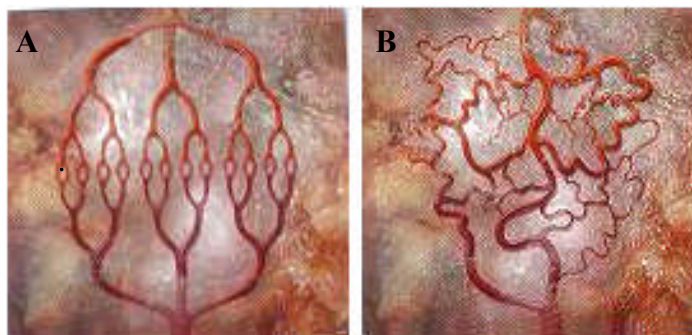


Figure 27 : Représentation schématique de l'angiogenèse physiologique (A) et de la néoangiogenèse tumorale (B).

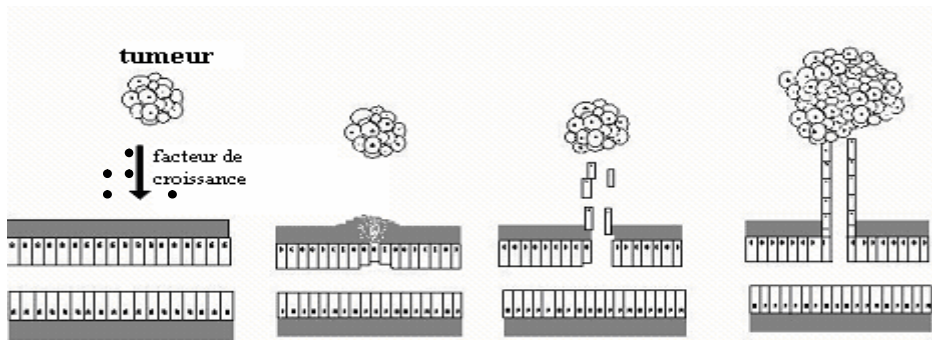


Figure 28 : Représentation schématique de la néoangiogenèse tumorale. Secrétions de facteur de croissance et de cytokines par la cellule tumorale, destruction de la matrice, prolifération et migration des cellules endothéliales, synthèse de neovaisseaux.

La transformation d'une tumeur quiescente en une tumeur agressive requiert un « switch » angiogénique avec sécrétion de facteur proangiogénique comme VEGF et inhibition de la sécrétion de facteurs antiangiogéniques circulants qui auparavant limitaient la croissance des métastases à distance. Une tumeur peut activer la néoangiogenèse en sécrétant des facteurs angiogéniques tels que VEGF, FGF ou PDGF, ou en inhibant la production de facteurs inhibiteurs comme la trombospondine tout en détruisant la matrice extracellulaire, induisant ainsi la libération de facteurs angiogéniques (Figure 28) (Jain R.K. 2002, Folkman J. 2002, Wenjun G. 2004). Les cellules endothéliales qui se multiplient produisent elles-mêmes des facteurs tels que les facteurs β FGF, PDGF, IGF-1, des cytokines comme les interleukines IL-1, IL-6, IL-8, et le GM-CSF (facteur de croissance des granulocytes et des macrophages). Tous ces facteurs favorisent, à des degrés divers et en fonction du type de tumeurs, la croissance des cellules tumorales *in vitro* et probablement *in vivo*. Les cellules tumorales croissent préférentiellement le long des travées endothéliales, il en résulte un processus paracrine de stimulation réciproque des cellules endothéliales et cancéreuses. Enfin, l'hypoxie relative, qui existe près du centre de la tumeur en raison de la compression par la masse cellulaire, stimule également les récepteurs endothéliaux du VEGF. Cette stimulation augmente la fuite des cellules tumorales vers le système lymphatique et vers la circulation sanguine.

Le pronostic d'un cancer est dépendant de la taille de la tumeur et de l'invasion des organes voisins (T), de l'atteinte ganglionnaire médiastinale (N), et de la présence de métastases (M). Ces 3 paramètres définissent le stade du cancer (classification TNM). La présence d'une atteinte ganglionnaire et de métastases est un facteur de mauvais pronostic, or l'angiogenèse est un facteur permettant ce phénomène. Il

est donc indispensable de détecter la présence de néo-vaisseaux au niveau des tumeurs primitives afin d'en faciliter le diagnostic.

II-2) Les intégrines

Les cellules secrètent, assemblent et modèlent un réseau de protéines, la matrice extracellulaire (ensemble de macromolécules, polysaccharides, protéines fibreuses, sels et eau), qui vont déterminer l'organisation des cellules dans les tissus (constitution, maintien et remodelage de l'architecture tissulaire), contrôler la croissance et la multiplication cellulaire, la migration et l'apoptose. L'effet de cette matrice extracellulaire sur les cellules est médié notamment par les intégrines, protéines transmembranaires qui constituent une large famille de récepteurs de surface agissant dans de nombreux processus de reconnaissance cellule-matrice et cellule-cellule (adhésion cellulaire). Elles vont favoriser la liaison entre cellule et matrice, organiser le cytosquelette et activer certains signaux intracellulaires.

Les intégrines sont constituées de sous-unités transmembranaires de type α et β . Les deux sous-unités sont des glycoprotéines de type I. En fonction de l'expression et de l'appariement de sous-unités α (1 à 18) et β (8), on forme une famille composée de 24 intégrines (Wenjun G. 2004). Chaque hétérodimère peut reconnaître un ou plusieurs ligands. La partie N-terminale contient 4 régions de 12 à 15 acides aminés capables de lier des cations bivalents ; la partie C-terminale de la sous-unité β étant responsable de la connexion au filament d'actine (Haubner R. 1997). La majorité des intégrines sont constituées d'un large domaine extracellulaire, d'environ 1200 unités pour α et 800 unités pour β , et d'un petit domaine cytoplasmique de 50 unités environ.

La structure tertiaire du domaine extracellulaire de $\alpha_v\beta_3$ a été élucidée par Xiong en 2002 (Xiong J.P. 2002) (Figure 29). La sous unité α (1–956) est constituée dans sa partie amino-terminale de 7 structures en hélice β (β propeller) qui forment la tête de cette région puis un domaine Ig-like et deux domaines Calf. Le site protéolytique, retrouvé dans la majorité des hélices α , est situé en calf-2. La sous-unité β possède un domaine βA en regard de α et qui forme un hétérodimère α/β , puis un domaine Ig-like « hybride » car situé, dans la structure primaire, de part et d'autre de βA , puis un domaine PSI, un domaine hybride, quatre domaines EGF et enfin le domaine dit « β -Tail domaine (βTD)» car il ressemble à la cystatine C, inhibiteur de la papaine.

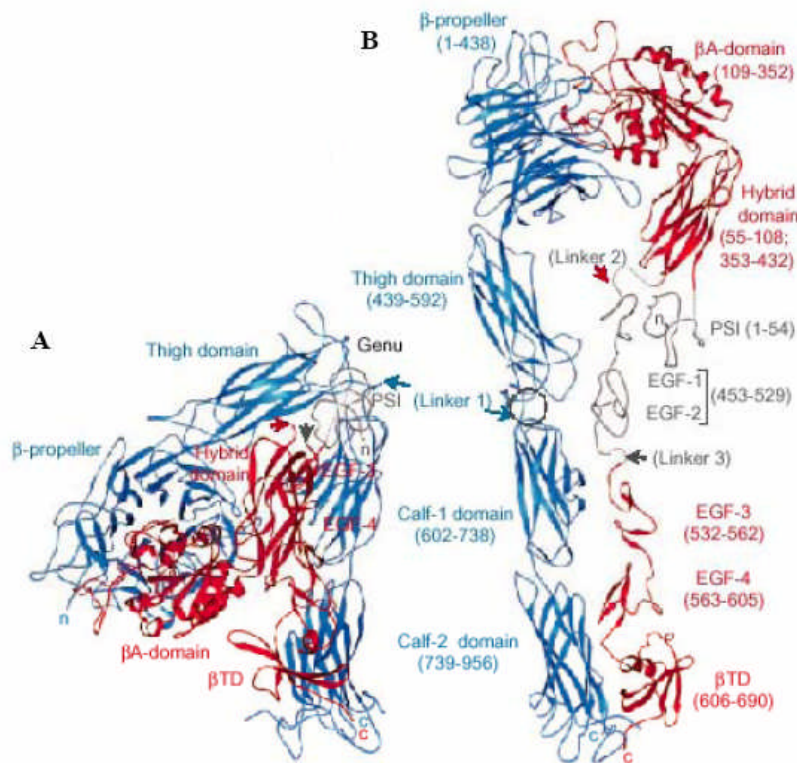


Figure 29 : Représentation de la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (sous-unité α_v en bleu, sous-unité β_3 en rouge). A : structure cristalline du récepteur, B : modèle du récepteur déployé (Xiong J.P. 2001).

L'activation des intégrines facilite l'assemblage de l'actine au cytosquelette entraînant ainsi un changement de la conformation et de la morphologie cellulaire. Ces modifications cellulaires facilitent l'adhésion puis la migration des cellules et peuvent inhiber l'apoptose (Giannis A. 1997). Quelques intégrines lient les protéines de l'endothélium à la matrice subendothéliale tandis que d'autres interviennent dans l'interaction entre leucocytes et cellules endothéliales. Une majorité est impliquée dans la fixation des protéines intervenant dans l'inflammation et les processus de cicatrisation (Cheresh D.A. 1993).

L'interaction ligand-intégrine dépend de la reconnaissance de séquences spécifiques communes aux ligands. La séquence la plus fréquemment reconnue par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est la séquence RGD, arginine-glycine-acide aspartique, présente dans une grande variété de ligands endogènes et notamment les protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la vitronectine, le facteur von Willebrand, le fibrinogène, le collagène, la laminine et la thrombospondine (Cheresh D.A., 1993). La séquence RDG est la cible de plusieurs intégrines. Cependant, si les protéines endogènes présentent la même séquence cible, leur récepteur est souvent exclusif et spécifique (Cheresh D.A. 1993, Giannis A. 1997, Haubner R. 1997). Par contre, un même peptide synthétique peut être reconnu par plusieurs récepteurs.

L'efficacité et la spécificité de l'interaction ligand-intégrine dépendent non seulement de la présence de RGD mais aussi de la nature des séquences proches. Deux hypothèses sont évoquées (Brooks P.C. 1994, Ruoslahti E. 1986).

- La séquence RGD sert de site de fixation tandis que la spécificité est générée par une autre séquence cible spécifique de chaque protéine.
- Le tripeptide contient toute l'information ; les séquences autour de RGD forcent le déterminant à prendre une conformation lui permettant d'être reconnu par son récepteur.

Les intégrines transmettent des signaux mécaniques et chimiques avec activation des kinases de la famille de SFKs (Src Family Kinase), cible de VEGF. Bien que les mécanismes d'activation du signal soient complexes, leur objectif est de promouvoir la survie cellulaire, de contrôler l'action des RTKs (récepteur tyrosine kinase) et de ce fait, déterminer quelles cellules prolifèrent et migrent en réponse aux facteurs de croissance solubles et aux cytokines (Wenjun G. 2004). Les intégrines interviennent aussi dans la transmission du signal de l'environnement extracellulaire vers le compartiment intracellulaire notamment en régulant le système antiport Na/H, le pH intracellulaire et le cycle de l'inositol phosphate (Cheresh D.A 1993).

II-2-1) L'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ est exprimé par de nombreuses cellules : ostéoclastes, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales et certaines cellules tumorales (Dechantsreiter MA. 1999). Il reconnaît notamment le facteur von Willebrand, le fibrinogène, la fibronectine et la vibronectine alors que les autres intégrines sont plus restrictives. Il est exprimé, en faible densité, par les cellules endothéliales quiescentes des vaisseaux sains et dans de nombreux tissus. Son expression est fortement augmentée dans les vaisseaux en croissance et dans la plupart des tumeurs en développement vasculaire (Cheresh D.A. 1993, Dechantsreiter M.A. 1999, Giannis A. 1997, Haubner R.1999).

Il joue un rôle important dans la migration des cellules endothéliales, l'induction de l'angiogenèse tumorale et le développement des métastases. Le récepteur est combiné aux récepteurs des tyrosines kinases incluant les récepteurs de EGF, PDGF, insuline et VEGF, et coopère avec eux pour activer la migration cellulaire. Il intervient dans le recrutement de MPP2 et l'activation de la plasmine, molécules qui dégradent les composants de la matrice et de la membrane basale, favorisant ainsi la dissémination des cellules tumorales. A

l'inverse, l'inhibition de l'interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire induit l'apoptose cellulaire (Brooks P.C. 1994, Guo W. 2004).

L'adhésion des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire est médiée par l'interaction entre l'intégrine et un peptide possédant la séquence RGD présent sous forme insoluble. La fixation du ligand active les intégrines liées au cytosquelette ; c'est le début de la migration cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Cheresh D.A 1993, Giannis A. 1997). A l'opposé, l'interaction avec la forme soluble monovalente de RGD ou d'un analogue, inhibe l'adhésion de certains ligands comme la fibronectine, entraîne la mort de la cellule par apoptose et l'arrêt de la vascularisation, donc de la néoangiogenèse (Giannis A. 1997, Ruoslahti E. 1986). Les ligands natifs sont constitués d'une large protéine qui contient le motif RGD dans une large boucle ou dans une structure flexible placée elle-même au sein d'une chaîne polypeptidique. Le ligand RGD se lie sur la sous-unité β_3 puis il se positionne par liaison sur deux sites de fixation de la sous-unité α . Il entre dans une poche dans laquelle sont inclus la portion N terminale de la sous unité α ainsi que le domaine cationique de α et β . Il se constitue alors un complexe ternaire vecteur, récepteur et cation (Mc Quade P. 2003).

II-2-2) Intégrines et cancer.

Durant la progression tumorale et l'envahissement métastatique, un signal provenant d'intégrines spécifiques permet aux cellules cancéreuses de se détacher de leurs voisines, réoriente leur polarité durant la migration et leur permet de survivre et de proliférer dans un microenvironnement étranger. Les intégrines sont les médiateurs principaux de l'adhésion cellulaire, de la migration, de la différenciation et de la survie.

Les cellules néoplasiques tendent à perdre les intégrines qui assurent leur adhésion à la membrane basale ou qui contrôlent le stade de différenciation. Elles tendent également à maintenir ou surexprimer les intégrines qui stimulent la survie, la migration et la prolifération cellulaire. En fonction du type cellulaire, les intégrines ont un rôle différent. Cependant on peut considérer que $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_3\beta_1$ diminuent la progression tumorale alors que $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$ et $\alpha_6\beta_4$ la favorisent. Par exemple, $\alpha_v\beta_3$ est fréquemment surexprimée dans les glioblastomes et les mélanomes (Montgomery A.M. 1994).

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ combinée avec des récepteurs RTKs tels que les récepteurs à EGF, PDGF, insuline et VEGF coopère avec eux pour promouvoir la migration cellulaire. Cependant son rôle principal dans l'invasion tumorale et la formation de métastases semble être le recrutement et l'activation des métalloprotéases MMP2 et de la plasmine qui vont dégrader les composants de la membrane basale et contribuer ainsi à la génération de nouveaux sites d'adhésion des intégrines nécessaire à la migration. L'intégrine est aussi la cible de facteurs inhibiteurs tels que la tumstatine, fragment du collagène IV qui bloque l'angiogenèse (Wenjun G. 2004).

De même qu'il existe une relation entre la progression tumorale et la néoangiogenèse, il existe une relation entre la néoangiogenèse tumorale et le nombre de récepteur $\alpha_v\beta_3$. Exprimé par les cellules endothéliales activées, le nombre de récepteur intégrine est directement lié à la progression de la neovascularisation tumorale et donc à la progression et à la croissance tumorale (Folkmann J. 2002).

II-3) Les traceurs radiomarqués de la néoangiogenèse

De nombreux traceurs sur différentes cibles ont été utilisés pour l'étude du processus angiogénique :

- Les ligands de la fibronectine et de VEGF.
- Les inhibiteurs des métalloprotéases.
- Et surtout les ligands de $\alpha_v\beta_3$. Ces derniers ont été marqués au ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{18}F , ^{90}Y , ^{64}Cu et iode ($^{125/123/124}\text{I}$). Beaucoup ont montré une sélectivité et spécificité *in vitro*, cependant, chez la souris les résultats sont fonction des modèles, et chez l'homme les résultats sont contrastés, ils varient selon le type tumoral et l'activité angiogénique.

II-3-1) Les peptides «RGD»

Différents peptides contenant une séquence RGD sont ou ont été étudiés en cancérologie en tant qu'antagonistes de la néoangiogenèse ou pour l'imagerie des tumeurs. Ces molécules ont pour cible l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, celle-ci n'étant pas ou peu exprimée par les cellules endothéliales quiescentes, elles sont spécifiques des néovaisseaux irriguant la tumeur ainsi que des tumeurs surexprimant $\alpha_v\beta_3$.

- A haute dose, les peptides RGD non marqués interfèrent avec les cellules endothéliales néovasculaires en inhibant la fixation du ligand naturel sur le récepteur $\alpha_v\beta_3$ et la transmission du signal. L'objectif des auteurs est de synthétiser un peptide qui inhibe la prolifération et la migration cellulaire et qui induit l'apoptose des cellules endothéliales activées et des cellules tumorales (Haubner R. 2001).

- Le développement tumoral, et donc le pronostic clinique, est en relation avec la présence de néovaisseaux ; la densité en récepteurs est corrélée à la densité vasculaire et donc au risque de développement métastatique. L'identification d'une néoangiogenèse tumorale, par visualisation et quantification du récepteur $\alpha_v\beta_3$, permet d'une part d'identifier les tumeurs stables ou à fort risque de dissémination, et d'autre part permet une meilleure adaptation des protocoles de chimiothérapie avec l'adjonction ou non de thérapie anti-angiogéniques, et d'évaluer l'efficacité des ces mêmes traitements anti-angiogéniques (Avastin[®], cilengitide...). De même, ces marqueurs de la néoangiogénèse peuvent jouer un rôle important dans le développement analytique et préclinique ainsi que dans les études cliniques des futurs antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ actuellement à l'étude dans des traitements antitumoraux.

- La mise au point d'une molécule radiomarquée sélective et spécifique des néovaisseaux permet d'envisager le traitement des tumeurs solides en couplant la molécule à un émetteur β . Deux avantages par rapport à une chimiothérapie classique : la perte d'un seul vaisseau sanguin peut entraîner la mort d'une multitude de cellules et le traitement n'entraîne pas de résistance (Eskens F.A.2003, Janssen M.L. 2002,).

De nombreuses études portant sur des peptides RGD ont notamment été réalisées par l'équipe de Haubner R. et l'équipe de Chen X. que ce soit avec des émetteurs TEMP ou TEP. Elles ont montré que les peptides RGD de petite taille présentent une meilleure affinité pour $\alpha_v\beta_3$ que les molécules physiologiques plus grandes comme la fibronectine. De plus, les peptides linéaires sont rapidement dégradés dans le sang par les enzymes alors que les petits peptides cycliques ne sont pas métabolisés et présentent une affinité encore plus importante. Enfin, la présence d'une phénylalanine dans le cycle contenant la séquence RGD augmente l'affinité du ligand RGD pour $\alpha_v\beta_3$.

II-3-1-1) Les émetteurs de simples photons

Une grande variété de composés basés sur la séquence RGD a été synthétisée ces dix dernières années.

Kesler *et al* synthétisent le premier peptide sélectif de $\alpha_v\beta_3$: le cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-). Ce dernier a ensuite été iodé par fixation sur une tyrosine introduite dans le cycle à la place de la phénylalanine ou de la valine (Haubner R.1999). Les expériences ont montré que la présence du cycle inhibe l'action des protéases *in vivo*, et que le «cyclo RGD» montre une fixation tumorale avec une liaison spécifique sur $\alpha_v\beta_3$. Cependant, toutes ces études ont montré une clairance sanguine faible et une élimination hépatobiliaire, préjudiciable à la bonne qualité des images.

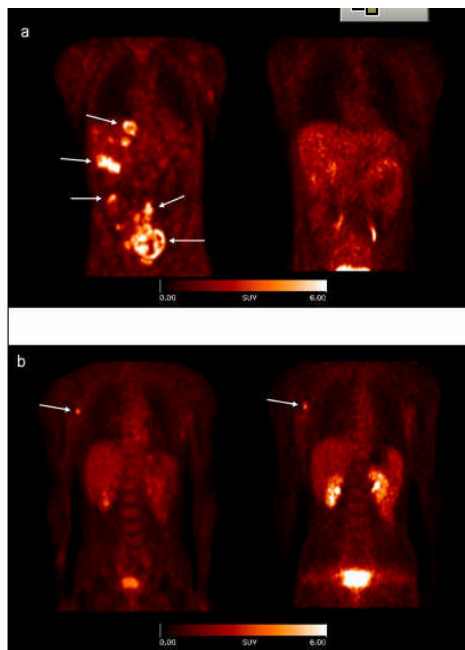
Afin de modifier les paramètres pharmaco-cinétiques de ces molécules, et notamment accélérer la cinétique sanguine, des groupements glucose, galactose ou des chaînes d'acides aminés hydrophiles (3D-Aspartique ou 3 D-Sérine) ont été ajoutés à la structure (Haubner R. 2001 et 2005, Haubner RH. 2003). La fixation d'une fonction glycosylée sur la base RGD augmente l'élimination rénale et favorise le rapport tumeur/bruit de fond. Le Galacto-RGD a en outre démontré, par scintigraphie, une fixation sur les néovaisseaux produits par une tumeur n'exprimant pas $\alpha_v\beta_3$. Une autre approche consiste à fixer une chaîne polyéthylèneglycol sur la structure RGD afin d'améliorer la rétention tumorale par internalisation de la molécule.

La recherche tend aujourd'hui vers les molécules multimériques. Un ou plusieurs cycles RGD sont fixés sur une structure polymérique permettant soit une modification de la biodistribution, soit la vectorisation du radiopharmaceutique dans la cellule. Des essais ont été réalisés avec une structure polymérique méthacrylamide (Mitra A. 2005), avec la transférine ou un polyéthylèneglycol avec 4 sites RGD (Chen X. 2004, Liu S. 2001) ou sur des structures protéiques (peptides ou anticorps) (Boturn D. 2004, Garanger E. 2005, Kok R.J. 2002). Ces structures multivalentes de grande taille permettent d'augmenter l'affinité et la coopérativité pour le récepteur, facilitant par-là même l'internalisation du vecteur. Elles présentent une excellente affinité et sélectivité *in vitro*. *In vivo*, l'accumulation tumorale est d'autant plus importante que le nombre de cycles RGD augmente (de 1 à 4) (Kok R.J. 2002, Liu S. 2001).

II-3-1-2) Les émetteurs de positons.

Le PEG-E[c(RGDyK)]₂-DOTA-[⁶⁴Cu] injecté chez la souris atteinte d'un cancer pulmonaire a permis de visualiser la tumeur et les ganglions médiastinaux avec une meilleure sensibilité que le [¹⁸F]-FDG en raison d'une faible fixation non spécifique pulmonaire et cardiaque (Chen X. 2004 et 2005).

Haubner *et al.* ont décrit comment, chez la souris, le [¹⁸F]-galacto-RGD permet in vivo de quantifier l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de visualiser la néoangiogenèse induite par des tumeurs surexprimant $\alpha_v\beta_3$ (mélanome humain M21 et carcinome dermique A1, A431). Les études ont été poursuivies chez l'homme et ont permis de montrer une corrélation entre l'expression de $\alpha_v\beta_3$ et la cinétique de fixation du traceur à 90 minutes (Haubner R. 2005) (Figure 30).



(A) patient avec un mélanome malin de stade IV et métastases multiples (foie, rein, peau, abdomen). Le [¹⁸F]FDG (gauche) se fixe sur les lésions alors que l'imagerie est négative pour le [¹⁸F]Galacto-RGD (droite).

(B) patient avec un mélanome malin de stade IIIb et un nodule secondaire au niveau axillaire (flèche): fixation intense du [¹⁸F]FDG (gauche) et [¹⁸F]Galacto-RGD (droit).

Figure 30 : Comparaison de scintigraphie [¹⁸F]FDG et [¹⁸F]Galacto-RGD chez l'homme. Images coronales à 60 mn post-injection. Haubner PLoS Med. 2005 March; 2(3) : e70.

Du fait de l'hétérogénéité de l'expression de l'intégrine en fonction des patients et en fonction de la tumeur, sa quantification par des méthodes non invasives permet de préjuger de l'efficacité des traitements antiangiogéniques ciblant l'intégrine ou d'ajuster la posologie de ces traitements en fonction du taux de récepteurs. D'autre part, Gasparini a montré qu'il existe une corrélation entre le taux d'expression de l'intégrine par la tumeur et le pronostic vital, ce qui pourrait modifier les choix thérapeutiques (Gasparini G. 1998).

II-3-1-3) Autres émetteurs

Une deuxième approche est l'utilisation des peptides RGD en thérapie. De nombreux peptides ont été synthétisés comme antagonistes de la migration, croissance et différenciation cellulaire afin d'inhiber la croissance des nouveaux vaisseaux et entraîner une régression tumorale. Cet effet pourrait être associé à une radiothérapie métabolique en synthétisant un peptide de haute affinité et spécifique des tumeurs, marqué aux émetteurs β^- ou auger.

D'autres études sont en cours sur d'autres pathologies que le cancer. En effet, $\alpha_v\beta_3$ est surexprimée par les cellules endothéliales activées au cours de la néoangiogenèse physiologique, notamment dans les processus de cicatrisation, mais aussi dans de nombreux processus inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, le rejet de greffe et la plaque d'athérome. Les peptides RGD sont en cours d'étude pour toutes ces pathologies.

II-3-2) Autres traceurs de la néoangiogenèse

- Les ligands de la fibronectine

Un isoforme de la fibronectine contenant le domaine ED-D est surexprimé dans le tissu fœtal et néoplasique ainsi que lors de la prolifération vasculaire. Tardi *et al* ont synthétisé un anticorps anti ED-D iodé, qui chez la souris se fixe sélectivement sur une tumeur carcinoïde injectée sous la peau (Haubner RH. 2003, Tarli L. 1999).

- Les inhibiteurs des métalloprotéases : MMP inhibiteurs

Un peptide marqué au ^{64}Cu , le [^{64}Cu]-DOTA-CTTHWGTLIC, ligand de MMP-2 et MMP-9 a été étudié par Lei *et al* (Haubner RH. 2003). Cependant, si les études scintigraphiques ont montré que ce peptide fixe les grosses tumeurs, celles de petites tailles sont indétectables à la caméra, et ce en raison d'une expression insuffisante des MMP. Différentes équipes ont aussi travaillé sur des dérivés du CGS 27023A, inhibiteur des MMP produit par Novartis, marqués au ^{11}C et ^{18}F . Ces dérivés présentent une affinité importante pour MMP-1 (Haubner RH. 2003).

- Les anticorps anti-VEGF

Bouziotis (Bouziotis P. 2003) a synthétisé un anticorps anti-VEGF, le VG76e, marqué au samarium 153 ou au technétium 99m. Injecté chez la souris Swiss, il s'accumule dans la tumeur, et ne montre aucune fixation non spécifique dans les organes.

II-4) Les traitements anti-angiogéniques

La chimiothérapie conventionnelle cible la tumeur mais la vascularisation tumorale devient une nouvelle cible, celle-ci n'étant pas soumise aux phénomènes de résistance et de variation génétique. VEGF et son récepteur VEGF-R sont devenus les nouvelles cibles thérapeutiques des traitements anti-cancéreux. On retrouve deux classes thérapeutiques qui cible VEGF ou de son récepteur, les inhibiteurs des tyrosines kinases et les anticorps monoclonaux.

En 1971, Folkman J. a été le premier à étudier le rôle des inhibiteurs de la néoangiogenèse dans le traitement des cancers (Folkman, J. 1971). En 2004, le premier médicament antiangiogénique, l'Avastin (bevacizumab, Genentech[®]), anticorps anti-VEGF, a été autorisé aux Etats-Unis par la FDA. Il dispose en France d'une AMM dans le cancer colorectal en combinaison avec une polychimiothérapie 5-Fluorouracil.

L'Avastin[®] ou bevacizumab est un anticorps monoclonal murin humanisé dirigé contre VEGF-A, facteur proangiogénique. Lors des études précliniques, les effets démontrés de l'Avastin sont une réduction de la vascularisation tumorale et une inhibition de la progression métastatique. Les effets sur la tumeur primaire sont faibles. Cependant, la normalisation structurelle du réseau vasculaire améliore la délivrance intratumorale des drogues et permet une meilleure oxygénation des tissus tumoraux qui redeviennent sensibles à la radiothérapie (Jain R.K. 2002).

C'est le premier médicament anti-angiogénique qui en combinaison avec une chimiothérapie améliore significativement la survie chez les patients atteints de cancer colorectal. L'essai de phase III chez plus de 800 malades montre une amélioration significative de la survie globale (15,6 mois pour 5FU+acide folinique contre 20,3 mois 5FU+ bevacizumab+ acide folinique) et de la survie sans récurrence (Milano M. 2006).

D'autres composés ont été étudiés :

- Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF : le gefitinib (Iressa[™]) et l'erlotinib (Tarceva[™]) (HER1), dans le traitement des cancers du poumon non-à-petites cellules.
- Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur de VEGF. Le Sutent (sunitinide-Pfizer[®]) est dispensé en milieu hospitalier sous ATU dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales et le cancer du rein métastatique. C'est un inhibiteur

des plusieurs récepteurs de tyrosines kinases impliqués dans la croissance tumorale qui entraîne l'inhibition de plus de 80 kinases différentes. Il a été notamment identifié comme un inhibiteur des récepteurs TK du facteur de croissance plaquettaire $PGFR\alpha$ et $PGFR\beta$, et des récepteurs de VEGF : VEGF-R1, VEGF-R2, et VEGF-R3.

- Les molécules angiostatiques comme la thrombospondin-1, l'angiostatine ou l'endostatine (Folkmann J. 2002).

- Les molécules inhibant les interactions de la cellule endothéliale à la matrice comme les peptides "RGD".

- Shannon E.K. a montré, chez des souris sur lesquelles des cellules cancéreuses mammaires ont précédemment été implantées, que les pseudopeptides « RGD » S137 et S237 pouvaient, en cas d'administration chronique à 100 mg/kg/J pendant 8 semaines, inhiber l'angiogenèse tumorale et la prolifération tumorale sous forme de métastases sans toutefois inhiber la croissance de la tumeur initiale (Shannon E.K., 2004).

- Le cilengitide est un petit peptide contenant le motif RGD : c[-RGDf(N-Me)V-] antagoniste sélectif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le composé est développé par la société Merck KGaA dans des protocoles d'essais cliniques de phase I et II comme agent anti-angiogénique. Burke P. a montré l'intérêt du cilengitide en association avec un protocole de radioimmunothérapie RIT ^{90}Y DOTA-peptide ChL6 chez la souris nude inoculée avec une tumeur du sein bcl2 positive (Burke P. 2002). Le cilengitide cible les cellules endothéliales en prolifération. Après administration de 250 μg de cilengitide et 7,4 MBq de [^{90}Y]-DOTA-ChL6, les résultats montrent des régressions tumorales, avec apoptose des cellules endothéliales et tumorales, plus importantes chez les souris traitées avec les deux molécules que chez les souris traitées avec RIT seule. Des essais cliniques de phase I ont été réalisés dans le traitement des tumeurs solides (Eskens F. 2003), et des essais de phase II dans le cancer du poumon non à petite cellules.

II-5) Conclusion

La néoangiogenèse joue un rôle essentiel dans la progression tumorale, aussi bien lors de la croissance de la tumeur primitive que lors de la dissémination métastatique. L'extension métastatique est indissociable de la néoangiogenèse, d'une part parce que la

cellule métastatique a besoin du réseau vasculaire pour se disséminer et d'autre part parce qu'elle a besoin de se constituer un réseau sanguin pour croître une fois qu'elle a atteint l'organe cible. Cependant, il est reconnu que la tumeur (primitive ou métastase) ne stimule pas la croissance vasculaire si elle est située à proximité du réseau sanguin existant qui lui fournit alors les nutriments nécessaires à sa croissance ou si elle est localisée dans les ganglions lymphatiques. L'utilisation aujourd'hui sur un grand nombre de patient de l'Avastin® (Bevacizumab), médicament anti-VEGF, a permis de montrer l'intérêt de cette voie thérapeutique dans le traitement des cancers. Il faut cependant se rappeler qu'il existe une contradiction entre une thérapie antiangiogénique ciblée sur l'endothélium vasculaire et qui vise à détruire les vaisseaux qui irriguent la tumeur et la chimiothérapie dont l'objectif est d'apporter le maximum de produit à la tumeur, ou la radiothérapie qui nécessite l'oxygénation des cellules cancéreuses. Les premières études cliniques anti-angiogéniques ont cependant démontré qu'après régression le réseau vasculaire se réorganise et devient une structure plus organisée de type physiologique : ceci doit permettre de faciliter l'accès aux agents chimiothérapeutiques, aux agents hormonaux et à la radiothérapie. Le traitement d'un patient doit donc s'envisager individuellement selon un protocole global et avec des schémas thérapeutiques bien définis.

L'utilisation de radioligands spécifiques des intégrines $\alpha_v\beta_3$ est primordiale pour déterminer la densité en récepteurs et identifier la présence d'un réseau vasculaire tumoral irriguant la tumeur. Ces radioligands, en fonction de la nature de l'isotope, pourront avoir une indication thérapeutique dans le cadre de ligands marqués aux émetteurs β^- , essentiellement pour le traitement de tumeurs surexprimant $\alpha_v\beta_3$, ou une indication diagnostique :

- L'identification de néovaisseaux permet de prévoir si une tumeur est à fort potentiel métastatique.
- Compte tenu du nombre de thérapies anti-angiogéniques en développement, la présence de néovaisseaux exprimant $\alpha_v\beta_3$, ou d'autres récepteurs, doit être définie avant de commencer une thérapie qui pourrait s'avérer inutile pour le patient.
- L'étude de l'efficacité thérapeutique par des examens scintigraphiques avant et après les traitements permet de démontrer l'intérêt du protocole thérapeutique ou au contraire permet d'arrêter une cure inefficace.

MATERIEL

I) RADIOPROTECTION

La manipulation de la radioactivité nécessite de travailler en dépression et en zone surveillée afin de limiter l'irradiation du personnel. L'iode 125 étant très volatil et de demi-vie longue (60 jours), les manipulations (marquage, dilutions) s'effectuent dans une boîte à gants en dépression avec aspiration d'air dans un filtre à charbon. La manipulation de l'iode 123 ou du technétium 99m s'effectue sous hotte plombée en dépression.

La manipulation de produits radioactifs nécessite une gestion des déchets appropriée et fonction du type de déchets (liquide, solide, gazeux) et de la demi-vie de l'isotope. Les déchets sont conservés sur une période correspondant à 10 demi-vies du radioélément concerné et en conformité avec la législation en vigueur.

II) INSTRUMENTS POUR LES ETUDES ANALYTIQUES

Les solutions étant extrêmement diluées, le ligand et l'isotope sont présents en quantité infime. Les techniques analytiques physico-chimiques usuelles (UV, RMN, SM) ne sont pas exploitables pour étudier les complexes formés. Nous utiliserons des détecteurs de radioactivité plus sensibles. Les techniques mises en jeu sont la chromatographie couche mince (CCM) avec lecture des plaques par un radiochromatographe équipé d'une sonde de mesure gamma, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) avec analyse de l'éluat par absorption UV et mesure de la radioactivité et dans une moindre mesure l'électrophorèse avec lecture des gels au phosphoimager (autoradiographie).

- Chromatographie Couche Mince

La détermination de la pureté radiochimique des traceurs peptidiques est réalisée par CCM sur plaque de silice greffée C18 (CCM RP18F₂₅₄ Merck®), plaque de silice (Merck), ou sur ITLC-SG (Pal Gelman science). Pour chaque peptide, différents éluants sont testés afin d'optimiser la séparation des molécules et de l'iode libre : acétate d'éthyle, acétonitrile, mélange binaire acétonitrile/eau ou méthanol/eau dont les proportions varient en fonction des ligands.

Les plaques sont analysées sur un radiochromatographe Berthold® LB2842 Automatic TLC Linear Analyser ou un radiochromatographe Raytest Minigita® (Fuji) muni d'une sonde gamma.

La pureté radiochimique (PRC) est évaluée en mesurant le pourcentage d'impuretés radioactives. $PRC \% = \text{Activité de la molécule marquée} / \text{Activité de toutes les espèces chimiques présentes}$.

- Electrophorèse

Nous avons réalisé deux types d'électrophorèses :

- Electrophorèse sur gradient de gel de polyacrylamide 4%-20%.
- Electrophorèse Phastgel Pharmacia. Transfert PVDS Millipore Immobiligen-P

- Chromatographie liquide

Pour isoler les protéines, nous avons testé la chromatographie sur colonne Preppak[®] Delta pak C18 ; Colonne Sep-Pak[®] plus C18 cartridge Millipore[®] et colonne d'exclusion Sephadex[®] G25 NAP^{TMS}.

- La séparation des produits de la réaction de marquage a été étudiée par chromatographie sur colonne Sep-Pak[®] plus C18 avec différents éluants : tampon phosphate, mélange acétonitrile/eau, solution éthanol/acide chlorhydrique. La colonne est activée par 5 ml de solution aqueuse puis 5 ml de solution organique ; 0,5 ml de solution marquée est déposé sur la colonne et le produit est élué par 10 ml de solvant (fractions de 1 ml).
- La chromatographie d'exclusion est réalisée avec une solution tampon phosphate sodique pH 7,4. La colonne est activée par 10 ml de tampon, dépôt de 0,5 ml de solution marquée soit 370 KBq, puis élution par séquences de 0,5 ml de tampon. Chaque fraction est comptée au compteur gamma pendant une minute. Les fractions correspondant aux pics de radioactivité sont analysées par CCM.
- Les analyses par chromatographie liquide haute performance (CLHP) ont été réalisées sur CLHP analytique Waters[®] Delta 717, équipée d'une sonde radioactive NaI(Tl) NOVELEC et couplée à un détecteur UV Waters[®] 2487. Cet ensemble permet une mesure simultanée des UV et de la radioactivité. Les solutions sont éluées sur une colonne séparatrice C18 Lichrosorb RP18 column (Supelco[®]), 20 cm, 5 µm avec un débit de 0,7 ml/mn. Le solvant est un gradient acétonitrile-TFA 0,1 % /eau-TFA 0,1 %. La CLHP permet une séparation des différents constituants radioactifs à analyser plus fine que la CCM. D'autre part, en CLHP une quantité non négligeable de la radioactivité persiste dans la colonne et n'est pas mesurée, ce qui n'est pas le cas en CCM.

- Mesure de la radioactivité

Différents instruments de mesure de la radioactivité ont été utilisés. La mesure des échantillons liquides et solides est réalisée soit sur activimètre Capintec[®] CRC15 (pour les activités supérieures à 37 KBq) soit sur passeur d'échantillon compteur gamma Cobra Packard[®] (pour les activités inférieures à 37 KBq). Les coupes de tissus et les gels d'électrophorèse sont lus au phospho-imager Fujifilm BAS 5000. Les scintigraphies petit animal (souris, rats, hamsters, lapins) sont réalisées sur une gamma-caméra dédiée petit animal (γ Imager Biospace).

III) LES PEPTIDES

Depuis 1980 et l'utilisation de dérivés de la somatostatine dans le diagnostic de tumeurs neuroendocrines, les peptides sont de plus en plus étudiés comme traceur en médecine nucléaire. L'objectif de ce travail est de réaliser et valider le marquage à l'iode et au technétium de 2 séries de ligands peptidiques permettant par une méthode d'imagerie non invasive de visualiser et étudier deux mécanisme physiopathologiques : la plaque d'athérome vulnérable et la neoangiogenèse tumorale.

III-1) Généralités

De nombreux traceurs actuellement à l'étude sont des peptides de petites tailles. Le choix d'un peptide comme marqueur potentiel en imagerie médicale repose sur plusieurs avantages (Weiner R.E 2002) :

- Chimiques.
 - Synthèse documentée et automatisable.
 - Peu sensible aux conditions de marquage.
 - Possibilité de faire un marquage à l'iode ou au technétium 99m.
- Biologiques.
 - Clairance rapide.
 - Diffusion tissulaire et fixation tumorale rapide.
 - Affinité plus grande pour leurs récepteurs que les peptides de grande taille.
 - Peu immunogène.

La synthèse peptidique est réalisée en phase solide ou en phase liquide. La méthode en phase solide est plus simple à mettre en œuvre, demande moins d'étapes de purification et peut être automatisée. La plus courante est la synthèse en phase solide Fmoc.

Les peptides peuvent être considérés comme des agents de choix pour des applications diagnostiques et thérapeutiques. De nombreux peptides ont déjà été radiomarqués essentiellement dans le diagnostic des cancers, les cellules tumorales surexprimant des récepteurs spécifiques des peptides ou de leur analogues marqués. En fonction du choix de l'isotope et du type de rayonnement, la tumeur peut être soit visualisée soit traitée. Nous pouvons citer, parmi tous les peptides radiomarqués, les analogues de la somatostatine (14AA) marqués à l'indium 111 (Octreoscan®), de la vasoactive intestinal hormone (VIP, 28 AA), de la bombésine (GRP, 14 AA), de la neurotensine (13AA) ou de la substance P (SP, 11 AA) (Weiner R.E.2002, 2005).

Les premiers peptides marqués à l'indium 111 pour une utilisation chez l'homme sont apparus en 1981, et ceux marqués à l'iode chez l'animal en 1990. Les radioligands ont évolué de l'anticorps monoclonal Fab' vers les fragments Fab puis vers des unités plus petites comme les fragments Fv et finalement aux petits peptides synthétiques. Les anticorps sont des molécules de grande taille et de haut poids moléculaire ce qui limite la fixation à la cible et ralentit la clairance sanguine ; il en résulte un rapport cible / bruit de fond (sang) faible.

Il existe différents prérequis à l'utilisation de peptides en médecine nucléaire pour une scintigraphie, et surtout pour la thérapie compte tenu des doses utilisées :

- En premier lieu, la cible doit être en quantité suffisante et de préférence surexprimée afin de pouvoir obtenir une image par détection externe.

- Le peptide doit avoir une affinité pour son récepteur de l'ordre du nanomolaire, voisine du peptide naturel. Il est à noter que les modifications structurelles peuvent modifier l'activité biologique. A cause de la petite taille du peptide, la fixation d'un chélate et du radionucléide peut augmenter significativement le poids moléculaire et provoquer un changement conformationnel qui peut modifier la séquence de reconnaissance. De ce fait, le site d'attachement du radionucléide doit être le plus éloigné possible du site biologiquement actif. Un petit synthon « espaceur » doit parfois être introduit.

- La spécificité est aussi un prérequis. La fixation de l'isotope peut modifier la sélectivité pour certains sous-types du récepteur. Les agonistes sont préférés car ils sont souvent internalisés avec médiation du récepteur dans la cible provoquant ainsi leur accumulation, ce qui augmente le signal. Dans le cadre d'une application thérapeutique,

l'internalisation est préférable pour les émetteurs d'électrons Auger, les émetteurs alpha et les émissions β faiblement énergétique car les rayonnements peuvent ainsi agir au niveau de l'ADN.

- Les autres prérequis sont un radiomarquage avec un haut rendement et une activité spécifique élevée, et la stabilité du marquage *in vitro* et *in vivo*. Ces molécules d'origine biologique sont plus facilement reconnues par les enzymes de l'organisme d'où un risque élevé de protéolyse et un risque de métabolisation qui doit être évalué.

Le marquage est réalisé par voie directe ou par voie indirecte. Lors d'un marquage au technétium 99m, le marquage direct peut être utilisé si le peptide ou l'anticorps possède un pont disulfure. On ajoute un agent réducteur qui réduit le pont disulfure en deux groupes thiols qui sont des ligands donneurs et qui complexent le technétium 99m. C'est une méthode simple qui ne nécessite pas d'agent chélatant ; l'inconvénient est que la rupture du pont disulfure entraîne une altération de la conformation tridimensionnelle du peptide qui peut modifier son activité biologique (Thakur ML. 1995).

L'approche indirecte implique l'utilisation d'un agent bifonctionnel (BFCA) capable à une extrémité de lier l'isotope et à l'autre extrémité de lier le peptide. Cette méthode nécessite une chimie bien définie. Le peptide est moins exposé à certains réactifs chimiques comme les agents d'oxydation pour le marquage à l'iode, ce qui limite le risque de dégradation. La fixation de l'isotope peut être régiosélective. Le principal inconvénient est que cette méthode est lente et demande souvent plusieurs étapes de synthèse et de purification. Cependant, le développement par la société Mallinckrodt du kit de marquage Isolink[®] permettant un marquage au technétium 99m de nombreuses molécules permet une application en routine de nouveaux traceurs technétiés.

III-2) Synthèse chimique des peptides

Les peptides dérivés de HLA B2702 pour l'étude de VCAM-1 dans l'imagerie de la plaque d'athérome, et les peptides possédant le motif « RGD » pour l'étude de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont été synthétisés par l'équipe du LEDSS V (Ingénierie moléculaire- UMR CNRS 5616, Pr. Dumy, Université Joseph Fourier, Grenoble-Saint Martin d'Hères) qui collabore avec le laboratoire sur ces projets.

Les peptides sont synthétisés en phase solide sur résine. L'assemblage des peptides protégés est réalisé soit manuellement avec une technique utilisant la stratégie Fmoc/tBu

dans un flacon de réaction en verre, soit automatiquement à l'aide d'un synthétiseur (348 Ω synthesizer, Advance ChemTech). Les réactions de couplage sont réalisées en utilisant *in situ* 1,5 à 2 équivalents d'acides aminés protégés avec le N- α -Fmoc activé avec 1,5 à 2 équivalents de PyBOP et 3 à 4 équivalents de diisopropyléthylamine (DIEA) dans du diméthylformamide (DMF) (10 ml/g résine) pendant 30 minutes. Les groupes protecteurs N- α -Fmoc sont supprimés par un traitement au DMF/pipéridine (4:1) (10 ml/g de résine) pendant 10 minutes. Le processus est répété 3 fois et la suppression des groupes N- α -Fmoc est contrôlée par l'absorbance aux UV de la pipéridine à 299 nm. Les peptides linéaires synthétisés sont récupérés par clivage acide (1% TFA dans le CH₂Cl₂). Les résines sont ainsi traitées de manière répétée pendant 3 minutes jusqu'à apparition d'une coloration violette. Le liquide de lavage récupéré est concentré à basse pression et les peptides, de couleur blanche, sont récupérés sous forme solide par précipitation à l'éther puis analysés par Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse (CLHP-PI).

Le Raft (Regioselectively adressable functionalized template) est un groupe porteur (ou gabarit) cyclique contenant des sites de liaison protégés sur les deux faces opposées du cycle. Il est constitué d'un décapeptide cyclique constitué par l'enchaînement de deux séquences -Pro-Gly-Lys-Lys-Lys- et qui se présente sous forme d'une structure cyclique plane (Figure 31). La structure cyclique confère une plus grande rigidité structurale et la stabilité conformationnelle mais aussi une résistance aux enzymes protéolytiques (Garanger E. 2005). Il permet de lier un grand nombre de résidus par l'intermédiaire des fonctions amines libres des résidus lysine (K). Les chaînes latérales des six résidus lysine de la partie centrale se trouvent orientées de part et d'autre du plan du cycle. Les quatre résidus lysine encadrant les deux acides aminés -Pro-Gly- ont leur chaîne latérale qui pointe du même côté du cycle, tandis que les deux résidus lysine centraux ont leur chaîne latérale orientée vers le côté opposé (Figure 31). Deux domaines indépendants peuvent être distingués : sur une face sont liés les ligands de récepteurs ou les sites de reconnaissance des cibles et sur la face opposée sont présents les domaines «marqués» permettant la détection et la caractérisation de la liaison molécule-cible. Les systèmes de détection étudiés sont multiples : fixation de résidus biotine, de fluorescéine, de tyrosine pour une détection respectivement par chimiluminescence, fluorescence ou radioactivité (Boturn D, 2004). Le couplage entre le résidu lysine et la molécule biologique est réalisé par formation d'une liaison oxime. Sa structure moléculaire Raft chargée positivement aurait la propriété de faciliter l'internalisation de la molécule et la présentation du ligand à la cible (Boturn D. 2004).

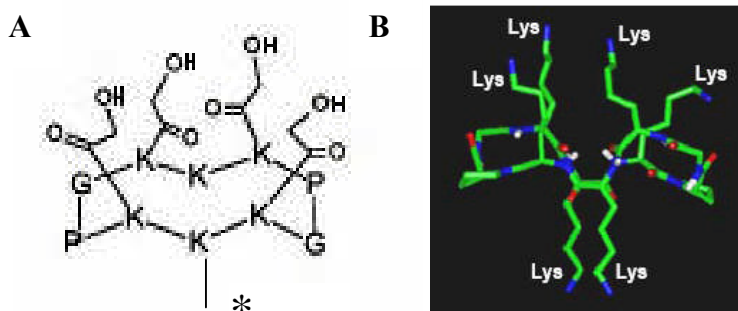


Figure 31 : Structure du gabarit Raft. A : fonctionnalisation du Raft permettant la liaison de 4 structures identiques. B : structure tridimensionnelle dans l'espace (Garanger E. 2005).

III-3) Les marqueurs de VCAM-1

Ling X. *et al.* (Ling X. 2000) ont montré que le motif constitué par les résidus 84 à 75 de HLA-B2702, B2702(84-75), ainsi que ce même motif répété, B2702(75-84/84-75), se liaient spécifiquement à VCAM-1, molécule d'adhésion surexprimée par les cellules endothéliales au niveau de la plaque d'athérome. Nous avons donc étudié les possibilités de marquer ces deux structures peptidiques ou leur dérivé, à l'iode ou au technétium 99m.

Plusieurs peptides ont été synthétisés par l'équipe du Professeur Dumy :

- Le peptide de synthèse B2702(84-75) de formule générale RENLRILARY.
- Le peptide de synthèse B2702(75-84/84-75) dimère linéaire constitué de deux résidus 75-84 mis bout à bout mais avec leur séquence inversée, de formule générale YRALIRLNER-RENLRILARY. Chacun possède au moins à une extrémité un résidu tyrosine libre (Y). Ce résidu permettra de réaliser un iodation par substitution électrophile sans modification chimique préalable de la molécule.
- Le peptide de synthèse B2702(84-75)-H de formule générale **H**GRENLRILARY. Un résidu histidine (H), ligand du synthon tricarbonyle technétié, est fixé au peptide B2702(84-75) par l'intermédiaire d'un résidu glycine (G). L'histidine fournit deux ligands à la sphère de coordination et le sixième site de coordination est donné par l'amine en α de la glycine (Figure 15).
- Le peptide de synthèse [B2702(84-75)]₄-Raft-**H**. Quatre structures B2702(84-75) sont liées à une structure polypeptidique : le Raft (Figure 32). Le radiomarquage au technétium 99m est réalisé sur le plan opposé aux 4 ligands, par l'intermédiaire d'un résidu histidine fixé sur le Raft. Une alanine remplace la deuxième lysine centrale. Le sixième site de coordination est donné par l'amine de la chaîne latérale de la lysine.

- B2702(75-84/84-75) est dénommé ATH1, son dérivé iodé B2702(75-84/84-75)- $[^{125/123}\text{I}]$ est dénommé ATH1- $[^{125/123}\text{I}]$
- B2702(84-75) est dénommé ATH2 son dérivé iodé B2702(84-75)- $[^{125/123}\text{I}]$ est dénommé ATH2- $[^{125/123}\text{I}]$
- B2702(84-75)-H est dénommé ATH3, son dérivé technétié B2702(84-75)-H- $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ est dénommé ATH3- $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$
- $[\text{B2702(84-75)}]_4\text{-Raft-H}$ est dénommé ATH4, son dérivé technétié $[\text{B2702(84-75)}]_4\text{-Raft-H-}[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ est dénommé ATH 4- $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$

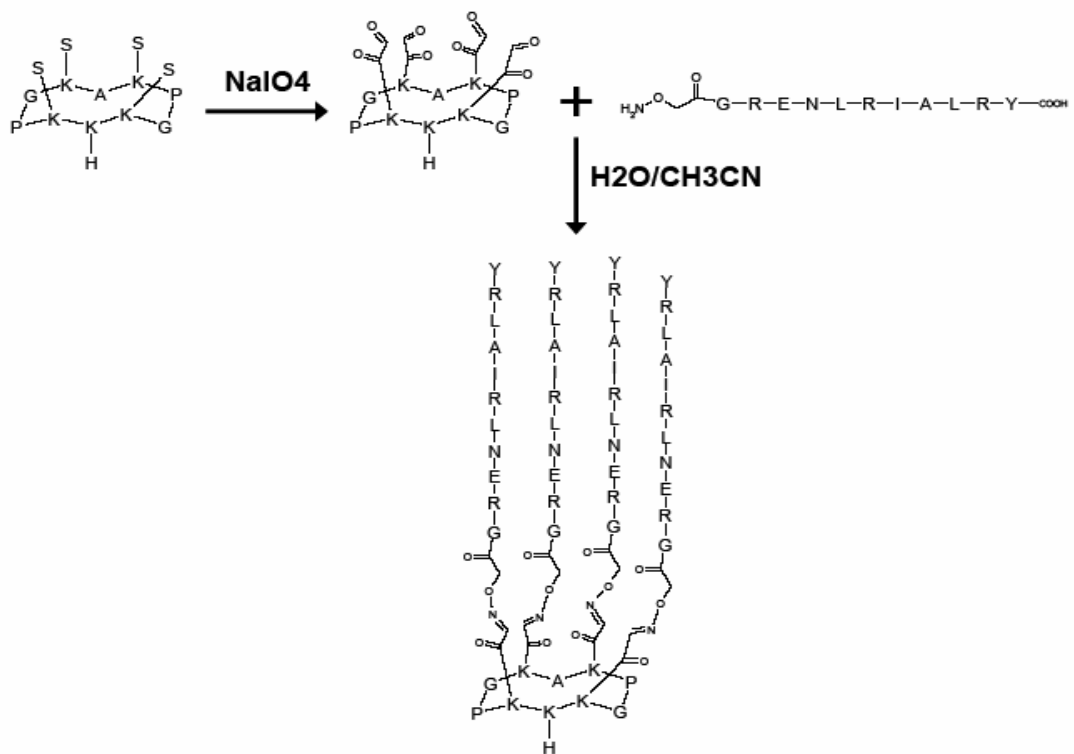


Figure 32 : Schéma de synthèse de $[\text{B2702(84-75)}]_4\text{-Raft-H}$.

III-4) Les marqueurs de $\alpha\nu\beta 3$

Différentes études ont montré que la croissance et la diffusion des cellules cancéreuses dépendent de la capacité de la tumeur à développer un réseau sanguin à partir du réseau existant (néoangiogenèse). L'étude a pour objectif d'évaluer de nouveaux peptides radiomarqués, permettant de détecter ces néovaisseaux par imagerie.

Le laboratoire LER-INSERM 0340 en collaboration avec l'équipe du LEDSS V-CNRS 5616 ont cherché à synthétiser un radioligand capable de se fixer à l'intégrine grâce au motif « RGD ». Ce ligand doit être spécifique de la néoangiogenèse et des tumeurs possédant la cible $\alpha_v\beta_3$. Le peptide synthétisé est constitué de quatre peptides pentacycliques contenant la séquence RGD : c(RGDfK), [arginine-glycine-acide aspartique-phénylalanine-lysine], fixés sur un groupe porteur Raft.

➤ Kessler *et al.* (Kessler H. 1995) ont montré que le remplacement du résidu valine par un résidu lysine dans la séquence primaire du cyclopentapeptide original c[-RGDfV-] n'entraînait pas de modification importante de l'activité biologique du ligand. D'autre part, l'introduction d'un résidu lysine dans la séquence permet d'envisager une fonctionnalisation de la chaîne latérale de ce résidu en vue de l'accrochage sur le Raft par une fonction éther oxime.

➤ La conformation cyclique des peptides mime la conformation nécessaire à leur fixation au récepteur $\alpha_v\beta_3$ mieux que les peptides linéaires qui semblent être plus spécifiques de $\alpha_{IIb}\beta_3$, récepteur plaquettaire. De même, il est essentiel que la phénylalanine suive la séquence de fixation RGD car ce résidu est responsable d'une plus grande activité et sélectivité vis à vis de $\alpha_v\beta_3$ comparé au récepteur plaquettaire (Kantlehner M. 1999).

➤ Le Raft, comme précisé précédemment, aurait la propriété de faciliter l'internalisation de la molécule, et la présence de 4 cycles augmente l'avidité du ligand pour le récepteur.

- Au niveau du gabarit Raft, sur le plan opposé aux quatre pentacycles possédant le motif « RGD », les chimistes vont fixer soit un résidu tyrosine (Y) afin de pouvoir réaliser un marquage à l'iode (Boturyn D. 2004), soit un résidu histidine (H) afin de réaliser le marquage au technétium 99m. Ces molécules sont dénommées respectivement RGD-Raft175 (Figure 33) et RGD-Raft-H.

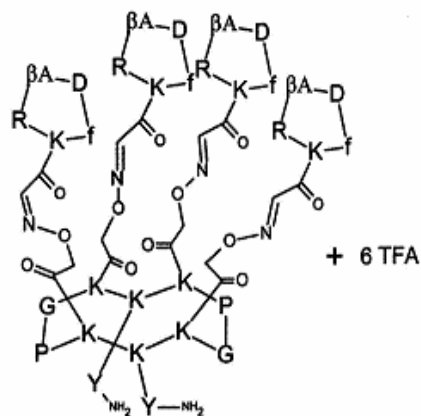
- Le peptide RGD-Raft175 est comparé à un contrôle "positif" : le RGD181 de formule c[RGDfK]Y, peptide pentacyclique développé comme ligand spécifique de $\alpha_v\beta_3$ (Dechansreiter MA. 1999, Giannis A 1997)

- Le peptide RGD-Raft175 est aussi comparé et à une molécule non spécifique : le RAD-Raft182, qui présente la même formule que le RGD-Raft175 sauf au niveau du motif cible « RGD » où la glycine a été remplacée par une β alanine c[RADfK] (Figure 33). Le remplacement de la glycine par la β alanine est connu pour abolir entièrement la

reconnaissance du peptide pour sa cible $\alpha_v\beta_3$. C'est pourquoi le RAD-Raft est utilisé comme une molécule non spécifique, contrôle négatif, dans les études de culture cellulaire et dans les études *in vivo* sur animaux (Van Hagen PM. 2000, Boturyn D. 2004). Comme précédemment, les chimistes vont fixer au niveau du gabarit Raft, sur le plan opposé aux quatre motifs « RGD », soit un résidu tyrosine, soit un résidu histidine. Ces molécules sont dénommées respectivement RAD-Raft 182 et RAD-Raft-H

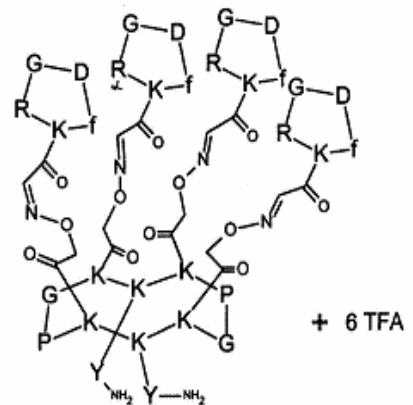
- RGD-Raft175 est appelé ANG1, son dérivé iodé RGD-Raft175-[¹²⁵I] est appelé ANG1-[¹²⁵I]
- RAD-Raft182 est appelé ANG2, son dérivé iodé RAD-Raft182-[¹²⁵I] est appelé ANG2-[¹²⁵I]
- RGD181 est appelé ANG3, son dérivé iodé RGD181-[¹²⁵I] est appelé ANG3-[¹²⁵I]
- RGD-Raft-H est appelé ANG4, son dérivé technétié RGD-Raft-H-[^{99m}Tc] est appelé ANG4-[^{99m}Tc]

- Gabarit + 4 RGD , 2 sites tyrosine



RAD-Raft 182 (ANG2)

Molecular Weight = 4318,82 + 6 x 114,02 = 5002,94
Molecular Formula = C₁₉₆H₂₈₆N₅₈O₅₄



RGD-Raft 175 (ANG1)

Molecular Weight = 4262,71 + 6 x 114,02 = 4946,83
Molecular Formula = C₁₉₂H₂₇₈N₅₈O₅₄

Figure 33 : Structure des peptides « RGD ». A gauche, le contrôle négatif ANG2 caractérisé par une structure Raft (décapeptide plan) sur laquelle sont fixées par une liaison oxime 4 structures pentacycliques contenant une β alanine et à l'opposé deux tyrosines. A droite, le RGD-Raft 175 caractérisé par une structure Raft sur laquelle sont fixés par une liaison oxime 4 pentacycles contenant le motif RGD, et à l'opposé deux tyrosines permettant le radiomarquage.

IV) LES REACTIFS ET LES PRODUITS CHIMIQUES

Tous les solvants sont obtenus auprès de Sigma Aldrich ou de Prolabo et sont de pureté chimique adaptée pour une utilisation en CLHP ou CCM.

- Acide chlorhydrique 8N (Sigma Aldrich)
- Acide trifluoroacétique
- Diméthylsulfoxyde DMSO (Sigma Aldrich)
- Chloramine-T (CAT) (Sigma Aldrich)
- Eluat de Technétium 99m : Générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ Elumatic III (Schering[®] Cis-Bio international)
- Isolink (Tyco[®] Healthcare Mallinckrodt)
- Lactopéroxydase (Merck[®]-Schuchardt)
- N-Bromosuccinimide (Merck[®]-Schuchardt)
- Monophosphate monosodique $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich)
- NaOH (Merck)
- Na I 125 (Amersham Pharmacia[®] biotech (AS 600 –700 GBq/mg))
- NaI 123 (Schering Cis-Bio international)
- Phosphate disodique $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich)
- Pyrosulfite de sodium (Fluka[®])
- Sérum de veau fœtal SVF, stérile (Eurobio[®])
- Triéthylamine phosphate (Sigma Aldrich)
- H_3PO_4 85 % (Sigma aldrich)
- HCl (Prolabo)
- Ethanol 99° (Prolabo)

V) LES ANIMAUX

Différentes espèces animales ont été utilisées au cours des expérimentations animales :

- Les études de biodistribution et de métabolisation des ligands de VCAM-1 ont été effectuées sur hamster syrien doré, chez le lapin de souche « New Zealand White » Watanabe (lapin WHHL génétiquement modifié avec mutation des récepteurs LDL) et chez le lapin « New Zealand White » sain « Contrôle ». En 1991, Cybulsky *et al*

démontrent la présence de VCAM-1 au niveau des plaques d'athérome chez le lapin Watanabe hypercholestérolémique et hyperlipidémique (WHHL), modèle qui développe spontanément des plaques d'athérome (Cybulsky M.I. 1991).

Les lapins Watanabe (WHHL, n = 10) et les lapins « Contrôle » « New Zealand White » (Contrôle, n = 9) sont originaires du Centre de Production Animale (Olivet, France). Les animaux du groupe « WHHL » sont âgés de $19,8 \pm 3,8$ mois et les animaux du groupe « Contrôle » de $18,3 \pm 1,0$ mois.

- Les études des peptides ligands de $\alpha_v\beta_3$ ont été réalisées chez la souris Balb/c, C57B1/6, et la souris nude.

Les expérimentations sur animaux ont été réalisées en conformité avec les lois sur l'expérimentation animale et après validation par le comité d'éthique du Centre de Recherche du Service de Santé des Armées de Grenoble (CRSSA).

METHODES

INTRODUCTION

Les molécules sont marquées à l'iode par substitution électrophile en « ortho » d'un résidu tyrosine en présence d'oxydant et d'iodure de sodium. Ce résidu tyrosine est naturellement présent à l'extrémité de la chaîne peptidique de B2702 (AA 75),: le marquage ne nécessite aucune modification chimique de cette molécule . Pour tous les peptides multivalents (ANG1 et ANG2) contenant plusieurs séquences de reconnaissance liées à la structure polycyclique Raft, la tyrosine est fixée au Raft, sur la face opposée aux ligands.

Le marquage au technétium 99m est réalisé par l'intermédiaire d'un petit synthon bifonctionnel capable, à une extrémité de lier le technétium, et à l'autre extrémité de lier le ligand : le synthon tricarbonyle commercialisé sous forme de kit par Mallinckrodt ; l'Isolink. Ce complexe technétié $[M(CO)_3(OH_2)_3]^+$ est un « semi-aquaion » stable, dont les molécules d'eau très réactives peuvent facilement être substituées par un ligand donneur d'électrons comme la fonction amine. La grande stabilité et la petite taille de ce cœur tricarbonyle comparées à celles des autres cœurs technétiés en font un excellent candidat pour le marquage de biomolécules de petite taille.

Toute la problématique de la thèse est commune pour les deux séries de peptide : les peptides dérivés de B2702 marqueurs de la plaque d'athérome et les peptides possédant la séquence RGD marqueurs de la neoangiogenèse tumorale.

Quatre étapes ont présidé à cette étude :

Dans une première étape, la réaction de marquage a été validée et optimisée afin d'obtenir une molécule avec une pureté radiochimique et une activité spécifique compatible avec une utilisation en imagerie, et utilisable chez l'homme. Nous avons cherché à optimiser la réaction de marquage à l'iode radioactif ou au technétium 99m.par l'étude de la teneur en réactifs et des conditions de la réaction : température, pH, volume. La stabilité du marquage dans différents solvants a été déterminée et ce afin de définir les conditions de conservation des molécules marquées avant leur administration.

Dans un deuxième temps, des expériences *in vitro* ont été réalisées afin de déterminer les caractéristiques physico-chimiques des molécules marquées et ainsi déterminer le comportement des marqueurs en milieu biologique: la solubilité, le coefficient de partage, les fixations cellulaires et protéiques dans le sang ont été étudiés.

Dans une troisième étape, des études métaboliques *in vitro* et *in vivo* ont permis d'analyser le comportement de la molécule *in vivo* et plus particulièrement la stabilité du marquage. *In vitro*, la stabilité du marquage a été étudiée en présence de milieux de culture cellulaire, de sérum de veau fœtal ou dans des échantillons sanguins. La stabilité des complexes technétiés a été testée en présence d'un agent chélateur, l'EDTA, et en présence de ligands nucléophiles, l'histidine ou la cystéine.

Le comportement de la molécule a été analysé *in vivo* sur différents modèles animaux choisis en fonction du ligand à étudier. La stabilité du marquage a été déterminée par des analyses chromatographiques du sang et des urines après administration du traceur radioactif. L'identification des métabolites résultant de la dégradation du peptide marqué n'a pas pu être réalisée en raison de l'utilisation de trace de molécule.

Enfin les études pharmacologiques par mesure de la cinétique sanguine, étude des biodistributions et imagerie scintigraphique ont permis d'analyser les modifications des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques résultant de la réaction de marquage. La cinétique et la biodistribution des peptides ont été étudiées par prélèvements d'organes et d'échantillons de sang à différents temps, ou par détection externe sur gamma-caméra. Ces études pharmacologiques ont été réalisées en concomitance avec les études métaboliques *in vivo*, chez les mêmes sujets.

Pour chacune de ces étapes, les procédures de préparation et de contrôle ont été validées.

La présentation s'articule autour de chaque thématique. Dans un premier chapitre, nous aborderons les méthodes utilisées pour l'étude des ligands de VCAM-1, puis dans un deuxième chapitre, nous aborderons les méthodes utilisées pour l'étude des ligands de $\alpha_v\beta_3$,

LES MARQUEURS DE LA PLAQUE D'ATHEROME

I PREPARATION DU TRACEUR : REACTION DE MARQUAGE

Le radiomarquage à l'iode est réalisé par substitution électrophile sur le résidu tyrosine présent naturellement dans chaque peptide ATH1 et ATH2. L'iode est oxydé soit par la méthode à la chloramine-T, par le N-Bromosuccinimide ou par le couple lactoperoxydase/ peroxyde d'hydrogène. Le marquage au technétium 99m est réalisé par l'intermédiaire d'un synthon bifonctionnel tricarbonyle qui va réagir avec une histidine terminale (ATH3 et ATH4).

I-1) Marquage à l'iode de B2702 (75-84/84-75) et B2702(84-75) (ATH1 et ATH2)

Comme spécifié précédemment, toutes les manipulations sont réalisées sous hotte plombée et ventilée en raison du risque de production de molécules d'iode radioactives et volatiles au cours des réactions d'oxydation. Le marquage s'effectue par iodation directe d'un résidu tyrosine présent à l'extrémité de chaque peptide. L'iode est apporté sous forme d'iodure de sodium NaI^{125} (Amersham Bioscience) ou NaI^{123} (I123-S1, Schering Cis bio International). L'iode est oxydé selon trois méthodes, oxydation à la chloramine-T, au N-Bromosuccinimide et au couple lactoperoxydase/ peroxyde d'hydrogène. Le réactif oxydant transforme les ions $^{123/125}\text{I}^-$ en ions iodonium $^{123/125}\text{I}^+$. Ces derniers représentent des électrophiles puissants capables par une réaction de substitution électrophile de se fixer sur un site nucléophile (site donneur d'électrons ou possédant des électrons π), comme les doubles liaisons ou un noyau aromatique, et notamment en "ortho" des résidus tyrosine du peptide. La réaction est stoppée par addition d'un agent réducteur qui inactive l'agent oxydant et réduit I^+ non substitué en I^- (Regoezci E. 1984, Bolton A.E. 1986, Apparu M. 1998, Palmer M. 1999). On obtient trois formes au cours du marquage suivant que le résidu tyrosine est monoiodé, diiodé ou non iodé.

Un résidu tyrosine est présent naturellement à l'extrémité C-terminale de la molécule HLA B2702 (acide aminé 75). De ce fait, aucune modification chimique (ajout d'un acide aminé aromatique ou d'un agent bifonctionnel) n'est nécessaire ; seule la présence d'un ou

plusieurs atomes d'iode sur le dérivé peptidique pourra être responsable des modifications des propriétés physico-chimiques et biologiques de la molécule.

Les études de B2702(74-85/85-74)-[I] (ATH1-[^{125/123}I]). ont montré une fixation non spécifique importante aussi bien lors des études analytiques (fixation sur les matériaux plastiques) que lors des expériences *in vitro* et *in vivo* chez l'animal (fixation pulmonaire). Ceci nous a conduit à tester le peptide monobrin B2702(84-75) iodé (ATH2-[¹²⁵I]). L'iodation étant réalisée sur le résidu tyrosine dont la littérature rapporte qu'il pourrait être impliqué dans la reconnaissance au récepteur, la quantité d'iode apportée devra être minimum afin d'éviter de lier deux iodures sur le cycle aromatique et diminuer autant que possible l'interaction avec le récepteur biologique.

I-1-1) Détermination des paramètres de la réaction

Les conditions de la réaction sont déterminées pour chaque peptide. Nous avons cherché à optimiser la réaction en fonction de la quantité en peptide ou en oxydant et du temps de réaction.

- Les peptides sont dilués à une concentration de 1 mg/ml en solution aqueuse.
- Le radiomarquage est réalisé par une solution d'iodure (¹²⁵I) de sodium (Amersham Bioscience ou NEN) à haute activité spécifique : entre 0,1 et 0,5 nmoles d'iode sont utilisées en fonction de l'activité demandée. Pour certaines expériences, afin de limiter l'activité en NaI¹²⁵ utilisée dans chaque essai, la solution de NaI¹²⁵ radioactive est diluée dans une solution de NaI¹²⁷ "froide" à la même concentration.
- Différentes méthodes d'analyse ont été testées afin de déterminer la pureté radiochimique des molécules ou de purifier la molécule marquée : chromatographie couche mince, chromatographie sur colonne C18, chromatographie par perméation sur gel, et chromatographie liquide haute performance. La pureté radiochimique est déterminée par CCM sur plaque de silice phase inverse RP654 Merck après dépôt d'une aliquote de 2 µl de solution. ATH2-[I] et ATH1-[I] sont élués par un mélange acétonitrile/eau (65/35) pour lequel une légère migration du peptide a été observée. L'iode libre (¹²⁵I) migre au front du solvant (Rf = 1) tandis que le peptide marqué reste à proximité du point de dépôt (Rf = 0,2-0,25).

I-1-1-1) Marquage à la chloramine-T

La méthode d'iodation par la chloramine-T est la méthode de référence du laboratoire. Dans un premier temps nous avons déterminé la quantité minimum de molécule froide susceptible d'être marquée par 250 pmoles d'iode radioactif et ce avec un rendement de marquage supérieur à 95%, puis nous avons défini la quantité minimum de chloramine-T à ajouter à la solution pour obtenir le meilleur rendement de marquage sachant que son pouvoir oxydant est susceptible de dégrader le peptide.

Les préparations d'une solution oxydante de chloramine-T à 1 mg/ml et d'une solution réductrice de sodium pyrosulfite à 4 mg/ml, en solution aqueuse, sont extemporanées.

- Concentration en peptide

- 400 µg, 100 µg, 10 µg et 1 µg de peptide ATH1 (soit 136, 34, 3,4 et 0,34 nmoles) sont marqués par une solution d'iodure de sodium (Na^{125}I 18,5 MBq) en présence de 10 µl de solution de chloramine-T à 1 mg/ml (44 nmoles). La réaction d'oxydation est arrêtée après 15 minutes par ajout de 20 µl de pyrosulfite de sodium à 4 mg/ml (460 nmoles).

La concentration en chloramine-T étant apparemment en excès, nous décidons de la diminuer lors des expériences suivantes.

- 50 µg, 25 µg, 10 µg et 5 µg de ATH 2 (soit environ 27, 13,5, 6,7 et 3,4 nmoles) sont marqués par une solution d'iodure de sodium (Na^{125}I 18,5 MBq) en présence de 22 nmoles de chloramine-T. La réaction d'oxydation est arrêtée après 15 minutes par ajout de 460 nmoles de pyrosulfite de sodium.

- La pureté radiochimique de chaque échantillon est déterminée par CCM sur plaque de silice RP654 Merck 20 cm avec un éluant acétonitrile/ eau (65/35).

- Chloramine-T et temps de réaction

La concentration en chloramine-T doit être aussi faible que possible afin de limiter le risque de dénaturation.

- 10 µg de peptide ATH1 (3,4 nmoles) sont marqués par 250 pmoles d'iode ^{125}I en présence de quantités croissantes de chloramine-T : 2,2 ; 4,4 ; 6,6 ; 8,8 ; 11 et 22 nmoles pendant un temps de réaction de 5, 15 et 20 minutes.

- 10 µg de peptide ATH2 (6,7 nmoles) sont marqués par 250 pmoles d'iode 125 en présence de 2,2 ; 4,4 ; 6,6 ; 8,8 ; 11 et 22 nmoles de chloramine-T pendant 5 et 15 minutes.
- La pureté radiochimique de chaque échantillon est déterminée par CCM sur plaque de silice RP654 Merck 20 cm avec un éluant acétonitrile/ eau (65/35).

I-1-1-2) Marquage au N-Bromosuccinimide et à la lactoperoxydase

Les conditions de la réaction de marquage à la chloramine-T déterminées, la méthode d'oxydation par la lactoperoxydase et le N-Bromosuccinimide est analysée pour une quantité de protéine et un temps de réaction identiques à ceux déterminés par la méthode de référence. Seule l'influence de la concentration en réactif oxydant sur le rendement de marquage a été étudiée.

- Marquage au N-Bromosuccinimide (NBS)

La méthode de marquage est identique à la méthode par la chloramine-T. La solution de chloramine-T est remplacée par une solution de NBS à 0,1 mg/ml moins dénaturante (Glaser M., 2001).

- 10 µg de peptide ATH1 (3,4 nmoles) ou ATH2 (6,7 nmoles) sont mis en contact avec une solution de Na¹²⁵I eq. 18,5 MBq (250 pmoles d'iode), et en présence d'une solution de NBS de concentrations croissantes de 1 à 5 µg (soit de 5,6 à 28 nmoles). La réaction d'oxydation est stoppée après 10 minutes d'incubation par l'ajout de 20 µl d'agent réducteur : pyrosulfite de sodium 4 mg/ml (460 nmoles). Une aliquote de chaque échantillon est prélevée et analysée par CCM.

- Marquage à la lactoperoxydase-peroxyde d'hydrogène

La chloramine-T, oxydant fort, peut entraîner une altération de la structure protéique généralement par oxydation des liaisons thiols des dérivés cystéine. C'est pourquoi, certains auteurs préfèrent utiliser la méthode d'oxydation par la lactoperoxydase, moins dénaturante. La lactoperoxydase est une enzyme héminique. En présence de H₂O₂, l'hème est oxydé à l'état [FeV] et perd deux électrons. Le résidu tyrosine est activé et donne un dérivé radicalaire donneur d'électrons. NaI oxydé par H₂O₂, donne I₂ et I⁻ se fixe sur la tyrosine. Cependant, une petite proportion de lactoperoxydase peut être radioiodée et il

peut être difficile de la séparer de la protéine si leur poids moléculaire est voisin. En augmentant le rapport protéine / lactoperoxydase, on réduit la proportion d'iode qui se fixe sur l'enzyme (Glaser M. 2001, Marchalonis J. 1969, Palmer M. 1999).

Le choix des concentrations de lactoperoxydase et de H₂O₂ est déterminé à partir des méthodes de marquage préconisées par Marchalonis J. et Palmer M. (Marchalonis J. 1969, Palmer M. 1999) : de 0,4 à 4 µg de lactoperoxydase (5 pmoles à 50 pmoles) pour 0,2 à 6 µg de H₂O₂ (5,2 nmoles à 160 nmoles).

- Immédiatement avant le marquage, on prépare une solution de lactoperoxydase à 20 µg/ml dans du tampon phosphate, une solution de peroxyde d'hydrogène 30 % (H₂O₂) à 0,1% dans de l'eau distillée, et la solution de peptide à 1 mg/ml en solution aqueuse. A 10 µg de peptide B2702 (75-84/84-75), on ajoute 5 µl de solution de Na I¹²⁵ (eq.18,5 MBq) puis la lactoperoxydase. La réaction d'oxydation est démarrée par l'ajout de H₂O₂.

- 3 expériences sont réalisées :

- A 0,4 µg (5 pmoles) de lactoperoxydase on ajoute 2, 3, ou 6 µg (53, 80, 160 nmoles) de H₂O₂.
- A 1, 2, 3, 4 µg (12,5, 25, 37,5, 50 pmoles) de lactoperoxydase, on ajoute 6 µg (160 nmoles) de H₂O₂.
- A 2 µg (25 pmoles) de lactoperoxydase, on ajoute 0,2 µg (5,2 nmoles) de H₂O₂.

- La solution est incubée 10 minutes à température ambiante, puis la réaction est stoppée par l'ajout d'un réducteur. Une aliquote de chaque échantillon est prélevée et analysée par CCM.

I-1-2) Etude des produits de la réaction : analyse CLHP

Les produits de la réaction sont recherchés par chromatographie liquide haute performance. Afin de permettre une détection UV, le marquage est réalisé avec une quantité importante de peptide et d'iode froid. 1,4 µmoles de peptide B2702(84-75/75-84) ont été marquées avec une solution de NaI (1 µmole) froide en présence de chloramine-T. A 1 minute, 20 minutes et 60 minutes d'incubation, un échantillon de solution est prélevé. Sur cet échantillon, la réaction d'oxydation est stoppée par l'ajout de pyrosulfite de sodium (20 µmoles). 10 µl sont prélevés et analysés. L'analyse est réalisée par chromatographie phase inverse sur colonne nucleosil® C18, 30 x 4,6 mm, particule 3 µm, détection UV 214

nm, débit 1,3 ml/mn et élution par un gradient de concentration 90% acétonitrile-10% eau - TFA 0,1% (A) / eau-TFA 0,1% (B), de 5 à 60 % de solution A en 15 minutes. Dans un deuxième temps, les constituants sont élués sur colonne séparative afin de les analyser par spectrométrie de masse.

I-1-3) Etude de stabilité dans les solvants

Nous avons notamment étudié la stabilité des traceurs dans les solvants afin de déterminer les conditions de leur conservation au cours du temps.

- La pureté radiochimique des peptides ATH1-[¹²⁵I] et ATH2-[¹²⁵I] est déterminée après incubation du peptide radiomarké dans différents milieux : eau purifiée, NaCl 0,9% et tampon phosphate pH 7,4 (PBS). Elle est définie par CCM sur des échantillons conservés à température ambiante, 1h, 2h, 4h, 6h, 24h, 48h et 72 heures après marquage.
- La pureté radiochimique des peptides est déterminée après incubation du peptide radiomarké dans NaCl 0,9% à 37°C pendant 3 heures.
- La stabilité de ATH2-[¹²⁵I] est étudiée dans le milieu de culture RPMI à 1, 2, 16 et 24 heures d'incubation.

I-2) Marquage au technétium de B2702(84-75)-H et [(B2702(84-75)]₄-Raft-H (ATH3 et ATH4).

Le technétium 99m est l'isotope de référence en médecine nucléaire de par sa facilité d'obtention et son coût de production. Le choix de tester un marquage au technétium 99m s'est imposé. Plusieurs petits synthons existent et permettent un marquage de petites protéines HYNIC, MAG3 (Chapitre Introduction III-4-2). Nous avons choisi d'étudier le marquage avec un petit synthon en cours de commercialisation sous forme de kit par la société Mallinckrodt : le semi aquaion tricarbonyle commercialisé sous le nom d'Isolink[®]. L'Isolink[®] est une trousse constituée d'un mélange de sodium boranocarbonate (Na₂ BH₃CO₂ ; 4,5 mg), sodium carbonate (7,15 mg), sodium tetraborate (2,85 mg) et sodium tartrate (8,5 mg).

Le marquage réalisé, nous avons étudié la stabilité des complexes formés ainsi que leur biodistribution *in vivo* chez le petit animal. Ces études ont été réalisées au LER INSERM E0340.

La réaction de marquage au technétium fait intervenir différents réactifs :

- Une solution saline de pertechnétate de sodium fraîchement éluée de 2200 et 3700 MBq (60 mCi et 100 mCi) pour un volume de 1 ml. L'éluat est un éluat frais de moins de 2 heures et la dernière élution date de moins de 24 heures (Générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ Elumatic III, Cis Bio international).
- L'isolink[®]
- Une solution aqueuse du ligand
- Une solution d'acide chlorhydrique HCl 2N.

Le marquage est réalisé en 2 étapes :

- Dans la première étape, on ajoute au kit de marquage 2200 et 3700 MBq (60 à 100 mCi) d'un éluat de technétium 99m. Le volume de l'éluat est de 1 ml. La solution est chauffée pendant 20 minutes à 100°C dans un bloc chauffant. On forme le synthon $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ stable. La solution très basique est neutralisée à pH 7-8 par une solution d'acide chlorhydrique 2N (80 µl).
- Dans une deuxième étape, on ajoute le ligand peptidique. Il se produit une réaction d'échange de ligands : il y a substitution entre les molécules d'eau du synthon et les atomes donneurs (azote) du vecteur.

Les conditions de réaction, temps, température, pH, activité volumique, et concentration volumique, doivent être déterminées pour chaque molécule.

La pureté radiochimique est déterminée par CCM sur plaque de silice greffée (CCM RP18F₂₅₄ Merck) d'une aliquote de 2 µl de solution. Plusieurs éluants ont été testés avec un temps d'élution de 20 minutes. En présence de NaCl 0,9 %, le pertechnétate de sodium migre avec le front du solvant, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ et le peptide technétié restent au point de dépôt. En présence d'un mélange acétonitrile/eau (80/20), $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ présente un Rf de 0,8, le pertechnétate un Rf de 0,2-0,4 et le ligand un Rf de 0,1.

L'analyse CLHP des complexes technétiés a été testée avec comme éluant un gradient de concentration triéthylamine phosphate 0,05M (TEAP) /méthanol, éluant préconisé par l'industriel pour séparer le pertechnétate de sodium de l'aquaion tricarbonyle technétié $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$. Nous avons ensuite réalisé une séparation par CLHP avec un gradient de concentration acétonitrile/eau afin de pouvoir isoler le peptide. Soit A un mélange acétonitrile/eau (acétonitrile-TFA 0,1% / eau-TFA 0,1% (90/10)) et B une

solution aqueuse (eau-TFA 0,1%). Les molécules sont éluées par un gradient de concentration : de 0 à 5 mn 20 % de A, de 5 à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% A, et de 30 à 35 mn de 60 à 20 % de A. La colonne est une colonne Lychrosorb C18, 5 µm, 20 cm. Le débit d'élution est de 1 ml/mn. L'analyse des temps de sortie donne pour le pertechnétate ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) un pic de sortie à 5 minutes, $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ un pic à 7 minutes et pour le peptide B2702(74-85)-H- $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ un pic à 20 minutes. La même expérience a été réalisée avec un gradient d'élution de 20 à 80 % de B et les temps de sortie des composants sont voisins.

I-2-1) Optimisation de la réaction de marquage

Deux ligands ont été synthétisés par l'équipe du Pr Dumy au LEDSS V : le peptide B2702(84-75)-H (ATH3) correspondant au peptide B2702(84-75) sur lequel une histidine a été fixée et le peptide $[(\text{B2702}(84-75))_4\text{-Raft-H}]$ (ATH4) où quatre sites actifs et une histidine sont fixés au gabarit Raft. Différents paramètres de la réaction de marquage ont été analysés afin de produire un peptide marqué avec une haute activité spécifique et une pureté radiochimique supérieure à 95% :

- Température d'incubation
- Temps d'incubation
- pH du solvant
- Concentration peptidique

I-2-1-1) Optimisation de la réaction de marquage de B2702(84-75)-H (ATH3).

L'équipe du Pr Dumy a synthétisé un peptide de formule générale HGRENLRILARY. A l'extrémité N-terminale du dérivé B2702(84-75), une glycine (G) et une histidine (H) sont ajoutées. Ce peptide B2702(84-75)-H est dénommé ATH3. Le peptide radiomarké au technétium 99m par l'intermédiaire du synthon tricarbonyle B2702(84-75)-H- $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ est dénommé ATH3- $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$.

- **Influence du temps de réaction et de la température**

Les radiopharmaceutiques utilisés en médecine nucléaire ayant une durée de vie généralement courte, le temps de réaction est un facteur critique. Il est nécessaire

d'atteindre une PRC maximale pendant un temps court, ce qui implique d'accélérer la réaction notamment en travaillant à haute température. La transchélation entre le ligand et les molécules d'eau du complexe tricarbonyle peut être réalisée à température ambiante mais la cinétique de réaction est lente.

Dans un premier temps nous avons testé la stabilité du « peptide froid » à la chaleur par CLHP. 100 µg de peptide dilués dans 100 µl d'eau purifiée sont incubés à 60°C, 100°C, et 150°C au bloc chauffant, en milieu fermé, pendant 15 minutes, 30 minutes et 45 minutes. Chaque échantillon est ensuite analysé par CLHP selon la méthode décrite précédemment avec un gradient de 20 à 60% de solution B et une détection UV à 210 nm. Les résultats montrent que la molécule est stable jusqu'à 150°C pendant 45 minutes. Aucun pic de dégradation n'a été observé. Le peptide froid sort à un temps de 7 minutes.

- 100 µg de peptide (\cong 66 nmoles) sont mis en présence d'une solution de $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ à 370 MBq (300 µl) tamponnée à pH 7-8. Le mélange est incubé pendant au maximum 6 heures à 25°C, 60°C, 80°C et 100°C. Des prélèvements sont effectués à 15 minutes, 30 minutes, 60 minutes puis, si une pureté radiochimique minimum de 90% n'est pas atteinte, toutes les heures pendant 6 heures. Les aliquotes sont analysées immédiatement par CCM et CLHP.

Les analyses CCM sont réalisées sur plaque de silice RP18F₂₅₄ avec comme solvant d'élution une solution de NaCl 0,9% et une solution acétonitrile / eau (80/20). L'analyse CLHP est réalisée sur colonne C18, 20 cm avec un gradient acétonitrile/eau (A mélange acétonitrile-TFA 0,1% / eau-TFA 0,1% (90/10), B mélange eau-TFA 0,1%), gradient de concentration de 0 à 5 mn 20 % de A, de 5 à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% de A, et un débit de 1 ml /mn.

- Influence de la concentration : mesure de l'activité spécifique

On réalise le radiomarquage de 25, 50, 100 µg de peptide ATH3 (environ 16 nmoles, 33 nmoles, 66 nmoles) par 740 MBq de $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$. Le mélange est incubé au bloc chauffant à 80°C pendant 20 minutes. Une deuxième expérience est réalisée en incubant les mêmes concentrations de peptide en présence de 1500 MBq de $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$.

- Influence du pH

Après avoir défini les conditions de température et la durée de la réaction, on étudie l'influence du pH sur le rendement de marquage. Le cœur technétié est produit en solution à pH très basique : pH 11. Le maintien de la solution à pH 11 est indispensable à sa stabilité. Cependant, certaines protéines précipitent à pH basique et il est donc recommandé de neutraliser la solution avant marquage. Cette neutralisation est réalisée par une solution d'HCl.

La réaction de marquage est réalisée en solution tampon phosphate de pH croissant de pH 4 à pH 9. Les impuretés sont déterminées par CCM sur plaque de silice RP18F₂₅₄ et par CLHP.

- Influence du solvant sur la préparation de ATH3-[^{99m}Tc]

La réaction de marquage est réalisée après solubilisation de 50 µg de peptide dans 50 µL de solution tampon PBS pH 7,4, de solution aqueuse, ou de NaCl 0,9%. Trois réactions de marquage sont réalisées sur chaque échantillon, en utilisant la même solution de tricarbonyle technétié tamponnée à pH 8.

I-2-1-2) Optimisation de la réaction de marquage de [B2702(84-75)]₄-Raft-H (ATH4)

Quatre résidus B2702(84-75) sont liés à une structure polypeptidique Raft. Le radiomarquage au technétium est réalisé sur le plan opposé aux 4 ligands, par l'intermédiaire d'un résidu histidine fixé sur le Raft.

ATH4-[^{99m}Tc] est un polypeptide peu soluble dans l'eau. Une dilution dans de l'eau purifiée à 300 µg/ml est nécessaire pour obtenir un soluté limpide.

- Influence du temps de réaction et de la température

Dans un premier temps, la stabilité du peptide ATH4 à la chaleur est analysée par CLHP, certains peptides se dégradant lorsqu'ils sont incubés à 100°C.

- 50 µg de peptide solubilisés dans 165 µl d'eau distillée sont incubés pendant 1 heure à 60°C, 80°C, 100°C, et 150°C. Les aliquotes sont analysées par CLHP avec détection UV.

Après avoir défini la température maximum du milieu réactionnel et sachant que le rendement de marquage croît avec la température d'incubation, l'optimisation de la réaction de marquage est étudiée.

- 50 µg de peptide (dilution à 300µg/ml) sont mis en présence d'une solution de $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ à 370 MBq (200 µl) tamponnée à pH8. Le mélange est incubé pendant 1 heure à 80°C (n=3). Des prélèvements sont effectués à 5 mn, 30 mn et 60 mn. Les aliquotes sont analysées immédiatement.

- 50 µg de peptide (dilution à 300µg/ml) sont ajoutés à 370 MBq de solution d'Isolink technétée. Le mélange est incubé à 80 °C pendant 15 ou 30 minutes au bloc chauffant, en flacon fermé et serti, sous un volume total de 150 µl. La préparation est laissée à température ambiante et analysée à T0, T30 et T60 minutes après l'étape de chauffage.

La pureté radiochimique est mesurée par deux CCM sur plaque de silice C18 avec comme premier solvant d'élution NaCl 0,9% et comme deuxième éluant un mélange acétonitrile/eau (80/20), et par CLHP avec détection UV et radioactive.

- Influence du solvant sur ATH4- $[^{99m}\text{Tc}]$

- La réaction de marquage est réalisée après dilution du peptide soit dans une solution de PBS pH 7,4 à 1 mg/ml, soit dans une solution d'eau purifiée à 1 mg/ml.

-

I-2-2) Conditions de conservation

La stabilité de la préparation radiomarquée est déterminée au cours du temps. La solution est conservée à température ambiante pendant 6 heures. La pureté radiochimique est déterminée par CCM et CLHP d'une aliquote de solution à 1, 2, 3, 4 et 6 heures d'incubation.

ID PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PEPTIDES MARQUES : ANALYSE IN VITRO

Après avoir optimisé la réaction de marquage afin d'obtenir une molécule marquée avec un bon rendement de marquage, une pureté radiochimique supérieure à 90% et une

activité spécifique suffisante, différentes analyses ont été effectuées afin de déterminer le comportement de la molécule *in vitro* dans différents milieux et de prévoir la stabilité du marquage *in vivo*. Nous avons notamment étudié la lipophilie des traceurs, par mesure de leur coefficient de partage en milieu octanol/eau, ainsi que la répartition sanguine des traceurs par mesure de la fixation aux éléments figurés du sang et aux protéines plasmatiques.

II-1) Mesure du pKi de B2702 (75-84/84-75)-[¹²⁵I] (ATH1-[¹²⁵I])

La détermination du PKi de ATH1 est réalisée par électrophorèse sur Phastgel (Pharmacia) sous un courant de 200 volts et 50 mA à 15°C. Le peptide est ensuite transféré sur filtre millipore par un système de transfert PVDS Millipore Immobiligen-P.

II-2) Mesure du coefficient de partage

Le n-octanol simule les membranes biologiques. La mesure de la lipophilie d'une molécule, par détermination du coefficient de partage $\log P_{o/w}$, permet d'évaluer le coefficient de partition de la molécule entre les milieux biologiques aqueux et lipidiques, la biodistribution dans les tissus, et la liaison de la molécule avec le site récepteur ou les protéines plasmatiques.

▪ La lipophilie de chaque radioligand est déterminée par mesure du coefficient de partage de la molécule marquée entre une solution aqueuse (tampon phosphate sodique) à pH 7,4 et une solution organique (solution d'octanol) équilibrée à pH 7,4. La radioactivité de chaque échantillon est mesurée sur le compteur gamma Cobra. 100 µl de solution de molécule marquée avec une activité comprise entre 185 KBq et 370 KBq sont ajoutés à 1 ml d'une solution tampon phosphate-octanol 50/50. L'échantillon est vortexé 1 minute, centrifugé pendant 10 minutes, puis décanté. Une aliquote de 100 µl de chaque phase est recueillie et mesurée au compteur gamma. Sur chaque aliquote, nous réalisons, de nouveau, une mesure du coefficient de partage.

Nous avons ensuite étudié l'influence du pH du milieu sur la lipophilie. Le coefficient de partage est mesuré en présence de solutions tampon phosphate de pH croissant de pH4 à pH8 (pH4 ; pH 6,2 ; pH 6,8 ; pH 7 ; pH 7,2 ; pH 7,6 ; et pH 8), et d'une solution d'octanol à pH 7,4. Cette expérience est réalisée pour les deux peptides ATH1-[¹²⁵I] et ATH2-[¹²⁵I].

II-3) Détermination de la répartition sanguine des traceurs

II-3-1) Mesure de la fixation cellulaire

L'étude de la fixation du radioligand aux cellules sanguines est réalisée, après centrifugation d'un échantillon de sang, par mesure de la répartition de la radioactivité entre le culot cellulaire et le sérum. Elle détermine s'il existe une fixation non spécifique du traceur soit à la surface des cellules soit dans les cellules (polynucléaires, plaquettes, hématies) après passage transmembranaire. Le radioligand est incubé à 37°C pendant 30 minutes en présence de sang total. Le sang est centrifugé à 2000 T/mn pendant 15 minutes, puis le culot cellulaire et le surnageant sont comptés au compteur gamma.

II-3-2) Mesure de la fixation non spécifique aux protéines plasmatiques

Différentes méthodes ont permis d'explorer la fixation non spécifique des traceurs aux protéines plasmatiques :

- Précipitation à l'acide trichloracétique 10 % (TCA 10 %)
- Ultrafiltration
- Electrophorèse : cette dernière méthode permet de s'affranchir du risque de précipitation de nos traceurs en présence de TCA.

II-3-2-1) Précipitation à l'acide trichloracétique

L'acide trichloracétique entraîne une précipitation des protéines plasmatiques. Après centrifugation du sang à 1500 g pendant 10 minutes, le culot contenant les cellules sanguines est séparé du surnageant (plasma). Une solution de TCA 10% est ajoutée au plasma jusqu'à apparition d'un précipité blanc constitué des protéines plasmatiques auxquelles s'est potentiellement fixée notre molécule marquée. Le culot est séparé du surnageant et chaque milieu est compté au compteur gamma.

- 100 µg de peptide marqué sont incubés dans un échantillon de 1 ml de sang, à 37 °C sous agitation. Après 30 minutes, 1 heure, 2 heures, et 3 heures d'incubation, 200 µl de sang sont prélevés et centrifugés à 2000 T/mn pendant 15 minutes. Le sérum est recueilli

dans un tube à essai auquel on ajoute 60 µl de solution TCA 10 %. Le mélange est centrifugé à 1500 g pendant 10 minutes. Les tubes de cellules sanguines, plasma et précipité protéique sont comptés au compteur gamma. Le plasma est analysé par CLHP.

II-3-2-2) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'interaction albumine-peptide a été étudiée par électrophorèse sur gel de gradient de polyacrylamide (4%-20%) en présence de sérum albumine bovine (BSA).

- Le gel est préparé par addition dans la cuve d'électrophorèse de deux solutions : une solution à 4% d'acrylamide dans une solution d'HEPES 50mM pH 7,5 et une solution à 20% d'acrylamide dans une solution d'HEPES 50mM pH 7,5. Dans chacune d'elles, 25 µl d'APS 20% et 5 µl de TEMED pour 10 ml de gel ont préalablement été ajoutés.

Les échantillons de peptides sont dilués dans une solution d'HEPES 1M / NP40-2% à laquelle on ajoute du chlorure de potassium (50mM). On réalise l'électrophorèse d'une solution de BSA 2 %, du peptide précédemment radiomarké, et d'un mélange peptide/BSA avec une concentration croissante de BSA par puits : 1 µg, 10 µg, et 100 µg.

Un témoin de migration est déposé dans un puits ; il est constitué d'une solution de glycérol à 50% dans laquelle on a ajouté une faible quantité de bleu de bromophénol et de xylène. La migration est réalisée par une solution de migration HEPES 20 mM sous un courant de 4 Watts/gel.

Après migration, le gel est séché puis placé sur un film d'autoradiographie pour phospho-imager. Le temps de contact est de 12 heures pour l'iode 125 et de 1 heure pour le technétium 99m..

II-4) Mesure de l'affinité aux récepteurs

Nous avons essayé de déterminer l'affinité du ligand ATH2-[¹²⁵I] pour son récepteur en observant s'il existe ou non une différence de migration en électrophorèse entre le peptide iodé seul et un mélange peptide iodé-VCAM-1. Une électrophorèse d'affinité sur gel retard (gel de gradient de polyacrylamide 4%-20%) est réalisée selon la même méthode que précédemment.

- Les échantillons de peptides sont dilués dans une solution d'HEPES 1M / NP40-2% à laquelle on ajoute du chlorure de potassium (50mM). 20 ng de peptide (soit 13

pmoles) avec une activité de 37 KBq sont incubés en présence de 1 µg de VCAM-1 (soit 13 pmoles) avec ou sans sérum albumine bovine (BSA).

- La migration est réalisée par une solution de migration HEPES 20 mM sous un courant de 4 Watts/gel. Après migration, le gel est séché puis placé sur un film d'autoradiographie pour phospho-imager. Le temps de contact est de 12 heures pour l'iode 125.

III ETUDES METABOLIQUES

III-1) Etudes métaboliques *in vitro*

La mesure de la pureté radiochimique du radioligand, après incubation dans un échantillon de sang ou en présence d'un composant biologique, permet d'apprécier la désiodation ou la décomplexation du traceur en fonction du temps et d'évaluer si, *in vivo*, la radioactivité détectée correspond au traceur ou à l'isotope libre.

III-1-1) Etude de la stabilité sanguine de ATH2-[¹²⁵I] *in vitro*

- Le radiotracer ATH2-[¹²⁵I] est incubé en présence de 1 millilitre de sang total, à 37°C sous agitation. Après 5, 15, 30 minutes et 3 heures d'incubation, 250 µl d'échantillon de sang sont prélevés et centrifugés. Le surnageant est recueilli, filtré sur filtre Nanosep 10K et analysé par CLHP sur colonne C18 Bondapak ; gradient (acétonitile-TFA 0,1%)/(H₂O-TFA 0,1 %) (90/10) (A)/ H₂O-TFA 0,1 % (B) : de 0 à 5 mn 20 % de A, de 5 à 20 mn de 20 à 60 % de A, de 20 à 30 mn 60% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité. En sortie de colonne, l'éluat est recueilli par fractions de 0,7 ml dans des tubes à hémolyse. L'activité en cpm de ces derniers est mesurée au compteur gamma.

III-1-2) Etude de la stabilité sanguine des complexes B2702(84-75)-H-[^{99m}Tc] (ATH3-[^{99m}Tc]) et [B2702(84-75)]₄-Raft-H-[^{99m}Tc] (ATH4-[^{99m}Tc])

La stabilité des peptides radiomarqués est déterminée après incubation de la préparation en présence de sang total sur une durée de 24 heures (n=2).

- 2500 MBq de ^{99m}Tc (Elumatic III[®]) sont ajoutés à un flacon d'Isolink[®]. La solution est chauffée au bloc chauffant 20 minutes à 100°C puis neutralisée par 80 µl de solution HCl 2N. Le pH de la solution est compris entre 8 et 9.

- 50 µg de peptide ATH3 et ATH4 sont radiomarqués par 370 MBq de l'intermédiaire technétié. La préparation de ATH3- ^{99m}Tc est incubée à 80°C pendant 20 minutes. La préparation de ATH4- ^{99m}Tc est diluée, incubée à 60°C pendant 20 minutes puis laissée à température ambiante pendant 20 minutes. La pureté radiochimique est contrôlée par chromatographie couche mince (PRC > 95 %).

- Pour chaque peptide, des solutions à 10 µg/ 74MBq. Chaque échantillon est dilué dans un millilitre de sang total prélevé extemporanément sur tube hépariné. Le mélange est incubé à 37°C au bain-marie, sous agitation, pendant 3 heures. Après 1 heure et 3 heures d'incubation, une aliquote de sang est prélevée et centrifugée.

- Le sérum est analysé par CLHP sur colonne C18, gradient (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1 %) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) : de 0 à 5 minutes 20 % de A, de 5 à 20 minutes de 20% à 60 % de A, de 20 à 30 minutes 60% de A, débit de 0,7 ml/mn, détection UV 210 nm et détection de la radioactivité. Le filtrat est recueilli dans des tubes par fractions de 0,7 ml et mesuré au compteur gamma.

III-1-3) Evaluation de la transchélation du complexe B2702(84-75)-H- ^{99m}Tc (ATH3- ^{99m}Tc)

L'étude de la stabilité des complexes *in vivo* et *in vitro* est un critère essentiel dans la mise au point d'un radiopharmaceutique. Le traceur ne doit pas être métabolisé ni subir de transchélation du métal par les protéines biologiques présentes dans l'organisme, notamment par la cystéine, pendant le temps nécessaire à sa distribution jusqu'à sa cible. Dans le cas contraire on suit par scintigraphie le technétium libre et les métabolites technétiés ce qui entraîne une irradiation inutile du patient et surtout une erreur d'interprétation des images.

Différentes méthodes ont été utilisées dans la littérature afin d'étudier la stabilité des complexes *in vitro*. De manière générale, on additionne le complexe à différentes solutions contenant des composés susceptibles de le métaboliser. Des solutions de cystéine (Bolzati C. 2003, Zhu Z. 2001), de glutathion (Bolzati C.2003, Heimbold I.2002) et de sérum humain (Zhu Z. 2001, Zhang J. 2002) ont notamment été utilisées.

L'histidine est l'acide aminé qui présente la meilleure affinité pour le synthon tricarbonyl technétium du fait de la présence de ses atomes d'azote (dont un azote cyclique qui stabilise la structure), et qui sont susceptibles de s'échanger avec les molécules d'eau du synthon (Waibel R 1999). La cystéine présente une excellente affinité pour le technétium de par la présence de son groupement thiol ; elle est présente dans l'organisme sous forme d'acide aminé libre ou incorporée aux protéines. L'EDTA est un excellent chélateur du technétium 99m . Le sérum présente des enzymes et des protéines susceptibles de métaboliser le ligand peptidique.

Le marquage des ligands est suivi d'une étape de purification sur Sep-pak C18[®] (Waters corporation). La colonne est conditionnée par 2 ml d'éthanol puis 2 ml d'eau. La solution de marquage est ajoutée en tête de colonne et éluée par 2 ml de NaCl 0,9%, et on recueille le pertechnétate de sodium. Le ligand est ensuite élué par un mélange éthanol 99°/ HCl 2N (80/20).

La solution purifiée est mise en compétition avec une solution de cystéine, d'histidine en excès ou une solution d'EDTA fraîchement préparée et en excès. La stabilité de la solution est analysée en présence de sérum albumine humaine et en présence de sérum de souris. Chaque mélange est incubé à 37°C en bain-marie sous agitation afin de se rapprocher des conditions biologiques. L'analyse du complexe ATH3- 99m Tc] est réalisée après 30 minutes d'incubation. Les réactions de transchélation du complexe ATH4- 99m Tc] en présence de ligands donneurs ou d'agents chélatants en excès n'ont pas encore été réalisées à ce jour.

III-1-3-1) Stabilité du complexe dans l'EDTA

- 100 µg de peptide sont radiomarqués par 740 MBq de solution d'Isolink[®]-technétium dans un volume de 1ml.
- A une aliquote de 10 µl (1 µg de peptide) et de 100 µl (10 µg de peptide), est ajouté 1 ml de solution d'EDTA 2,5 M ou 2,5 µM (n=2). Le volume de chaque mélange est ajusté à 1100 µl.
- Chaque aliquote est incubée à 37°C au bain-marie sous agitation pendant 30 minutes. A 30 minutes, un échantillon de chaque aliquote est analysé par chromatographie liquide haute performance et chromatographie couche mince.

III-1-3-2) Stabilité du complexe en présence de L-histidine

La valeur de référence de l'histidine plasmatique est de 81 +/- 15 µmoles/L chez l'homme. Après injection du traceur peptidique, à raison de 100 µg/740 MBq chez les patients, et distribution homogène de la substance dans le sang, 1 mole de peptide est en présence de 1500 moles d'histidine dans le plasma.

- 100 µg de peptide ATH3 (67 nmoles) sont radiomarqués par 740 MBq de solution d'isolink[®]-technétié dans un volume de 1ml.
- A 10 µl de la solution de ATH3-[^{99m}Tc] (1 µg, 0,67 nmole de peptide), est ajouté 1 ml d'une solution de L-histidine 2,5 µM ou 2,5 M (soit 2,5 nmoles ou 2,5 mmoles de L-histidine). Dans une deuxième expérience, nous mettons en contact 100 µl de la solution (10 µg, 6,7 nmoles) et 1 ml d'une solution de L-histidine 2,5 µM ou 2,5M. Le rapport molaire, L-histidine/ peptide des deux expériences est croissant, équivalent à 0,37, 3,7, 3,7 10⁵, et 3,7 10⁶.
- Chaque aliquote est incubée à 37°C au bain-marie sous agitation pendant 30 minutes. A 30 minutes, un échantillon de chaque aliquote est analysé par chromatographie liquide haute performance et chromatographie couche mince.

Les résultats ont montré que des rapports molaires L-histidine/ peptide de 0,37 et de 3,7 ne déplacent pas la liaison du peptide avec le complexe tricarbonyle technétié. Par contre, pour une concentration en L-histidine à 2,5 M (rapports molaires L-histidine/ peptide de 3,7 10⁵ et 3,7 10⁶), le technétium 99m est totalement déplacé du complexe peptidique. L'expérience a été recommencée en mettant en présence 3, 30 et 300 nmoles de L-Histidine et 0,67 nmoles de peptide précédemment radiomarqué, soit un rapport L-histidine/ peptide croissant de 4,5, 45, et 450.

III-1-3-3) Stabilité du complexe en présence de sérum de veau fœtal

- 50 µg de peptide ATH3 sont radiomarqués par 370 MBq de technétium 99m.
- Après vérification de la pureté radiochimique par chromatographie couche mince (PRC > 95 %), une aliquote de cette solution contenant 1 µg (0,67 nmoles) de peptide est ajoutée à 1 ml de sérum de veau fœtal. Le mélange est incubé à 37°C au bain-marie sous agitation pendant 90 minutes. Le sérum est filtré et le filtrat analysé par CLHP après

dilution à 50 % dans de l'eau purifiée afin de limiter l'activité injectée dans la colonne à 370 KBq (10 μ Ci).

III-2) Etudes métaboliques *in vivo*

Deux modèles animaux ont été utilisés pour l'étude des traceurs iodés : le hamster syrien doré et le lapin « New Zealand White » « Watanabe » ou « Contrôle ». Les peptides technétiés ont été étudiés chez le lapin « New Zealand White ».

La stabilité du marquage et le métabolisme des traceurs sont évalués à partir de prélèvements sanguins et urinaires, et à partir des images scintigraphiques obtenues sous gamma caméra. Chaque échantillon de sang et d'urine est analysé par CLHP sur colonne C18, gradient acétonitrile-eau-TFA 0,1%, et détection UV et radioactive. L'éluat est recueilli en sortie de colonne et mesuré au compteur gamma Cobra.

Les études métaboliques *in vivo* ont été réalisées en concomitance avec les études pharmacologiques (étude des cinétiques sanguines et de la biodistribution). Les protocoles sont présentés dans le chapitre IV : études pharmacologiques des traceurs : études précliniques.

IV) ETUDES PHARMACOLOGIQUES DES TRACEURS : ETUDES PRECLINIQUES

Les modèles animaux utilisés pour l'étude des traceurs iodés : sont le hamster syrien doré et le lapin « New Zealand White » « Watanabe » ou « Contrôle ». Les peptides technétiés ont été étudiés seulement chez le lapin « New Zealand White ».

Les propriétés physico-chimiques de la molécule biologique peuvent être modifiées par la fixation de l'halogène ou la liaison au chélate technétié et par les transformations chimiques apportées pour permettre le radiomarquage comme l'ajout de l'acide aminé histidine. Les études de cinétique sanguine ainsi que les études de biodistribution permettent de déterminer si toutes ces modifications chimiques modifient les propriétés pharmacocinétiques des molécules, et sélectionner le radioligand qui présente les caractéristiques les plus favorables comme une clairance sanguine rapide et une élimination urinaire préférentielle. Les propriétés pharmacologiques et biologiques des

peptides marqués ont par ailleurs été évaluées par Alexis Broisat (Broisat A 2005) et Laurent Riou pour la thématique athérome.

IV-1) Evaluation du métabolisme et de la distribution des traceurs iodés

ATH1-[¹²⁵I] a, en premier lieu, été injecté chez des hamsters syriens dorés traités par un régime hyperlipidémique. Cependant, le modèle animal s'est révélé décevant, la présence de plaque d'athérome n'ayant pas été détectée chez tous les animaux, alors qu'ils étaient nourris par un régime riche en graisses.

Le modèle biologique utilisé dès lors pour l'évaluation de la capacité des ligands, ATH1 et ATH2 marqués à l'iode 123, ATH3 et ATH4 marqués au technétium 99m [^{99m}Tc], à se lier aux plaques d'athérome a été le lapin génétiquement hyperlipidémique de souche WHHL (Watanabe Heritable Hyperlipidemic), qui représente un modèle de choix pour le développement de l'athérosclérose. Les peptides sont injectés par voie intraveineuse (~ 4,4 kBq/kg) à des animaux normaux ou hyperlipidémiques (n=4/groupe) de poids et d'âge comparables, préalablement anesthésiés par injection intramusculaire d'un mélange xylazine (5 mg/kg) / kétamine (35 mg/kg), et cathétérisés dans les veines controlatérales de l'oreille. Deux cathéters sont insérés dans les veines de l'oreille, l'un pour l'administration du radiotracer, et le second pour les prélèvements sanguins (Insyte-N 24G, Becton Dickinson). Des doses additionnelles du mélange anesthésiant sont ensuite injectées au cours de l'expérimentation à raison de 2 mg/kg/heure de xylazine et 14 mg/kg/heure de kétamine environ.

IV-1-1) B2702(75-84/84-75)-[^{123/125}I] (ATH1-[I])

- Etude chez le hamster

- 4 MBq de ATH1-[¹²⁵I] sont injectés par voie intraveineuse au niveau de la veine saphène. L'animal est placé sous gamma caméra dédiée petit animal (γ Imager Biospace) et une scintigraphie est réalisée sur 30 minutes avec des images toutes les minutes. Des prélèvements sanguins sont réalisés à des temps réguliers pendant 30 minutes.

- Après euthanasie de l'animal par un surdosage en pentothal réalisé à 30 minutes, 1 millilitre de sang et d'urine sont prélevés. L'échantillon de sang est centrifugé pendant 20 minutes à 1500 G, le sérum est prélevé et purifié par centrifugation à 12 000 G sur filtre

Nanosep[®] 10K pendant 30 minutes. L'urine est filtrée sur filtre Nanosep[®] 10 K pendant 20 minutes. Chaque filtrat est analysé par CLHP avec analyse par ultraviolet et mesure de la radioactivité.

- Etude chez le lapin « New Zealand White ».

- 5 MBq/Kg (soit environ 18,5 MBq) de ATH1-[¹²³I] sont injectés par voie intraveineuse au niveau de l'oreille. L'animal est placé sous gamma caméra et une scintigraphie est réalisée sur 30 minutes avec des images toutes les minutes. Des prélèvements sanguins sont réalisés 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes suivant l'injection afin d'évaluer la cinétique sanguine des radiotraceurs.

- 30 minutes après l'injection du radiotraceur, l'animal est euthanasié par injection intramusculaire d'une surdose d'anesthésique suivie d'une dose intraveineuse létale de 10 ml de KCl (10%). Après euthanasie, 1 millilitre de sang et d'urine sont prélevés. L'échantillon de sang est centrifugé pendant 20 minutes à 1500 G, le sérum est prélevé et purifié par centrifugation à 12 000 G sur filtre Nanosep[®] 10K pendant 30 minutes afin d'éliminer les protéines. L'urine est filtrée sur filtre Nanosep[®] 10 K pendant 20 minutes. Chaque filtrat est analysé par CLHP avec analyse par ultraviolet et mesure de la radioactivité. Des échantillons des principaux organes (aorte, cœur, foie, muscle, peau) sont prélevés.

IV-1-2) B2702(84-75)-[¹²³I] (ATH2-[¹²³I])

L'étude est réalisée chez le lapin « New Zealand White » Watanabe ou Contrôle sur 180 minutes.

- Le métabolisme de ATH2-[¹²³I] est analysé après injection, chez le lapin Watanabe hypercholestérolémique, de 25 µg/18,5 MBq/kg de peptide. L'animal est placé en continu sous une gamma caméra. Des prélèvements sanguins de 100 µl sont réalisés à 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120, 180 minutes afin d'étudier la cinétique sanguine. Des prélèvements plus importants (2 ml) sont réalisés à 1, 2 et 3 heures post-injection pour compléter les études analytiques.

- Les animaux sont euthanasiés 3 heures après l'injection du traceur par injection intramusculaire d'une surdose d'anesthésique suivie d'une injection létale de 10 ml de KCl (10%). Des échantillons des principaux organes (aorte, cœur, foie, muscle, peau) ainsi

qu'un échantillons de sang et d'urine sont prélevés. Ces échantillons ainsi que les prélèvements sanguins sont comptés au compteur de radioactivité Cobra Packard.

IV-2) Evaluation du métabolisme et de la distribution de B2702(85-74)-H-[^{99m}Tc] et [B2702(85-74)]₄-Raft-H-[^{99m}Tc] (ATH3-[^{99m}Tc] et ATH4-[^{99m}Tc])

L'étude est réalisée chez le lapin « New Zealand White » Watanabe ou Contrôle sur 180 minutes.

- Une solution du peptide technétié à 50 µg/740 MBq est préparée extemporanément. La molécule est diluée dans 1 ml de solution de NaCl 0,9% et contrôlée. La pureté radiochimique doit être supérieure à 95 % pour injecter la molécule marquée.

- 18,5 MBq/Kg (environ 74 MBq) de peptide technétié sont injectés chez le lapin au niveau de l'artère de l'oreille. Des images scintigraphiques sont réalisées sur 3 heures sous gamma caméra.

- Des prélèvements sanguins de 100 µl sont réalisés à 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120, 180 minutes au niveau du cathéter posé dans la veine de l'oreille.

- Des échantillons de 2 ml de sang sont prélevés à 1 heure et 3 heures. Le sang est centrifugé à 5000 tours/minute. On recueille le culot cellulaire et le sérum ; des aliquotes de 100 µl du culot et du surnageant sont comptées au compteur gamma (Cobra) afin de déterminer la fixation cellulaire. Un échantillon de sérum est mis de côté afin de déterminer la fixation aux protéines du sérum par précipitation de ces dernières à l'acide trichloracétique 10%. Le reste du sérum est purifié par filtration à 12 000G sur filtre Nanosep[®] 10 K pendant 20 minutes afin d'éliminer les grosses protéines et les cellules qui pourraient détériorer la colonne de chromatographie. Le filtrat est analysé par CLHP avec détection de la radioactivité et recueil de l'éluat en sortie de colonne. Ce dernier est compté sur le compteur gamma Cobra.

- Les animaux sont euthanasiés 3 heures après injection du traceur. Des échantillons des principaux organes (aorte, cœur, foie, muscle, peau) ainsi qu'un échantillon d'urine sont prélevés. Tous ces échantillons sont comptés au compteur gamma et la radioactivité est déterminée par gramme d'organe.

- L'urine est filtrée sur filtre millipore 0,3 µm afin d'éliminer les cellules et de purifier l'urine. Le filtrat est ensuite analysé par CLHP.

LES MARQUEURS DE LA NEOANGIOGENESE

I) OPTIMISATION DES REACTIONS DE MAROUAGE

I-1) Préparation de traceurs iodés

Trois peptides ont été marqués: ANG1, ANG2 et ANG3. Afin de réaliser une iodation par substitution électrophile, il a été choisi de fixer directement sur la structure cyclique Raft deux résidus tyrosine par l'intermédiaire du résidu amine libre des lysines. Une tyrosine a été ajoutée à c[RGDFK] pour former le dérivé ANG3.

I-1-1) Détermination des paramètres de la réaction de marquage

I-1-1-1) Marquage à la chloramine-T

- A une quantité définie de protéine, diluée à une concentration de 1 mg/ml en solution aqueuse, on ajoute une solution d'iodure¹²⁵ de sodium à haute activité spécifique, de 2 à 10 µl (0,1 et 0,5 nmoles) en fonction de l'activité demandée, puis une solution de chloramine-T dont on déterminera la concentration optimale. Cette dernière doit être aussi faible que possible afin de limiter le risque de dénaturation. On agite et on laisse incuber à température ambiante.

- Après dix minutes d'incubation, la réaction d'oxydation est stoppée par l'ajout d'un agent réducteur, le pyrosulfite de sodium à 4 mg/ml (20 µl, 460 nmoles). Le rendement de marquage est déterminé par CCM sur plaque de silice phase inverse RP₆₅₄ (Merck) d'une aliquote de 2 µl de solution.

L'éluant retenu pour la chromatographie des trois peptides ligands de $\alpha_v\beta_3$ est un mélange acétonitrile-eau 75/25. Dans ces conditions, l'iode¹²⁵ libre (I) migre au front du solvant ($R_f = 1$) tandis que le peptide marqué reste au point de dépôt ($R_f = 0,2$).

Différents paramètres sont à déterminer afin d'obtenir un marquage avec une bonne activité spécifique et une PRC maximale : concentration en peptide, quantité de chloramine-T, temps de réaction.

- Concentration en peptide et temps de réaction

- 100 µg, 50 µg, 10 µg, 1 µg de peptide ANG1 et ANG2 (soit 20, 10, 2 et 0,2 nmoles) et 100 µg, 50 µg, 10 µg, 1 µg de ANG3 (respectivement 120, 60, 12 et 1,2 nmoles) sont marqués par une solution d'iodure de sodium (Na^{125}I 18,5 MBq) en présence de 10 µl de solution de chloramine-T à 1 mg/ml (44 nmoles). La réaction d'oxydation est arrêtée après 5, 10 ou 15 minutes d'incubation par ajout de 20 µl de pyrosulfite de sodium à 4 mg/ml (460 nmoles).

- Quantité de chloramine-T et temps de réaction

- 50 µg de peptide ANG1 et ANG2 (8 nmoles) sont marqués par 250 pmoles d'iode 125 (activité théorique 18,5 MBq) en présence de quantités croissantes de chloramine-T : 4,4, 11, 22 et 44 nmoles, pendant 15 ou 30 minutes d'incubation. La pureté radiochimique est déterminée par CCM sur plaque de silice C18 RP₆₅₄. La dégradation éventuelle de la molécule, en raison de la présence de l'agent oxydant, est étudiée par CLHP.

I-1-1-2) Marquage au N-Bromosuccinimide (NBS)

La méthode de marquage est identique à la méthode par la chloramine-T. La chloramine-T est remplacée par une solution de NBS à 0,1 mg/ml moins dénaturante (Glaser M., 2001).

- 10 nmoles de peptide ANG1, ANG2 et ANG3 sont mis en contact avec une solution de NaI eq. 18,5 MBq (250 pmoles d'iode), et en présence de solutions NBS de concentrations croissantes de 1 à 5 µg (soit de 5,6 à 28 nmoles). La réaction d'oxydation est stoppée après 15 minutes d'incubation par l'ajout de 20 µl de l'agent réducteur pyrosulfite de sodium 4 mg/ml (460 nmoles). La pureté radiochimique est déterminée par CCM sur plaque de silice C18 RP₆₅₄, avec comme solvant d'élution un mélange acétonitrile/eau (75/25).

I-1-1-3) Marquage au couple lactoperoxydase-Peroxyde d'hydrogène

Le choix des concentrations de lactoperoxydase et de H₂O₂ est déterminé à partir des méthodes de marquage préconisées par Marchalonis J. et Palmer M. (Marchalonis J. 1969, Palmer M. 1999).

- Immédiatement avant le marquage, on prépare une solution de lactoperoxydase à 20 µg/ml dans du tampon phosphate, une solution de peroxyde d'hydrogène 30 (H₂O₂) à 0,1% dans de l'eau distillée, et la solution de peptide à 1 mg/ml en solution aqueuse. A 10 nmoles de peptide, on ajoute 5 µl de solution de Na I¹²⁵ (18,5 MBq). La réaction d'oxydation est étudiée d'une part pour 0,4 µg de lactoperoxydase (5 pmoles) en présence de quantités croissante de H₂O₂ de 2, 3 et 5 µg (53, 80, 130 nmoles) et d'autre part pour 2 µg de lactoperoxydase (25 pmoles) en présence de 0,2 µg de H₂O₂ (5,3 nmoles). La solution est incubée 10 minutes à température ambiante puis la réaction est stoppée par l'ajout d'un réducteur.

I-1-2) Etude des produits de la réaction : analyse CLHP

Cette étude est réalisée dans les mêmes conditions que celles définies pour le ligand de VCAM-1. 1 µmole de peptide ont été marquées avec une solution de Na¹²⁷I (1 µmole) en présence de chloramine-T. A 1 minute, 20 minutes et 60 minutes d'incubation, un échantillon de solution est prélevé. La réaction d'oxydation, dans l'échantillon, est stoppée par l'ajout de pyrosulfite de sodium (20 µmoles). 10 µl sont prélevés et analysés. L'analyse est réalisée par chromatographie phase inverse sur colonne nucleosil[®] C18, 30 x 4,6 mm, particule 3 µm, détection UV 214 nm, débit 1,3 ml/mn et élution par un gradient de concentration : 90% acétonitrile-10% eau-0,1% TFA (A) / Eau-TFA 0,1% (B), de 5 à 60 % de solution aqueuse (B) en 15 minutes. Dans un deuxième temps, nous avons essayé de séparer les constituants sur colonne séparative afin de les analyser par spectrométrie de masse.

I-1-3) Techniques de purification

Le marquage des peptides à l'iode 123 (I123-S1, Cis Bio international) entraîne une diminution du rendement de marquage (voisin de 70%) obligeant d'une part à réaliser un marquage en présence d'entraîneur (dose déterminée à 750 pM) et d'autre part à purifier la

solution. Cette diminution du rendement de marquage peut être la conséquence du faible nombre de moles de peptide et de la forte activité spécifique de ^{123}I (25 pM d'iode ^{123}I contre 2000 pM d'iode ^{125}I) ou de la dilution de la solution.

Les peptides sont purifiés sur colonne C18 Sep-pak ou sur colonne échangeuse d'ions anionique ou cationique. Différents solvants aqueux et organiques sont testés. Ils doivent être compatibles avec une administration humaine et être éliminés par évaporation si nécessaire : eau distillée, NaCl 0,9%, éthanol, éthanol/HCl pH 1, acétonitrile, acétone. L'objectif est d'éliminer les iodures libres.

Différentes méthodes de séparation ont été testées :

- Chromatographie d'exclusion sur colonne Sephadex G5 :
 - 3,7 MBq de solution radiomarquée sont déposés sur la colonne, cette dernière est éluée par des fractions de 0,5 ml de chlorure de sodium 0,9%. L'éluat est recueilli, compté à l'activimètre et chaque échantillon est analysé par CCM sur plaque de silice RP₆₅₄, solvant d'élution acétonitrile/ eau (75/25).
- Chromatographie échangeuse d'ions.
 - Préparation d'une colonne échangeuse d'anions. 3,7 MBq de solution radiomarquée sont déposés sur la colonne, cette dernière est éluée par fractions de 0,5 ml de chlorure de sodium 0,9%, ou de tampon phosphate pH 7,4.
- Chromatographie de partage sur colonne Sep-pak C18.
 - 3,7 MBq de solution radiomarquée sont déposés sur la colonne. Cette dernière est éluée par des fractions de 0,5 ml de solvants. Différents solvants sont testés : chlorure de sodium 0,9%, tampon phosphate pH 7,4, tampon phosphate pH 4, tampon phosphate pH 9, solution d'éthanol absolu ou mélange éthanol absolu / HCl 1N (4/1).

I-1-4) Etude de stabilité dans les solvants

Le rendement de marquage est déterminé par CCM après marquage du peptide en solution aqueuse, dans une solution de sérum physiologique ou dans du PBS. Les échantillons sont conservés à température ambiante, 1 heure, 2 heures, 4 heures, 6 heures, 24 heures, et 48 heures après marquage.

I-2) Marquage indirecte des peptides « $\alpha_v\beta_3$ » au technétium 99m

Comme pour les peptides dérivés de B2702(84-75), nous avons testé le marquage au technétium 99m des peptides « $\alpha_v\beta_3$ » par l'intermédiaire du petit synthon tricarbonyle. Le marquage est réalisé à l'aide du kit de marquage Isolink[®] fourni par la société Mallinckrodt.

La fixation du complexe va dépendre de nombreux paramètres : température de réaction, pH, activité volumique, et concentration volumique.

Nous avons, en premier lieu, étudié la possibilité de marquer le peptide ANG1 par l'aquaion tricarbonyle technétié, ainsi que ses dérivés monotyrosiné et non tyrosiné afin de ne pas modifier chimiquement le vecteur. Les résultats étant peu probants, un acide aminé histidine a été introduit sur la structure Raft sur le plan opposé aux structures cibles « RGD ».

I-2-1) Marquage des peptides tyrosinés

Le tricarbonyle technétié est susceptible de réagir et d'échanger ses molécules d'eau avec de nombreux ligands. Nous avons, en premier lieu, testé la possibilité de marquer le peptide ANG1 et ses dérivés, sous différentes conditions de température et de durée d'incubation.

- Préparation d'une solution de $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ à 2200 MBq/1ml. Neutralisation à pH 8 par HCl 2N.
- 370 MBq de l'intermédiaire technétié sont mis en présence de 50 μg de peptide, précédemment dilués en solution aqueuse à 1 mg/ml (n=3).
- Chaque échantillon est incubé à 25°C, 80°C ou 100°C pendant 30 minutes.
- Toutes les 10 minutes, une goutte de préparation est prélevée et analysée par CCM sur plaque de silice. Deux analyses sont effectuées avec un solvant d'élution NaCl 0,9% et un solvant acétate d'éthyle. Les plaques sont lues au radiochromatographe Raytest (Fuji).
- A 30 minutes, les trois solutions de peptide sont diluées dans 10 ml d'eau purifiée. 10 μl de chaque solution sont analysés en CLHP, gradient d'élution (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn 5 % de A, de 5 à 25 mn de 5% à 80 % de A, et de 25 à 35 mn 80% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur UV et détecteur de radioactivité.

L-2-2) Définition des paramètres de marquage de RGD-Raft-H-[^{99m}Tc] (ANG4-[^{99m}Tc])

Le radiomarquage des peptides « $\alpha_v\beta_3$ » tyrosinés étant peu spécifique et peu stable, une séquence glycine-histidine est fixée sur le gabarit Raft en remplacement de la tyrosine. L'histidine présente une grande affinité pour le complexe tricarbonyle, et forme un complexe stable de par la présence de trois sites de liaison (Figure 15).

- **Influence de la température**

Le peptide froid, dilué en solution aqueuse à 1 mg/ml, est chauffé à 60 °C, 80°C et 100 °C, afin d'étudier sa dégradation à la chaleur. L'analyse CLHP avec détecteur UV à 214 nm montre une dégradation du peptide ANG4 à 100°C. Aucune dégradation n'est observée à 80°C. (Cette dégradation a aussi été observée lors des essais de marquage de ANG1 et ATH4 avec [^{99m}Tc]).

L'efficacité du marquage au technétium sera étudiée à des températures comprises entre 25°C (température ambiante) et 80°C.

- Préparation d'une solution de [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ à 2200 MBq/1ml. Neutralisation à pH7-8 par HCl 2N.

- 370 MBq de l'intermédiaire technétié sont mis en présence de 50 µg de peptide ANG4 dilué en solution aqueuse à 1 mg/ml. Cette solution est incubée à 25°C, 40 °C, 60°C et 80°C pendant 60 minutes.

- Toutes les 10 minutes, une goutte de préparation est prélevée et analysée par CCM sur plaque de silice. Deux analyses sont effectuées avec un solvant d'élution NaCl 0,9% et un solvant acétate d'éthyle. Les plaques sont lues au radiochromatographe Raytest (Fuji).

- A 30 et 60 minutes, les trois solutions de peptide sont analysées en CLHP, gradient d'élution (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn : 5 % de A, de 5 à 25 mn : de 5 à 80 % de A et de 25 à 35 mn : 80% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur UV et détecteur de radioactivité.

- **Influence de la concentration en peptide**

L'expérience précédente a montré que le marquage est réalisable avec une activité spécifique de 37GBq/µM. Afin de vérifier si cette valeur peut être améliorée, le

radiomarquage pour des activités spécifiques voisines de 37, 74, et 148 GBq/ μ M est analysé.

- Préparation d'une solution de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ à 2200 MBq/1ml. Neutralisation à pH 8 par HCl 2N.

- 740 MBq de l'intermédiaire technétié sont mis en présence de 25, 50 μ g et 100 μ g de peptide ANG4 dilué en solution aqueuse à 1 mg/ml (n=2). Le volume de chaque échantillon est ajusté à 1 ml par une solution d'eau purifiée.

- Chaque solution est incubée à 60°C pendant 20 minutes puis analysée par CCM (plaque de silice C18 RP₆₅₄, solvant d'élution NaCl 0,9% et acétate d'éthyle, lecture au radiochromatographe Raytest) et par chromatographie liquide haute performance (gradient d'élution (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn : 5 % de A, de 5 à 25 mn : de 5 à 80 % de A et de 25 à 35 mn : 80% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur UV et détecteur de radioactivité.

I-2-3) Stabilité de la préparation en solution aqueuse

Une préparation de ANG4- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]$ est conservée pendant 24 heures au réfrigérateur à une température comprise entre 4 et 8 °C. La préparation est placée dans un flacon en verre incolore serti. Un échantillon de solution est prélevé et analysé par CLHP, 8 heures et 24 heures après la préparation. La PRC est déterminée.

II) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES MOLECULES MARQUEES.

Différentes analyses ont été effectuées afin de déterminer les propriétés des peptides marqués. Nous avons étudié leur lipophilie par mesure du coefficient de partage, et leur répartition sanguine.

II-1) Mesure du coefficient de partage

La lipophilie de chaque molécule est déterminée par mesure du coefficient de partage entre une solution tampon phosphate sodique pH 7,4 et une solution d'octanol à pH 7,4. Les échantillons sont mesurés sur le compteur gamma. 100 μ l de solution de molécule marquée avec une activité comprise entre 185 KBq et 370 KBq sont ajoutées à 1 ml de

solution milieu tampon phosphate-octanol (50/50). L'échantillon est centrifugé pendant 1 minute puis décanté. Une aliquote de 100 µl de chaque phase est recueillie et mesurée au compteur gamma.

Nous avons ensuite étudié l'influence du pH du milieu sur le coefficient de partage. Ce dernier est mesuré en présence de solutions tampon phosphate de pH croissant de 6,2 à 8,2 (6,2 ; 6,6 ; 7,2 ; 7,4 ; 7,8 ; 8,2) et d'une solution d'octanol à pH 7,4.

II-2) Détermination de la répartition sanguine

Seuls les peptides libres dans le sérum peuvent être biologiquement actifs, la vocation de ces traceurs étant de reconnaître un récepteur cellulaire cible. La détermination de la fixation non spécifique par mesure du taux de liaison aux protéines plasmatiques et par mesure de la répartition sanguine entre le sérum et les éléments figurés du sang permet d'évaluer l'efficacité et la sensibilité du traceur.

La répartition sanguine et le pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques du traceur sont déterminés selon les mêmes méthodes que celles citées précédemment : précipitation à l'acide trichloro-acétique 10 % (TCA 10 %) et électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

II-2-1) Détermination de la fixation aux protéines plasmatiques par précipitation

Les molécules analysées étant des peptides, le volume de solution de TCA 10 % à ajouter pour entraîner la précipitation du peptide radiomarqué en solution dans NaCl 0,9% est déterminé :

- 25 µg de ANG1 sont dilués dans 100 µl de NaCl 0,9 %. Des fractions de 50 µl de TCA10% sont ajoutées jusqu'à observer une précipitation du peptide. Il faut 200 µl de solution de TCA 10% pour observer un premier trouble. A 500 µl, nous observons un précipité au fond du tube à essai. La mesure de l'activité du culot est de 134 µCi et celle du surnageant de 139 µCi.

- Dans un deuxième temps, la liaison protéique est déterminée après avoir incubé 25µg de peptide précédemment radiomarqué, dans un échantillon de 1 ml de sang, à 37 °C sous agitation pendant 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 3 heures. 200 µl de sang sont prélevés et centrifugés à 2000 T/mn pendant 15 minutes. Cellules sanguines et sérum sont

comptés au compteur gamma. Le sérum est recueilli dans un tube à essai dans lequel 200 µl de solution TCA 10 % sont ajoutées. Le mélange est centrifugé à 1500 g pendant 15 minutes. Le surnageant et le précipité protéique sont comptés au compteur gamma. Le sérum est analysé par CLHP.

La répartition sanguine de la molécule ANG1-[¹²⁵I] est analysée à partir de prélèvements de sang de souris lors des études *in vivo* ou après incubation dans des échantillons de sang prélevés chez des volontaires sains. L'hématocrite chez la souris est de 40% donc voisin de celui de l'homme.

III) ETUDES METABOLIQUES

III-1) Etudes métaboliques *in vitro*

III-1-1) Détermination de la stabilité sanguine

La mesure de la PRC après incubation du peptide radiomarqué dans un échantillon de sang placé sous agitation à 37°C permet d'apprécier la désiodation ou la décomplexation du traceur en fonction du temps et d'évaluer si la radioactivité mesurée par détection externe *in vivo* correspond au traceur ou à l'isotope libre. La PRC du radioligand est déterminée avant, pendant et après incubation par CCM et/ou CLHP.

III-1-2) Test de stabilité par compétition de RGD-Raft-H-[^{99m}Tc] (ANG4-[^{99m}Tc])

L'analyse de la stabilité sanguine des complexes technétiés sera complétée par des réactions de compétition entre le peptide marqué et des solutions d'EDTA, d'histidine, et de cystéine en excès, ou encore en présence de sérum de veau fœtal.

Le marquage des ligands est suivi d'une purification sur Sep-pak C18[®] (Waters corporation). La colonne est conditionnée par 2 ml d'éthanol puis 2 ml d'eau. La solution de marquage est ajoutée en tête de colonne et est éluée par gravité. La colonne est rincée par 1 ml d'eau (ou NaCl 0,9%) et l'on recueille le pertechnétate de sodium. Le ligand est ensuite élué en présence de 5 ml d'éthanol 95°.

- La solution purifiée est mise en compétition avec des solutions d'EDTA, de cystéine, ou de L-histidine, fraîchement préparées et en excès.

- La stabilité de la solution est analysée en présence de sérum de veau fœtal (SVF) et en présence de sérums issus de donneurs sains.

Les solutions sont incubées à 37°C, en bain-marie, sous agitation afin de conserver les conditions biologiques. L'analyse des milieux réactionnels est réalisée après 1 heure d'incubation.

La cystéine présente une excellente affinité pour le technétium de par la présence du groupement thiol, elle est présente dans l'organisme sous forme d'acide aminé libre ou incorporée aux protéines. L'histidine est l'acide aminé qui présente la meilleure affinité pour le complexe tricarbonyl technétié (Figure 14). L'EDTA est un agent chélatant qui présente une bonne affinité pour le technétium 99m. Le sérum de veau fœtal présente des enzymes et des protéines susceptibles de métaboliser le ligand.

- Compétition en présence d'EDTA

- Des solutions d'EDTA à 1 µM, 10 µM et 100 µM et une solution de ANG4-[^{99m}Tc] à 50 µg / 370MBq / 500 µl sont préparées extemporanément.

- A 1 millilitre de chaque solution d'EDTA, on ajoute une aliquote de 50 µl (soit 1 nmole) de peptide précédemment radiomarqué (n=2). Chaque solution est incubée à 37°C au bain-marie sous agitation pendant 30 minutes.

- Après incubation, un échantillon de chaque solution est prélevé et dilué au dixième avant d'être analysé par CLHP et CCM.

- Stabilité du complexe en présence de L-histidine

- Une solution mère de L-histidine à 20 mg/L est préparée extemporanément. 7,5 µl, 75 µl et 750 µl de cette solution sont dispensés dans des flacons. Dans chacun de ces flacons, nous ajoutons 50 µl de solution de ANG4-[^{99m}Tc] à 50 µg /370 MBq/ 500 µl (soit 1 nmole). Chaque flacon est ajusté avec une solution de NaCl à 0,9% qsp 1 ml puis incubé à 37°C au bain-marie sous agitation pendant 30 minutes et 60 minutes.

- 1 nmole de ANG4-[^{99m}Tc] est mise en compétition avec respectivement 1 nmole, 10 nmoles ou 100 nmoles de L-histidine. Chaque solution est analysée par CCM sur plaque de silice RP₆₅₄, solvant NaCl 0,9% et acétate d'éthyle, et par CLHP colonne C18 Bondapak 5µm 20 cm, gradient d'élution (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (B) / eau-

TFA 0,1% (A) ; de 0 à 5 mn : 5 % de B, de 5 à 25 mn : de 5 à 80 % de B et de 25 à 35 mn : 80% de B ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur UV et détecteur de radioactivité.

- Stabilité du complexe en présence de cystéine

- 1 nmole de peptide ANG4 précédemment marqué au technétium 99m , à raison de 50 $\mu\text{g}/370 \text{ MBq}/500 \mu\text{l}$, est mise en présence de solutions de concentrations croissantes en cystéine. Les concentrations choisies en cystéine sont de 0,1 nmole, 1 nmole, 10 nmoles et 100 nmoles.

- Chaque mélange peptide technétié-cystéine est incubé à 37°C pendant 1 heure, puis dans un deuxième temps sur une durée de 2 heures, au bain-marie sous agitation et analysé par CLHP.

- Stabilité du complexe en présence de sérum de veau fœtal

- Radiomarquage du peptide : 50 μg de peptide ANG4 sont radiomarqués par 370 MBq de technétium 99m .

- Après vérification de la pureté radiochimique par chromatographie couche mince (PRC > 95%), une aliquote de cette solution contenant 5 μg (1 nmole) de peptide est ajoutée à 0,5 ml de sérum de veau fœtal. Le mélange est incubé à 37°C au bain-marie sous agitation pendant 1 heure et 3 heures. Le sérum est filtré et le filtrat analysé par CLHP après dilution à 50% dans de l'eau afin de limiter l'activité injectée dans la colonne à 370 KBq.

III-1-2) Détermination de la stabilité sanguine *in vitro* de RGD-Raft-H- ^{99m}Tc (ANG4- ^{99m}Tc)

- 2500 MBq de ^{99m}Tc (Elumatic III) sont ajoutés à un flacon d'Isolink. La solution est chauffée au bloc chauffant 20 minutes à 100°C puis neutralisée par 80 μl d'HCl 2N. 100 μg de ANG4 sont radiomarqués par 740 MBq de l'intermédiaire technétié $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. La préparation est diluée, incubée à 60°C pendant 20 minutes puis laissée à température ambiante pendant 20 minutes. La pureté radiochimique est contrôlée par CCM (PRC > 95%).

- A 20 µg/ 148 MBq de cette solution, nous ajoutons 1 millilitre de sang total prélevé extemporanément sur tube hépariné (n=3). Le sang sera incubé à 37°C au bain-marie sous agitation pendant 6 heures. Un tube de sang est préparé pour une étude à 24 heures d'incubation. Dans ce cas, 40µg/300MBq de protéine marquée sont injectés à un millilitre de sang (Tube 4).

- Après 30 minutes et 6 heures d'incubation pour les 3 premiers tubes et 24 heures d'incubation pour le tube 4, une aliquote de sang est prélevée et centrifugée. Le sérum est purifié par centrifugation sur filtre Nanosep[®] 10 K. Le filtrat est analysé par CLHP sur colonne C18, gradient (acétonitrile-TFA 0,1%)-(Eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / Eau-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn : 5% de A, de 5 à 25 mn : de 5 à 60% de A et de 25 à 35 mn : 60% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur UV et détecteur de radioactivité. Recueil du filtrat dans des tubes toutes les minutes puis comptage des tubes au compteur gamma.

III-2) Etudes métaboliques *in vivo*

Les expérimentations animales ont été réalisées chez la souris Balb/c, C57B1/6, ou chez la souris « nude » en conformité avec les lois sur l'expérimentation animale et après validation par un conseil d'éthique.

Les études métaboliques ont été réalisées chez la souris Balb/c, après injection du traceur dans la queue, par prélèvements de sang et d'urine à différents temps, et par analyses des images scintigraphiques. Les résultats ont été corrélés aux résultats précédents obtenus *in vitro*.

Le protocole opératoire est mentionné dans le chapitre suivant : évaluation pharmacologique des traceurs : études précliniques.

IV) EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DES TRACEURS : ETUDES PRECLINIQUES

Les cinétiques sanguines n'ont pas pu être déterminées. En effet le nombre de prélèvements, et par adéquation le volume de sang nécessaire pour tracer la courbe cinétique est trop important pour que l'étude soit réalisée chez la souris.

L'analyse du métabolisme du peptide et plus particulièrement de la stabilité du marquage, l'étude de la biodistribution par prélèvements d'organes et l'analyse des images

scintigraphiques sont réalisées pour l'ensemble des traceurs ANG2-[¹²⁵I], ANG1-[¹²⁵I] et ANG4-[^{99m}Tc]

- Après vérification de la pureté radiochimique, la préparation est injectée au niveau d'une veine latérale de la queue de la souris. Les molécules iodées sont injectées à raison de 3,7 MBq par souris et les peptides technétiés à raison de 20-30 MBq par souris.

- Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange xylazine 15 mg/kg et kétamine 75 mg/kg puis placés sous la caméra dédiée petit animal (γ imager Biospace). Des images de 15 minutes sont réalisées à 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 4 heures après l'administration du traceur.

- A la fin de l'expérience, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. Un échantillon de sang et un échantillon d'urine sont prélevés à la fin de l'expérimentation. Les échantillons de sang et d'urine sont analysés directement sur CCM par dépôt d'une goutte d'échantillon sur plaque de silice RP₆₅₄ avec élution par un solvant acétonitrile/eau ou NaCl 0,9% puis lecture au radiochromatographe. Le volume restant est filtré sur filtre Nanosep[®] 10K et l'éluat est analysé par CLHP. La CLHP est réalisée sur colonne C18 Bondapak 5 μ m, 20 cm avec une gradient d'élution (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90:10) (A)/ eau-TFA 0,1% (B); débit 0,7 ml/ml ; détection UV 210 nm et détection REA.

- Des échantillons des principaux organes (foie, reins, rate, poumons, estomac, peau) sont prélevés, pesés et mesurés au compteur gamma Cobra pour l'étude de la biodistribution du traceur.

RESULTATS

LES MARQUEURS DE LA PLAQUE D'ATHEROME

I) PREPARATION DES MOLECULES MARQUEES

I-1) Optimisation du marquage des traceurs iodés

I-1-1) Préparation et analyse de B2702(75-84/84-75)-[¹²⁵I] (ATH1-[¹²⁵I])

Différentes méthodes d'analyses chromatographiques ont été mises au point afin de caractériser le traceur, de le purifier ou d'analyser sa pureté radiochimique.

- Analyse CCM

ATH1-[¹²⁵I] est élué par un mélange acétonitrile/eau (65/35) pour lequel on a observé une légère migration du peptide. L'iode libre (¹²⁵I) migre au front du solvant (R_f = 1) tandis que le peptide marqué reste à proximité du point de dépôt (R_f = 0,2).

- Chromatographie sur colonne Sep-pak[®] plus C18

Le peptide ATH1-[¹²⁵I] est quantitativement immobilisé sur colonne Sep-pak[®] plus. Nous n'avons pas réussi à éluer le produit quel que soit le solvant utilisé : sérum physiologique, solution tampon phosphate, acétonitrile, ou mélange éthanol/acide chlorhydrique 1N.

- Chromatographie d'exclusion

Comme pour la chromatographie sur colonne, le peptide ATH1-[¹²⁵I] reste fixé sur la colonne.

- Analyse CLHP

Le peptide possédant deux résidus tyrosine, nous pouvons obtenir, théoriquement, 4 dérivés possédant de 0 à 4 atomes d'iode. Cependant, du fait de l'encombrement stérique et de la stabilité de la liaison, et si on travaille en excès de ligand, les composés mono-iodés et di-iodés sont majoritaire.

Le marquage est réalisé en léger excès de ligand : une μmole d'iode pour 1,4 μmole de peptide. Les spectres chromatographiques de ATH1-[¹²⁷I] après 20 et 60 minutes

d'incubation en présence d'iode 127 et de chloramine-T sont identiques. On note la présence de nombreux pics dont plusieurs non distinguables après 13 minutes. Malgré un marquage équimoléculaire, le peptide non marqué persiste en quantité importante, puis on observe de nombreux pics (Figure 34). Il n'a pas été possible de séparer les constituants par CLHP séparative et de réaliser la spectrométrie de masse. Il est probable que soient élués le peptide mono-iodé puis le peptide di-iodé. (à T20 mn peptide non iodé : Tr = 10,89 mn à T0, peptide mono-iodé : Tr = 11,45 mn, peptide di-iodé : 11,75 mn). Nous observons ensuite de multiples pics avec des temps de rétention plus élevés et correspondant vraisemblablement aux dérivés tri et tétra-iodés et aux réactifs.

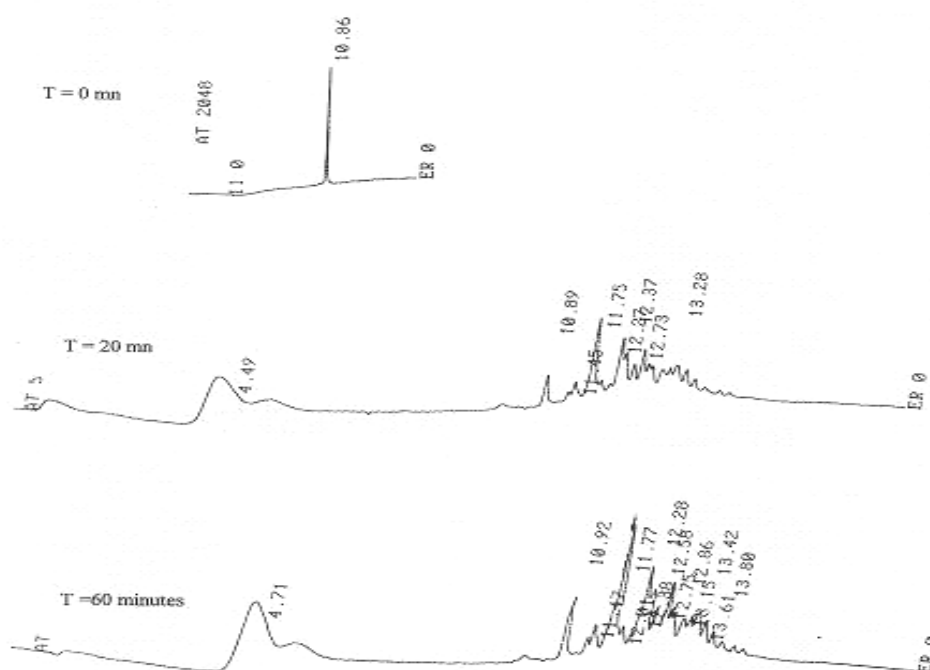


Figure 34 : Analyse chromatographique par CLHP de ATH1- 127 I]. Chromatographie phase inverse : colonne nucléosil C18, gradient de concentration eau-TFA 0,1% (A) /acétonitrile-TFA 0,1% (B) ; de 5 à 60% de B en 15 minutes ; débit 1,3 ml/mn, UV 264 nm. Analyse au temps T0, après 20 minutes et 60 minutes d'oxydation.

I-1-1-1) Paramètres de la réaction de marquage

- Marquage à la chloramine-T

- ◊ Concentration en peptide

La pureté radiochimique de la préparation de ATH1 en présence de 18,5 MBq d'iode 125 est supérieure à 97% pour 10 μ g, 100 μ g et 400 μ g (3,5, 35 et 136 nmoles) de peptide

soit une activité spécifique maximum de 5,25 TBq/mmmole. Toutes les expériences seront réalisées avec une activité spécifique comprise entre 1,8 et 5,25 TBq/mmmole.

◇ Chloramine-T et temps de réaction optimal

L'ensemble des résultats (Tableau I et Figure 35) montre que la cinétique de la réaction de marquage dépend du temps de réaction et de la concentration en chloramine-T ajoutée à la solution.

Lorsque la concentration en peptide ou en réactif oxydant est faible, le temps d'incubation doit être augmenté pour obtenir un meilleur rendement de marquage. Pour une quantité de protéine de 10 µg, après un temps d'incubation de 5 minutes la PRC est de 80%, après 15 minutes la PRC est de 97,5% (tableau I). Pour un marquage réalisé avec 100 µg de peptide, la PRC est de 91% à 5 minutes.

Afin d'obtenir une activité spécifique satisfaisante et une pureté radiochimique supérieure à 95%, 10 µg de peptide (3,4 nmoles) sont marqués par 18,5 MBq d'iode 125 (0,16 nmoles) en présence de 8,8 nmoles de chloramine-T (CLAT) pendant 15 minutes.

Peptide	µg de peptide	temps d'incubation en mn	PRC %
ATH1-[¹²⁵ I]	10	5	80,2
	10	15	97,5
	10	20	98

Tableau I : Influence du temps d'incubation sur la PRC de ATH1-[¹²⁵I]. Peptide 3,4 nmoles ; NaI : 0,156 nmoles, CLAT 8,8 nmoles. Mesure sur plaque de silice RP₆₅₄, solvant acétonitrile/ eau (65/35).

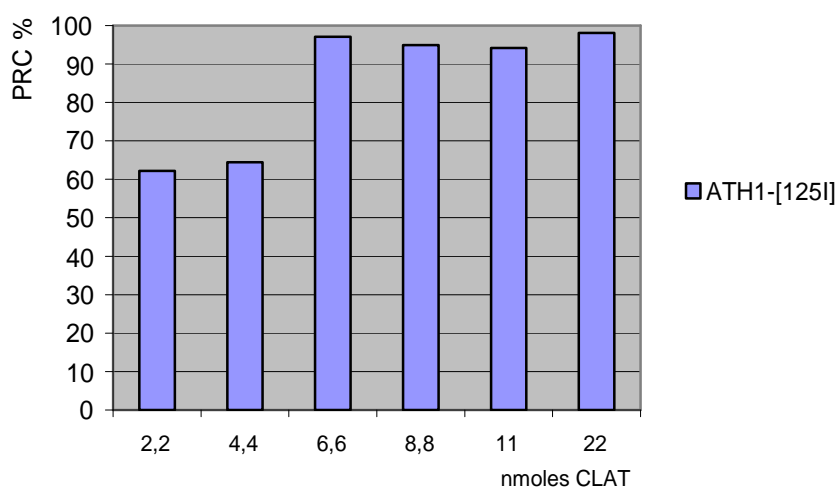


Figure 35 : Influence de la concentration en chloramine-T sur la pureté radiochimique de ATH1-[¹²⁵I]. Peptide 10 µg : 3,4 nmoles ; NaI : 0,156 nmoles. Mesure de la PRC sur plaque de silice RP₆₅₄, solvant acétonitrile/ eau (65/35).

L'analyse par CLHP d'un mélange peptide/chloramine-T (100 µg de peptide pour 22 nmoles de chloramine-T), n'a pas montré de dégradation du peptide, dégradation qui aurait pu résulter de l'action oxydante de la chloramine-T. Un seul pic de radioactivité est observé en CLHP.

- Marquage au N-bromosuccinimide

Pour un temps de réaction de 15 minutes et une quantité de 10 µg (3,4 nmoles) de ATH1, la quantité optimale de N-Bromosuccinimide à ajouter à la solution est de 28 nmoles (5 µg) pour obtenir un rendement de marquage supérieur à 95% (Tableau II).

Peptide	NSB en µg				
	1	2	3	4	5
ATH1-[¹²⁵ I]	5,38%	40,53%	68,21%	94,92%	97,95%

Tableau II : Optimisation de la réaction de radioiodation de ATH1 par la méthode au NBS : mesure de la PRC en présence de quantités croissantes de NBS.

- Marquage par la lactoperoxydase

La réaction de marquage dépend de la concentration en enzyme et en peroxyde d'hydrogène. Un taux de 1 µg (12 pmoles) de lactoperoxydase pour 6 µg (160 nmoles) de peroxyde d'hydrogène est préconisé pour le marquage de ATH1, soit, un rapport de 1/6 M/M) pour obtenir un rendement supérieur à 90% (Tableau III). Le taux de lactoperoxydase de 1 µg est une valeur seuil car si de dernier est divisé environ par deux la PRC n'est plus que de 22,2% alors que si ce taux augmente la PRC n'est pas modifiée.

Peptide µg	lactoperoxydase en µg	H ₂ O ₂ 30% en µg	PRC %
10	2	0,2	0,09
10	0,4	2	15,8
10	0,4	3	16,4
10	0,4	6	22,2
10	1	6	98,7
10	2	6	97,5
10	3	6	98,7
10	4	6	98,1

Tableau III : Optimisation de la réaction de marquage à l'iode de ATH1 par la méthode à la lactoperoxydase : influence de la concentration du couple enzyme/péroxyde d'hydrogène sur la pureté radiochimique.

I-1-1-2) Essai de stabilité dans les solvants

▪ Le peptide marqué reste stable pendant 24 heures dans de nombreux solvants : solution aqueuse, NaCl 0,9%, tampon phosphate pH 7,4 et dans le milieu de culture RPMI (PRC > 97%). Après 48 heures de conservation, on voit apparaître de l'iode libre et des pics intermédiaires. Paradoxalement, en milieu tampon phosphate (PBS), le pourcentage d'iode libre est plus important qu'en milieu NaCl 0,9%. Or, le chlorure de sodium ne doit théoriquement pas être utilisé comme solvant de dilution en raison du risque de réaction d'échange entre les atomes de chlore en excès et l'isotope.

▪ Après incubation 3 heures à 37°C en solution aqueuse, la molécule iodée reste stable.

I-1-2) Préparation et analyse de B2702(84-75)-[¹²⁵I] (ATH2-[¹²⁵I])

I-1-2-1) Paramètres de la réaction de marquage

▪ Les expériences réalisées avec le peptide ATH2-[¹²⁵I] ont montré que le radiomarquage peut être réalisé avec la méthode à la chloramine-T ou au NBS avec une activité spécifique de 3,1 TBq/mmmole pour une pureté radiochimique supérieure à 95%. Le choix se porte vers ces deux oxydants car la réaction est réalisable en une seule étape au contraire de la réaction d'oxydation à la lactoperoxydase.

▪ Si 10 µg et 5 µg (3 et 1,5 nmoles) de ATH2 sont incubés en présence d'une solution d'iodure de sodium Na-[¹²⁵I] à 18,5MBq et en présence de 22 nmoles de chloramine-T (dilution à 1 mg/ml), la pureté radiochimique, après 15 minutes d'incubation, est supérieure à 95% et 90% respectivement.

▪ La molécule iodée est purifiée sur colonne échangeuse d'anions mais plus de 50% du produit reste fixé sur la colonne. La purification a aussi été réalisée sur colonne échangeuse de cations avant réduction par le pyrosulfate. Le produit marqué est purifié mais avec un taux de récupération faible de 30%.

I-1-2-2) Stabilité dans les solvants de ATH2-[¹²⁵I]

ATH2-[¹²⁵I] est soluble dans de nombreux solvants : solvants aqueux, acétonitrile, acétate d'éthyle, méthanol, éthanol 95°.

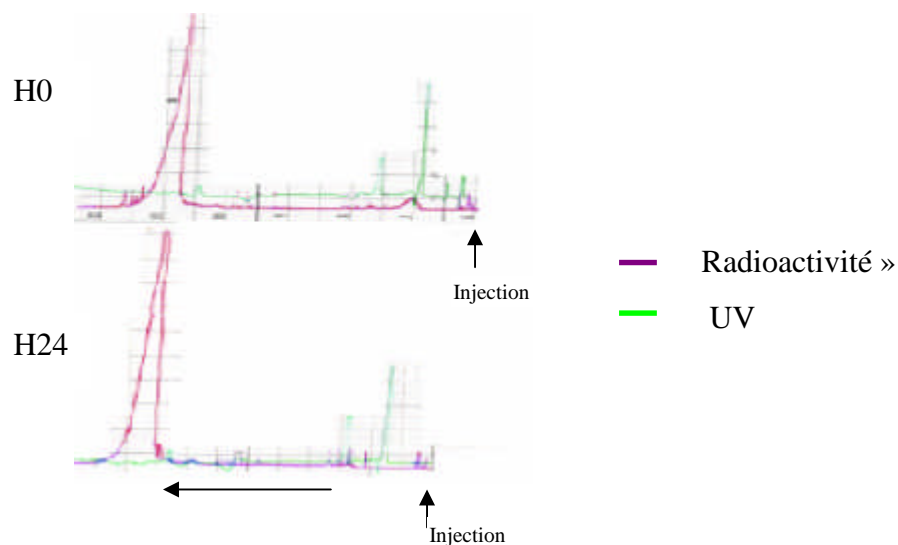


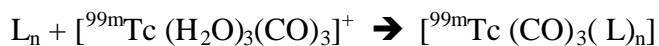
Figure 36 : Etude de stabilité de ATH2- $[^{125}\text{I}]$ en solution aqueuse sur 24 heures. Conservation pendant 24 heures à $+4^\circ\text{C}$ - $+8^\circ\text{C}$. Analyse à H0 et H24. Analyse par CLHP sur colonne C18 Bondapak ; gradient (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) 90/10 (A) / eau-TFA 0,1%(B), de 0 à 5 mn 20% de A, de 5 à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité (Sonde gamma Novelec).

- La molécule iodée, conservée à 4°C en flacon serti fermé, est stable pendant 24 heures dans de nombreux solvants : eau purifiée (Figure 36), NaCl 0,9%, tampon phosphate pH 7,4 et dans le milieu de culture RPMI. La pureté radiochimique est toujours supérieure à 97%.
- Après 48 heures d'incubation, de l'iode libre et des pics intermédiaires apparaissent. En solution aqueuse, l'analyse par CCM et CLHP donne une pureté radiochimique de 90% ; elle diminue autour de 80% en présence de sérum physiologique et de tampon phosphate.
- Après incubation pendant 3 heures à 37°C en milieu NaCl 0,9%, la molécule iodée reste stable.

I-2) Etude de la réaction de marquage des ligands au technétium 99m

I-2-1) Paramètres de la réaction de marquage de B2702(84-75)-H- $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ (ATH3- $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$)

Différents paramètres de la réaction de marquage sont étudiés afin d'améliorer le rendement de marquage et la pureté radiochimique du traceur : température, volume de dilution, durée d'incubation, concentration en réactif.



- Effet de la température sur la pureté radiochimique

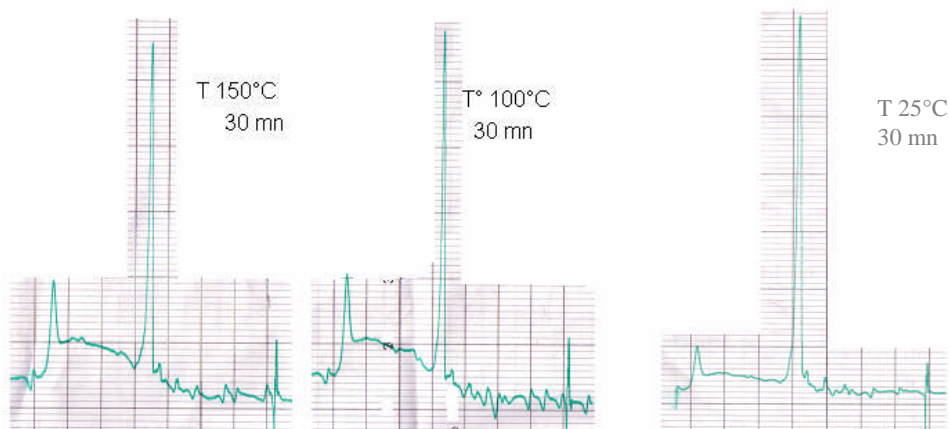


Figure 37 : Etude de la stabilité à la chaleur de ATH3. Incubation en présence de NaCl 0,9% à 100°C ou 150°C pendant 30 minutes. Analyse par CLHP sur colonne C18 Bondapak ; (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) 90/10 (A) / eau-TFA 0,1% (B), de 0 à 5 mn 20% de A, de 5 à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détection UV à 210 nm.

- L'analyse CLHP du peptide froid montre que la molécule n'est pas dégradée après 30 minutes d'incubation à 150°C (Figure 37). La réaction de marquage peut être réalisée à 100°C afin d'augmenter la cinétique de complexation du peptide avec le synthon tricarbonyle.

- Une pureté radiochimique supérieure à 95% est obtenue soit après 210 minutes d'incubation lorsque la réaction de marquage est réalisée à température ambiante, soit après 20 minutes d'incubation à 60°C (n=3). Cette valeur est toujours supérieure à 95% avec 2 contrôles supérieurs à 98% si la solution est incubée à 80°C pendant 15 minutes (n=3).

- Détermination de l'activité spécifique

- Lorsque la réaction de marquage est réalisée en présence de 370 MBq de solution technétée, la quantité minimum de peptide ATH3 à ajouter est de 50 µg (34 nmoles). Avec seulement 25 µg de peptide, on observe non seulement la présence de tricarbonyle technétié (> 10%) mais aussi de un à deux métabolites intermédiaires en fonction des échantillons.

- En présence de 1110 MBq de technétium 99m, la pureté radiochimique est supérieure à 95% si le marquage est réalisé avec 100 µg de peptide (68 nmoles). L'activité spécifique de la molécule marquée est de 16GBq/µmole.

- Il est probable qu'en présence d'un faible taux de lysine, les molécules d'eau de l'intermédiaire technétié s'échangent avec des atomes donneurs d'électrons d'autres acides aminés comme les azotes de l'histidine ou de l'arginine.

- Influence du pH sur la pureté radiochimique

Le lyophilisat de peptide est dilué dans une solution d'eau purifiée ou dans des solutions tampons phosphate de pH croissant (de pH 4 à pH 9).

- La recherche par CCM d'impuretés hydrophiles (pertechnétate de sodium essentiellement) en présence de la phase mobile NaCl 0,9%, montre un pourcentage d'impuretés inférieur à 5% quel que soit le pH. En présence de la phase mobile acétonitrile/eau (80/20), le pourcentage d'impuretés, correspondant à $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH})_2]_3^+$, est de 5% de pH 5 à pH 8 mais ce taux passe à 30% à pH 4 et à 25% à pH 9.

La réaction de marquage est réalisable sur une large gamme de pH, de pH 5 à pH 8. A pH 4 et pH 9, une diminution de la pureté radiochimique avec une PRC inférieure à 70% en CCM est observée (Figure 38).

- Les mêmes résultats sont observés en CLHP. Pour le mélange incubé à pH 4, nous observons un métabolite technétié correspondant vraisemblablement au synthon tricarbonyle technétié ainsi qu'un métabolite inconnu. Cependant la surface et la hauteur du pic de ATH3- $[^{99m}\text{Tc}]$ et de ATH3 (mesure UV) incubés à pH 4 sont très inférieures à celles observées de pH 5 à pH 8. Cet effet s'observe, mais dans une moindre mesure, à pH 9. Il est probable que les peptides technétiés et non technétiés précipitent à pH très acide.

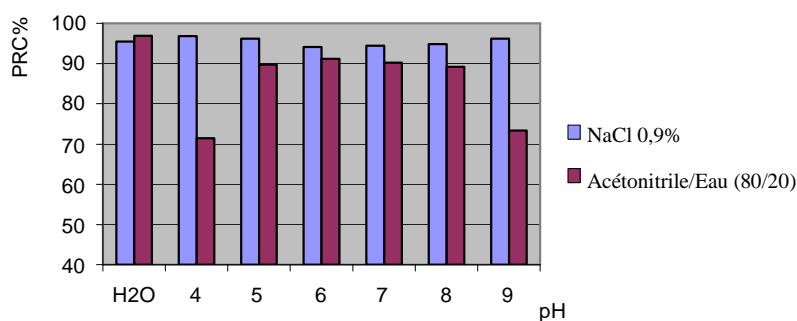


Figure 38 : Optimisation du marquage de ATH3 au technétium 99m. Influence du pH de la solution sur la pureté radiochimique. Mesure des impuretés par chromatographie couche mince sur plaque de silice C18 en présence de NaCl 0,9% (NaCl) ou d'un mélange acétonitrile/eau 80/20.

- Influence du solvant

- A pH 7, la pureté radiochimique est légèrement inférieure si le peptide est dilué dans une solution tampon phosphate plutôt que dans de l'eau purifiée : 90% contre 95% respectivement.

I-2-2) Paramètres de la réaction de marquage de [B2702(84-75)]4-Raft-H-[^{99m}Tc] (ATH4-[^{99m}Tc])

- ATH4 est beaucoup moins soluble que ATH3. Une dilution du peptide à 100 µg pour 620 µl de solution aqueuse est nécessaire afin de dissoudre le lyophilisat. Le volume de solution tampon phosphate (PBS) nécessaire pour solubiliser ATH4 est plus important que celui de la solution aqueuse ou d'une solution de chlorure de sodium 0,9% : une dilution à 100 µg/800µl est nécessaire pour obtenir une solution limpide.

- L'analyse de la dégradation du peptide après incubation au bloc chauffant à 100°C et 150°C pendant 15 minutes montre que le peptide se dégrade à la chaleur. Cette dégradation est d'autant plus importante que le volume de dilution est faible. C'est pourquoi il a été décidé de tester la réaction de marquage à une température maximum de 80°C, et dans un volume minimum de 1 millilitre.

- 50 µg de peptide sont marqués par 370 MBq de solution d'Isolink® technétée après incubation à 80°C pendant 15 minutes au bloc chauffant, en flacon fermé et serti. La préparation est analysée à T0, T30 et T60 minutes après la phase de chauffage. La pureté radiochimique mesurée sur deux CCM sur plaque de silice C18 RP₆₅₄ avec comme premier solvant d'élution NaCl 0,9% et comme deuxième éluant un mélange acétonitrile/eau (80/20) est de 22% à T0, 42% à T30 et 60% à T60 minutes.

- La même réaction est effectuée dans un volume final de un millilitre avec dilution initiale du peptide dans 500 µl d'eau purifiée. La pureté radiochimique après 15 minutes d'incubation à 80°C puis 20 minutes à température ambiante, ou après 20 minutes d'incubation à 80°C puis 30 minutes à température ambiante, est de 80% et 90% respectivement.

Nous avons choisi de marquer 50 µg de ATH4 par 370 MBq de solution de tricarbonyle technétié précédemment neutralisée à pH 7-8. La préparation est incubée à 80°C pendant 15-20 minutes maximum puis à 25°C pendant 30 minutes.

Le marquage technétié de tous les dérivés Raft n'est réalisable qu'avec une activité volumique faible. Un volume minimum de 1 millilitre est nécessaire pour obtenir un bon rendement de marquage et une pureté radiochimique supérieure à 90%.

I-2-3) Conditions de conservation des peptides marqués

La complexation est réalisée dans une solution de NaCl 0,9% (éluat et solvant de dilution).

- Le complexe technétié ATH3-[^{99m}Tc] peut être conservé pendant 3 heures à température ambiante sans que sa pureté radiochimique ne soit modifiée. Après 6 heures d'incubation, la pureté radiochimique est toujours supérieure à 90%. Le produit est toujours injectable.

- Le complexe ATH4-[^{99m}Tc], en solution dans un milieu NaCl 0,9% et à température ambiante est stable pendant 3 heures. Le pourcentage d'impuretés technétiées, tricarbonyle technétié et pertechnétate, augmente progressivement au cours du temps, d'environ 2% par heure. Après trois heures de conservation à température ambiante, la pureté radiochimique est en moyenne inférieure à 90% et la molécule n'est plus injectable.

A 24 heures, l'analyse CLHP de la préparation conservée au réfrigérateur identifie ATH4-[^{99m}Tc], produit majoritaire (70%), du pertechnétate (10%), et deux métabolites.

I-2-4) Conclusion

50 µg de peptide lyophilisé ATH3 ou ATH4 sont marqués par 370 MBq de solution d'Isolink[®] technétié à pH 8. La solution est incubée au bloc chauffant pendant 15 minutes à 80°C. Elle peut être conservée 3 heures à température ambiante.

Le marquage de ATH3-[^{99m}Tc] est spécifique avec un bon rendement de marquage et une pureté radiochimique supérieure à 95%. La cinétique de complexation de ATH3 est rapide et reproductible. Un seul composé est observé. Par contre la cinétique de complexation de ATH4 est plus lente et les conditions de marquage : température, temps, volume doivent être maîtrisées pour obtenir un produit, avec une PRC supérieure à 90%. Le marquage est stable en solution aqueuse pendant 6 heures, ce qui permet une utilisation sur la journée de travail.

La stabilité du marquage en relation avec les mécanismes de transchélation sera analysée lors des études du métabolisme réalisées *in vitro* (Chapitre II).

I-3) Comparaison des méthodes de marquage

Les résultats tendent à montrer que la liaison de l'iode sur la tyrosine est rapide et stable. Les peptides ATH1 et ATH2 se marquent facilement avec un bon rendement de marquage, ne nécessitant pas la séparation de l'iodure libre. Cependant l'adsorption aux matériaux du peptide ATH1 perturbe l'ensemble des opérations et ne nous permet pas de séparer les constituants, si nécessaire. La réaction de marquage à l'iode par substitution en présence de chloramine-T est plus rapide et plus simple à mettre en œuvre que la méthode de marquage au technétium 99m par l'intermédiaire du synthon carbonyle. En effet, le marquage technétié nécessite deux étapes de chauffage et un temps de préparation d'au moins 30 minutes (Tableau IV).

La liaison de l'iode à son ligand est stable pendant au moins 24 heures. Ce facteur permet une fabrication industrielle et n'oblige pas, en radiopharmacie, à une préparation extemporannée et pour un seul patient. Les molécules technétiées sont moins stables mais la durée de conservation sur 3 heures permet la préparation et l'utilisation d'un flacon multidose (Tableau IV).

Les peptides technétiés présentent une activité spécifique beaucoup plus importante que les peptides iodés et plus favorable à une reconnaissance de la cible (Tableau IV).

	ATH1-[¹²⁵ I]	ATH2-[¹²³ I]	ATH3-[^{99m} Tc]	ATH4-[^{99m} Tc]
Durée de la réaction	15 mn	15 mn	30 mn	60 mn
Stabilité des préparations	24 H 4°C-8°C	48 H 4°C-8°C	8 H 4°C-24°C	3 H 24°C
Activité spécifique	5,25 GBq/μmole	3,1 GBq/μmole	23 GBq/μmole	37 GBq/μmole

Tableau IV : Comparaison des paramètres des réactions de marquage à l'iode ou au technétium 99m des dérivés de B2702(84:75). Etude de la durée de réaction, de la stabilité du marquage et de l'activité spécifique.

II ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

II-1) Propriétés physico-chimiques de B2702(75-84/84-75)-[¹²⁵I] (ATH1-[¹²⁵I])

- Fixation non spécifique deATH1-[¹²⁵I]

▪ Le peptide ATH1-[¹²⁵I] s'adsorbe sur le matériel. Ainsi, 30 à 50% de la radioactivité après marquage persiste sur les tubes à hémolyse en verre et 30% sur les tubes en PVC et ce d'autant plus que le volume de solution est faible. On observe aussi une fixation non spécifique sur les cônes plastiques et les embouts plastiques des pipettes. Ceci nous a conduit à augmenter la quantité de produit préparée. Le second inconvénient de cette fixation non spécifique est une variation dans la distribution des doses injectées.

▪ Ce même inconvénient a été observé lors des analyses chromatographiques : si l'iode libre peut être extrait de la solution par chromatographie sur colonne, le peptide marqué reste fixé sur la colonne quel que soit l'éluant testé et quelle que soit la colonne : colonne Sep-Pak C18 ou colonne d'exclusion Sephadex G5. L'étude des temps de rétention du peptide en CLHP phase inverse sur colonne C18 20 cm, avec un gradient d'élution acétonitrile-TFA 0,1% (A) / eau-TFA 0,1% (B), de 20 à 80% de A en 45 minutes, donne pour le peptide iodé un temps de rétention de 40 minutes. Sur une colonne phase inverse C4, le temps de rétention est de 15 minutes.

- Etude du coefficient de partage de ATH1-[¹²⁵I]

La répartition de la molécule entre la phase octanolique et la phase aqueuse (tampon phosphate) détermine le caractère hydrophile ou hydrophobe du peptide radiomarké. En effet, la fixation de l'iode, halogène hydrophobe, peut modifier les propriétés physico-chimiques du vecteur.

L'analyse montre que le produit est légèrement hydrophile. Le coefficient de partage varie peu en fonction du pH, sauf à pH 7 où une diminution de la liposolubilité est observée (Tableau V).

pH	$p = [C]_{\text{Oct}} / [C]_{\text{H}_2\text{O}}$	Log (P)
4	0,05	-1,30
6,2	0,04	-1,43
6,8	0,05	-1,26
7	0,02	-1,70
7,2	0,04	-1,38
7,6	0,04	-1,38
8	0,04	-1,44

Tableau V : Etude du coefficient de partage de ATH1-[¹²⁵I] en milieu octanol/eau. Etude des variations de $K = \text{Log} (P)$ en fonction du pH de la phase aqueuse.

- Etude du point isoélectrique de la molécule iodée

- L'analyse du point isoélectrique par électrophorèse d'isofocalisation donne pour ATH1-[^{125/127}I] un pKi de 8,3. La molécule est légèrement basique. La révélation du peptide par colorimétrie montre un seul spot. Le produit iodé est pur et n'est pas dégradé par la chloramine-T.

II-2) Propriétés physico-chimiques de B2702(84-75)-[¹²⁵I] (ATH2-[¹²⁵I])

II-2-1) Mesure du coefficient de partage

- La molécule ATH2-[¹²⁵I] est hydrophile avec un coefficient de partage ($K = \log(P)$) voisin de -3,9 à pH physiologique (Tableau VI). Le coefficient de partage n'est pas modifié pour des valeurs de pH comprises entre pH 4 et pH 7,2, puis il diminue légèrement à partir de pH 7,2, et en milieu basique.

ATH2-[¹²⁵I] est plus soluble en milieu aqueux que son homologue dimérique (Figure 39).

pH	ATH2-[¹²⁵ I]	
	P = [C] _{Oct} / [C] _{H2O}	log (P)
4	0,0001	-3,92
6,2	0,0001	-3,91
6,8	0,0001	-3,96
7	0,0001	-3,93
7,2	0,0001	-3,90
7,6	0,0001	-3,83
8	0,0002	-3,62

Tableau VI : Mesure du coefficient de partage octanol/eau de B2702(84-75)-[¹²⁵I] en fonction du pH de la solution aqueuse.

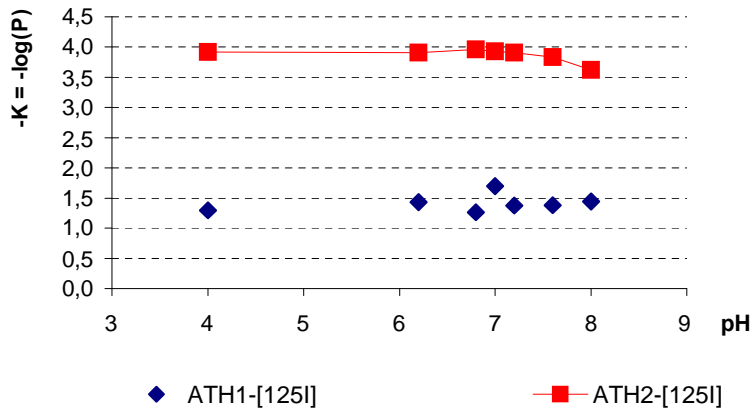


Figure 39: Mesure du coefficient de partage octanol/eau en fonction du pH des solutions aqueuses de ATH1-[¹²⁵I] et ATH2-[¹²⁵I].

II-2-2) Fixation cellulaire et protéique de B2702(84-75)-[¹²⁵I] (ATH2-[¹²⁵I])

- Le produit natif présente un rendement de marquage de 96,5%. Il est incubé 30 minutes en présence de sang total. Après centrifugation à 2000 T/mn pendant 15 minutes, 63% de l'activité est retrouvée dans le sérum et 37% dans les globules rouges (n=3). Le sérum est recueilli et les protéines sont précipitées par l'ajout d'une solution d'acide trichloracétique 10% : 18% de l'activité est retrouvée dans le culot protéique. L'analyse du surnageant par CLHP conclut que 80,61% de l'activité est retrouvée sous forme de ATH2-[¹²⁵I].

Il existe une fixation non spécifique cellulaire qui n'est pas négligeable, par contre la fixation protéique est faible, plus de 80% du produit étant retrouvé sous forme libre dans le plasma.

- Cependant, lors de l'étude de l'affinité de ATH2-[¹²⁵I] pour son récepteur par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en présence ou non de sérum albumine bovine (Chapitre II-1-3), une fixation à l'albumine (BSA) a été observée (Figure 41).

II-2-3) Affinité de B2702(84-75)-[¹²⁵I] (ATH2-[¹²⁵I]) pour VCAM-1

Nous avons réalisé une électrophorèse d'affinité sur gel retard en présence et en l'absence de VCAM-1 et de sérum albumine bovine (BSA). Le ligand et son récepteur sont présents en concentrations équimolaires alors que des concentrations croissantes de sérum albumine bovine sont ajoutées dans chaque puits.

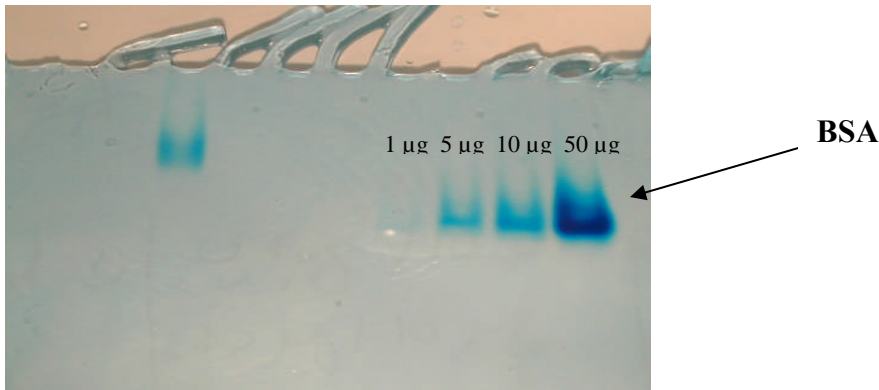


Figure 40 : Migration de la BSA sur gel retard de polyacrylamide. Coloration des peptides et protéines au bleu de bromophénol et bleu de xylène

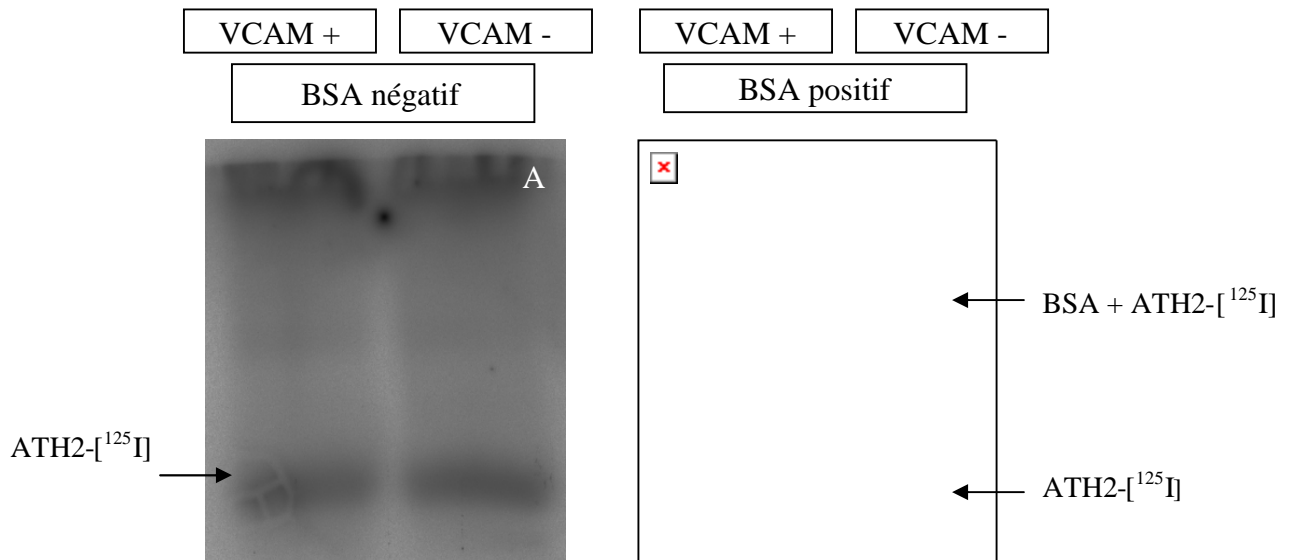


Figure 41: Contrôle de l'affinité de B2702(84-75)-[125I] pour VCAM-1. B2702(74-85)-[125I] est incubé en présence de son récepteur VCAM-1 en concentration équimolaire, en l'absence (gel A) ou en présence (gel B) de concentrations croissantes de BSA. Electrophorèse retard sur gel de polyacrylamide 4%-20%. Détection par autoradiographie et lecture au phospho-imager.

Théoriquement, la liaison du peptide à son récepteur entraîne la formation d'un complexe radioactif de poids moléculaire élevé. Ce dernier doit présenter une bande de migration retardée par rapport au ligand radiomarqué seul. Nous n'observons pas de différence de migration du peptide marqué, qu'il ait été incubé en présence ou en l'absence de son récepteur VCAM-1. En revanche, lorsque de la BSA est ajoutée dans les puits, une bande radioactive est observée au phospho-imager. Cette bande est localisée au niveau de la bande de migration de l'albumine. Une partie du peptide est fixée à l'albumine (ROI = 30% de l'activité totale des deux bandes) et migre en même temps que cette dernière.

II-3) Caractéristiques physico-chimiques des peptides technétiés

II-3-1) Mesure du coefficient de partage

- Le coefficient de partage de ATH3-[^{99m}Tc], $K = \text{Log } P$, est de -1,07 à pH 4 et de -1,08 à pH 7,4 : la molécule est hydrophile.
- Le coefficient de partage de ATH4-[^{99m}Tc], $K = \text{Log } P$, est de -0,45 à pH 4 et de -0,45 à pH 7,4. Si nous mesurons le coefficient de partage sur les deux milieux issus de la première expérience, nous observons une légère diminution du coefficient de partage (Tableau VII). La molécule est légèrement hydrophile.

	pH 4			pH 7,4		
	Activité ^{99m} Tc en KBq		K	Activité ^{99m} Tc en KBq		K
	Octanol	Eau		Octanol	Eau	
ATH4-[^{99m} Tc]	74,4	209,0	-0,45	84,0	235,3	-0,45
ATH4-[^{99m} Tc] 2 nd passage	82,9	183,5	-0,34	102,1	189,8	-0,27

Tableau VII : Mesure du coefficient de partage de ATH4-[^{99m}Tc], en milieu octanol/eau à pH4 et milieu octanol/eau à pH 7,4. Mesure de l'activité au compteur gamma en KBq.

II-3-2) Mesure des biodistribution sanguine de B2702(84-75)-H-[^{99m}Tc] (ATH3-[^{99m}Tc]) et [B2702(84-75)]₄-Raft-H-[^{99m}Tc] (ATH4-[^{99m}Tc]).

- ATH3-[^{99m}Tc] est incubé à 37°C sous agitation, pendant un temps déterminé, en présence de sang total humain. Après centrifugation, 85% de l'activité totale est retrouvée dans le sérum et 15% dans le culot de globules rouges. L'hématocrite est mesuré à 42%. Le taux de captation cellulaire augmente progressivement au cours du temps de 15 à 18% de 30 minutes à 3 heures d'incubation (Figure 42).

Après précipitation des protéines sériques par une solution d'acide trichloracétique 10%, 7 à 15% de l'activité est retrouvée dans le culot peptidique et plus de 85% du peptide marqué persistent sous forme libre dans le sérum. Comme le dérivé peptidique marqué à l'iode, ATH3-[^{99m}Tc] est retrouvé majoritairement sous forme libre dans le sérum.

- Le peptide technétié ATH4-[^{99m}Tc] est présent majoritairement dans le sérum. L'activité présente dans les éléments figurés du sang est peu importante, 80 % de l'activité est retrouvée dans le sérum et ce quelle que soit la durée d'incubation du peptide dans le

sang (Figure 43). Par contre dans le sérum, le peptide est retrouvé essentiellement sous forme liée aux protéines plasmatiques, et ce quelle que soit la durée d'incubation. Dès la première heure d'incubation, 80% de l'activité est retrouvée sous forme liée aux protéines plasmatiques (Figure 43).

Afin de vérifier que le peptide ATH4-[^{99m}Tc] ne précipite pas en présence de TCA 10%, la fixation aux protéines plasmatiques est déterminée, dans un second temps, par filtration. Une fraction du sang total est filtrée sur filtre Nanosep 10K à 9000 G pendant 30 minutes, et le filtre et le filtrat sont mesurés au compteur gamma. A 1 heure d'incubation, 93% de l'activité est dans le filtre et 7% de l'activité est recueillie dans le filtrat.

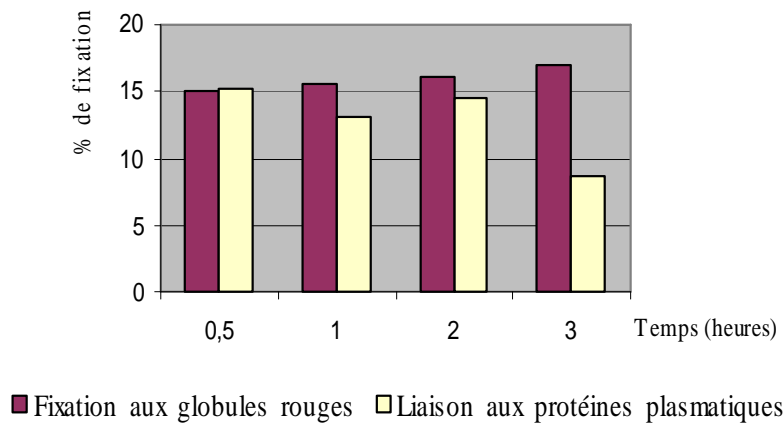


Figure 42 : Biodistribution sanguine *in vitro*. Détermination de la liaison de ATH3-[^{99m}Tc] aux globules rouges et aux protéines plasmatiques.

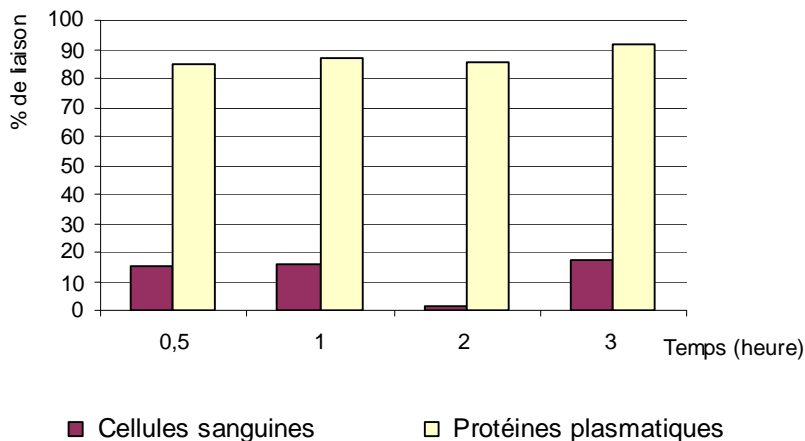


Figure 43 : Pourcentage de liaison de ATH4-[^{99m}Tc] aux cellules sanguines et aux protéines plasmatiques en fonction de la durée d'incubation. Mesure de l'activité au compteur gamma (Cobra).

II-4) Conclusion

Les molécules iodées sont plus hydrophiles que les molécules technétiés (Tableau VIII) mais différents facteurs peuvent modifier la lipophilie du traceur :

- Le choix de l'isotope. La molécule iodé ATH2 [¹²³I] est beaucoup plus hydrophile que ATH3-H-[^{99m}Tc] alors que la structure peptidique est identique. Le groupement [^{99m}Tc(CO)₃] augmente la lipophilie du traceur.
- Le nombre de séquence (84-75) dans la structure peptidique .La forme « monobrin » ATH2 [¹²³I] est plus hydrophile que la forme « double brin » ATH1 [¹²³I] et que ATH4 [¹²³I] avec 4 séquences.
- La structure Raft. De grande taille et plus riche en résidus apolaires, elle augmenterait la lipophilie du traceur.

Le dérivé iodé B2702(84-75)-[¹²³I] est plus largement fixé aux cellules sanguines (fixation sur la membrane plasmique ou passage transmembranaire) par rapport aux molécules technétiées. Cependant, la structure Raft-H-[^{99m}Tc(CO)₃] est responsable d'une importante fixation non spécifique aux protéines plasmatiques (Tableau IX).

	ATH1-[¹²⁵ I]	ATH2 [¹²³ I]	ATH3-H-[^{99m} Tc]	ATH4-Raft-H- [^{99m} Tc]
P	-1,7	-3,9	-1,07	-0,45
[Oct]/[eau]	2/100	0,01/100	9/100	35/100

Tableau VIII : Propriétés physico-chimiques des molécules marquées. Mesure du cCoefficient de partage P (P= Log ([octanol]/[eau])) à pH 7,4.

	ATH2 [¹²³ I]	ATH3-H-[^{99m} Tc]	ATH4-Raft-H- [^{99m} Tc]
Cellules	40 %	15 %	5-15 %
Sérum	60 %	85 %	85-95 %
Fixation protéique	15-20 %	10-15 %	80-90 %

Tableau IX : Propriétés physico-chimiques des molécules marquées. Etude de la répartition sanguine des traceurs.

III) ETUDE DU « METABOLISME » DES PEPTIDES MARQUES

III-1) Etude du « métabolisme » *in vitro*

III-1-1) Métabolisme sanguin de B2702(84-75)-[¹²⁵I] (ATH2-[¹²⁵I]).

▪ En premier lieu nous avons procédé à une étude des produits de dégradation du peptide ATH2-[¹²⁵I] après chauffage à 150°C pendant 30 minutes en milieu HCl pH 1. La solution issue de cette expérience est analysée par CLHP sur colonne C18 Bondapak ; gradient d'élution (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn : 20% de A, de 5 à 20 mn : de 20 à 60% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité (Figure 44).

La quantité de peptide est insuffisante pour permettre une détection UV. Seule la sonde radioactive a permis d'observer la présence de métabolites après dégradation de la molécule. On observe la présence de quelques métabolites moins polaires et d'un pic de radioactivité avec un temps de rétention légèrement inférieur au pic de ATH2-[¹²⁵I]. La présence d'iode libre n'est pas observée.

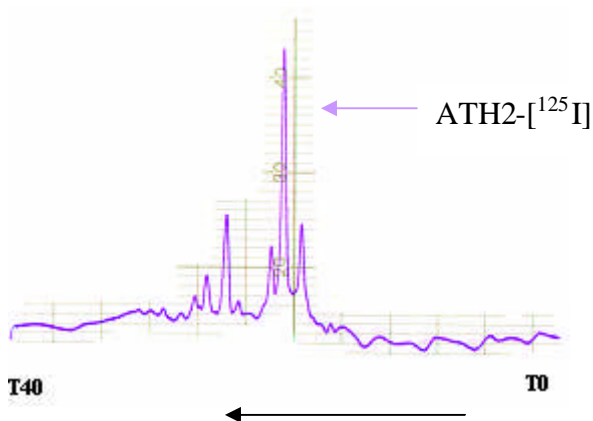


Figure 44 : Etude de la dégradation peptidique de ATH2-[¹²⁵I]. Chauffage dans une solution d'HCl pH 1 pendant 30 minutes à 150°C. CLHP sur colonne C18 Bondapak ; gradient (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn : 20% de A, de 5 à 20 mn : de 20 à 60% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité (Sonde gamma Novelec).

▪ Le produit natif présente un rendement de marquage de 97,5% (CLHP). Il est incubé pendant 5 minutes, 30 minutes et 3 heures en présence de sang total (matériel humain), à 37°C sous agitation. Le sang est centrifugé 15 minutes et le sérum est analysé par CLHP. Après respectivement 5 minutes, 30 minutes et 3 heures d'incubation, 91,4%,

87,9% et 70% de l'activité sérique est retrouvée sous forme de ATH2-[¹²⁵I]. Après 3 heures d'incubation, 20% de l'activité sérique est retrouvée sous forme d'iodure libre (n=3).

III-1-2) Métabolisme *in vitro* de B2702(74-85)-H-[^{99m}Tc] (ATH3-[^{99m}Tc]).

III-1-2-1) Stabilité du marquage *in vitro* : réaction de compétition

Le peptide technétié est mis en présence de ligands ou de chélates susceptibles de rentrer en compétition avec les atomes donneurs du peptide et de lier le métal. La stabilité du complexe initial sera fonction de son affinité pour le synthon tricarbonyle technétié. Différents agents vont être testés : l'éthylène diamine tétraacétique (EDTA), la L-histidine et une solution de sérum de veau fœtal (SVF).

- Compétition en présence d'EDTA

- Dans un premier temps, 2,5 mmoles d'EDTA sont mises en présence soit d'une solution de tricarbonyle technétié (Isolink[®] + ^{99m}TcO₄⁻) pendant 30 minutes à 37°C au bain-marie, soit d'un éluat de technétium 99m. L'analyse chromatographique a montré un pic de sortie de l'EDTA-[^{99m}Tc] à 5,5 minutes. En présence du synthon tricarbonyle technétié, nous observons un pic de sortie à 7,5 minutes (correspondant vraisemblablement à [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺) et un pic de sortie à 26 minutes. L'analyse par spectrométrie de masse de la solution de recueil au pic d'activité n'a pas permis cependant d'identifier ces deux composés.

- Nous n'observons pas de décomplexation du technétium lorsque 1 µg et 10 µg (respectivement 0,67 et 6,67 nmoles) de peptide ATH3 précédemment radiomarqués avec une activité de 7,4 MBq/µg, sont mis en présence de 2,5 nmoles d'EDTA. Le complexe reste stable.

Par contre, en présence de 2,5 mmoles d'EDTA pour 10 µg et 1 µg de peptide, le chélate EDTA déplace le technétium du complexe tricarbonyle. On retrouve en CLHP un pic à 2 minutes pouvant correspondre à du pertechnétate, un pic à 5,5 minutes correspondant au pic de l'EDTA-[^{99m}Tc] et un pic à 18 minutes correspondant au pic de ATH3-[^{99m}Tc]. Le peptide radiomarqué persiste avec une activité correspondant à 30% de l'activité totale.

Dans la première expérience, le rapport molaire peptide/EDTA est d'environ 27/100 ; dans la deuxième expérience, il est de 27/ 10 000.

Le pertechnétate $^{99m}\text{TcO}_4^-$ est présent dans l'éluat à une concentration inférieure à 10^{-6}M . Le marquage de l'Isolink[®] est réalisé avec une concentration volumique supérieure à 3,7 GBq/ml. Dans 740 MBq de technétium 99m, on retrouve entre 0,1 et 0,5 nmole de technétium 99m en fonction de l'activité du générateur et du jour d'éluion ; le rapport entre moles de peptide froid et moles de peptide marqué se situe entre 600/1 et 150/1. Si l'on se place dans les conditions où le rapport peptide froid/peptide- ^{99m}Tc est de 150/1 (0,5 nmole de ^{99m}Tc pour un marquage réalisé le lundi matin), on peut conclure qu'un excès de 500 molécules de chélate EDTA pour une molécule de tricarbonyle technétié lié au peptide ne déplace pas la liaison du métal à son ligand.

- Compétition en présence de L-histidine

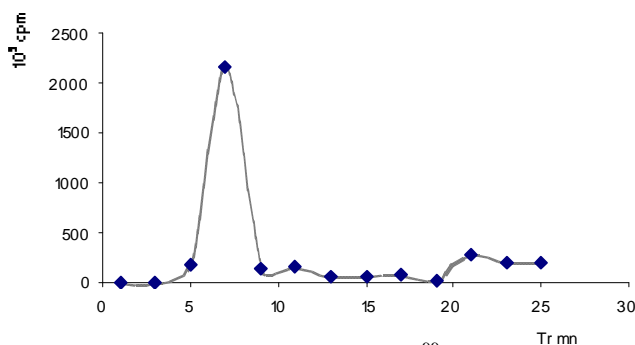


Figure 45 : Stabilité du complexe ATH3- ^{99m}Tc en présence de L-histidine. Incubation de 1 μg (0,67 nmol) de peptide en présence de 2,5 nmol de L-histidine pendant 30 minutes. Analyse par CLHP sur colonne C18, gradient d'éluion acétonitrile / eau, débit 0,7 ml/mn.

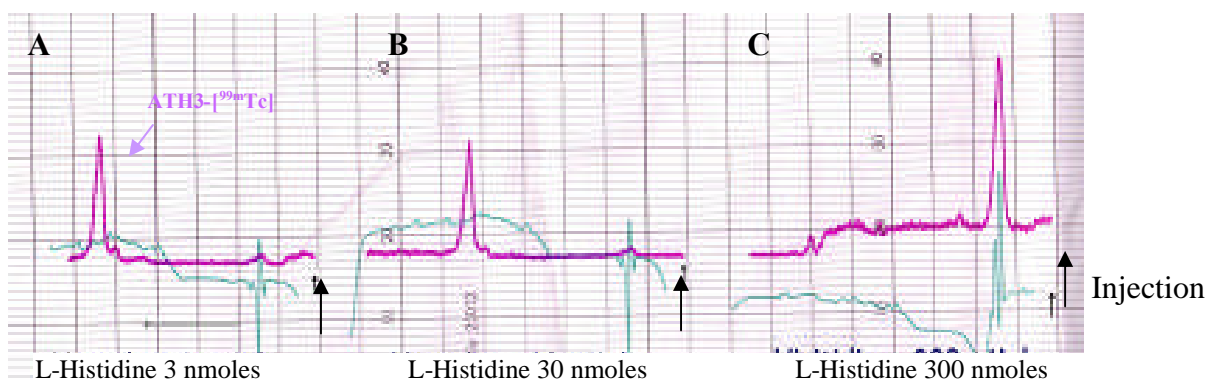


Figure 46 : Stabilité du complexe ATH3- ^{99m}Tc en présence de L-histidine. Incubation de 1 μg (0,67 nmol) de peptide en présence de 3 (A), 30 (B), et 300 nmol (C) de L-histidine pendant 30 minutes. Analyse par CLHP sur colonne C18, gradient d'éluion acétonitrile / eau, débit 0,7 ml/mn

- Si l'histidine est présente à faible concentration dans le milieu, avec un rapport de 4,5 à 45 moles de L-histidine pour 1 mole de peptide, aucune décomplexation n'est observée.

- En présence d'un large excès d'histidine avec un rapport de 450 moles de L-histidine pour 1 mole de peptide, l'acide aminé libre déplace le ligand peptidique du complexe tricarbonyle. On retrouve dans le milieu essentiellement un complexe technétié formé d'histidine radiomarquée (Figures 45 et 46). Le complexe histidine marquée [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})\text{H}$] présente en CLHP un temps de rétention proche de 5 minutes et ne peut donc pas être séparé du pertechnétate. Par contre, en chromatographie couche mince sur silice C18 en présence de solvant NaCl 0,9%, le pertechnétate présente un Rf de 1 alors que l'histidine technétée, [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})\text{H}$], présente un Rf de 0,4-0,5 ce qui nous a permis de l'identifier.

- Compétition en présence de Sérum de Veau Foetal

Le peptide technétié est incubé en présence de 1 ml de SVF à 37°C pendant 90 minutes. Le mélange est purifié par filtration sur filtre Nanosep® 10K. Une aliquote est analysée par CLHP. L'éluat est analysé en sortie de colone par détection UV à 210 nm et détection radioactive.

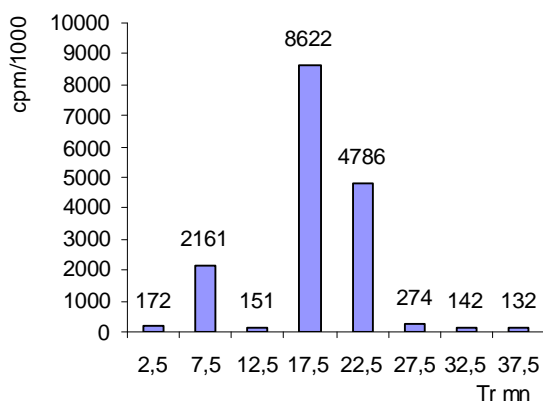


Figure 47 : Stabilité du complexe ATH3- ^{99m}Tc en présence de SVF. Incubation de 1 μg (0,67 nmole) de peptide dans 1 millilitre de SVF à 37°C pendant 90 minutes. Analyse par CLHP sur colonne C18, gradient d'éluat acétonitrile / eau, débit 0,7 ml/mn. Recueil de l'éluat en sortie de colone par fraction de 0,7 ml. Tr ATH3- ^{99m}Tc de 17,5 mn.

- Après 90 minutes d'incubation dans du sérum de veau foetal à 37°C, 50% du peptide marqué sont retrouvés sous forme métabolisée. On observe la présence d'un métabolite avec une activité relative de 10% et un temps de rétention de 7,5 minutes correspondant au carbonyle technétié ainsi qu'un pic à 22 minutes non identifié (Figure

47). En ultraviolet, on observe la présence d'un pic important à 14 minutes correspondant vraisemblablement à de l'albumine.

III-1-2-2) Stabilité du marquage dans le sang

Le peptide radiomarqué est dilué dans 1 ml de sang frais et incubé à 37°C sous agitation afin de reproduire au mieux les conditions *in vivo*. Après centrifugation, le sérum est purifié par filtration à 9500 T/mn sur filtre Nanosep®. Le filtrat est analysé par CLHP à l'aide d'un détecteur UV et d'un détecteur de radioactivité (sonde γ). L'éluat est recueilli en sortie de colonne par fractions de 0,7 ml.

▪ Le peptide est préparé avec une pureté radiochimique supérieure à 95%. Après 1 heure et 3 heures d'incubation dans un échantillon de sang, nous retrouvons environ 80% de l'activité sous forme de ATH3- ^{99m}Tc . La pureté radiochimique ATH3- ^{99m}Tc entre 70 et 80% et ce quel que soit le temps d'incubation (Figure 48). Le marquage est donc relativement stable *in vitro*.

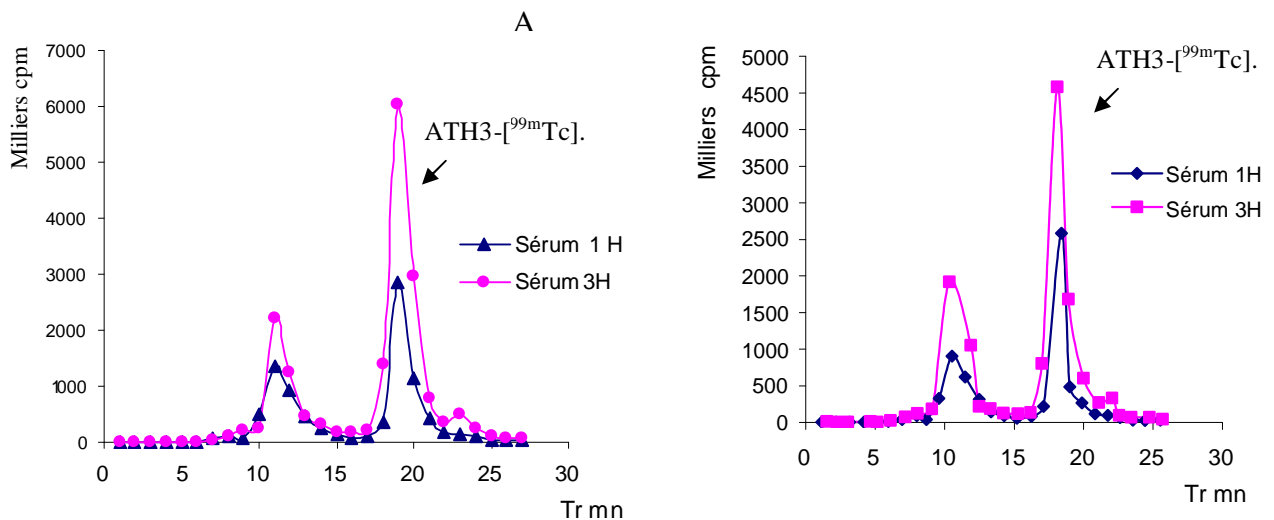


Figure 48 : Stabilité du complexe ATH3- ^{99m}Tc dans le sang. Incubation de 1 μg (0,67 nmole) de peptide dans 1 millilitre de sang à 37°C sous agitation pendant 180 minutes. Analyse du sérum par CLHP sur colonne C18, gradient d'éluant acétonitrile / eau, débit 0,7 ml/mn. Analyse de deux échantillons.

La stabilité du complexe dans le sang humain est meilleure que celle trouvée précédemment en présence de sérum de veau fœtal. En effet, aucun métabolite marqué n'est retrouvé dans le sérum humain. Il est peu probable que les métabolites soient présents dans les éléments figurés du sang mais il est possible qu'ils soient liés aux protéines

plasmatiques retenues par le filtre Nanosep[®] 10K. Cependant, le pourcentage de récupération du filtrat est supérieur à 80% de l'activité totale.

III-1-2-3) Conclusion

Les études de compétition et de stabilité réalisées *in vitro* laissent présager une bonne stabilité du marquage *in vivo*.

III-1-3) Métabolisme *in vitro* du peptide technétié (B2702)4-Raft-H-[^{99m}Tc] (ATH4-[^{99m}Tc])

Les études de compétition n'ont pas encore été réalisées et sont prévues dans les mois qui suivent.

III-1-3-1) Métabolisation sanguine *in vitro*

L'analyse par CLHP d'une aliquote du sérum, prélevée 3 heures après l'incubation de ATH4-[^{99m}Tc] en présence de sang total, met en évidence essentiellement le peptide ATH4-[^{99m}Tc] (85%) et du pertechnétate (10%).

III-2) Etude de la stabilité *in vivo* du traceur : analyses du sang et des urines

Dans un premier temps, les expérimentations ont été réalisées sur le hamster syrien doré afin de valider le modèle animal proposé par l'INRA de Dijon. Ce modèle s'est avéré peu fiable, les animaux présentant peu de plaques d'athérome, et les expérimentations ont été poursuivies chez le lapin « New Zealand White ».

L'étude de la stabilité du marquage du peptide est réalisée à partir de l'analyse des prélèvements sanguins et urinaires et à partir de l'analyse des images par détection externe sur gamma-caméra.

III-2-1) Stabilité *in vivo* de B2702(75-84/84-75)-[¹²⁵I] (ATH1-[I])

▪ L'analyse du sérum de hamster par CLHP montre que le peptide marqué ATH1-[¹²⁵I] est peu métabolisé. 30 minutes après l'injection, nous détectons, par mesure de la radioactivité, la présence de seulement 7 à 10% d'iodure libre et de 80% du peptide iodé natif. La molécule persiste sous sa forme initiale dans le sang.

▪ Dans les urines, nous retrouvons 30% d'impuretés correspondant vraisemblablement à des iodures libres. En effet, un pic de radioactivité apparaît à 5 minutes, temps qui correspond au pic de sortie de l'iodure libre mais qui est proche du volume mort de la colonne. Aucun autre métabolite marqué n'est détecté.

III-2-2) Stabilité *in vivo* de B2702(84-75)-[¹²³I] (ATH2-[¹²³I])

- Analyse CLHP du filtrat de sérum de lapin

▪ Sur un échantillon de sérum de lapin prélevé 1 heure après l'administration du traceur, on retrouve 80 à 85% de la molécule sous sa forme initiale, et entre 15 et 20% d'iodure libre. Aucun métabolite intermédiaire n'est observé par chromatographie avec détection de la radioactivité (n=3).

▪ Sur le sérum prélevé 2 heures après l'administration du traceur, 70% à 78% (n=3) de l'activité est retrouvée sous forme de peptide iodé, et 20% à 30% sous forme d'iodure libre. Aucun métabolite intermédiaire n'est observé. Sachant qu'une fixation thyroïdienne est observée en imagerie à partir de la 80^{ème} minute, et que le produit est majoritairement présent sous forme monoiodée, on peut évaluer que plus de 30% des molécules initialement marquées se sont désiodées

Il existe une désiodation physiologique progressive du peptide environ 1 heure après l'injection du produit.

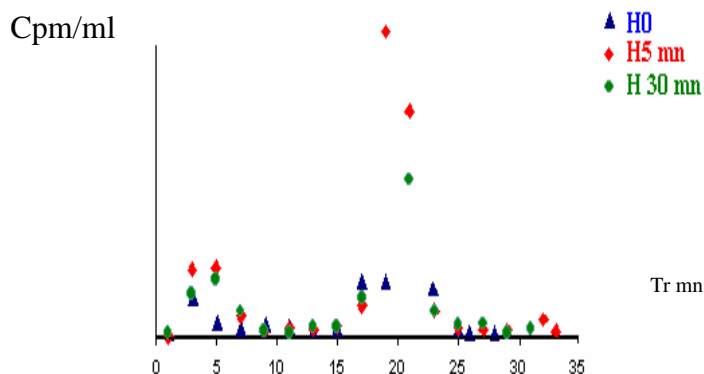


Figure 49 : Analyse du sérum de lapin, avant injection (H0), 5 mn (H5 mn) et 30 mn (H 30 mn) après injection de ATH2-[¹²³I] chez le lapin Watanabe. CLHP colonne C18; gradient (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn : 20% de A, de 5 à 25 mn : de 20 à 60% de A et de 25 à 35 mn : 60% de A ; débit 0,7 ml/mn ; recueil de l'éluat toutes les minutes et comptage des éluats au compteur gamma.

III-2-3) Stabilité *in vivo* B2702(84-75)-H-[^{99m}Tc] (ATH3-[^{99m}Tc]

- Analyses sanguines

L'analyse chromatographique des échantillons de sérum prélevés une heure après l'administration du peptide marqué chez le lapin détecte essentiellement le peptide technétié sous sa forme initiale. Le dérivé tricarbonyle technétié est absent dans le sang. On note la présence d'une faible activité de technétium 99m libre et l'absence de métabolites intermédiaires plus polaires (Figure 51).

L'analyse chromatographique (CLHP) des échantillons de sérum prélevés 3 heures après l'administration du traceur montre un premier pic à 10 minutes correspondant à [^{99m}Tc (H₂O)₃(CO)₃]⁺ ainsi qu'un pic à 18 minutes et un pic à 22 minutes (Figure 52). Il persiste une activité constante en plateau de 27 à 35 mn. L'activité dans la colonne diminue progressivement pour disparaître vers 40 minutes. ATH3-[^{99m}Tc] présente un temps de rétention de 20 minutes à T0 et T1H post-injection et n'est donc apparemment pas retrouvé dans le sérum. Il existe probablement une fixation aux protéines plasmatiques mais il n'a pas été possible de déterminer si le pic à 22 minutes correspond à un métabolite de ATH3-[^{99m}Tc] ou si le radioligand est fixé intact sur les protéines plasmatiques expliquant ainsi l'augmentation du temps de rétention. Le produit s'est dilué dans l'organisme et l'activité plasmatique est faible, la concentration en radioligand des éluats en sortie de colonne est insuffisante pour permettre une analyse par spectrométrie de masse (Figure 52).

- Analyses urinaires

3 heures après l'injection, on ne retrouve pas le peptide ATH3- ^{99m}Tc dans les urines. On observe essentiellement la présence d'un pic à 10 minutes correspondant au pic du complexe tricarbonyle technétié $^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$. Cependant, il peut s'agir de métabolites urinaires polaires ou d'agents chélatants biologiques qui ont déplacé le technétium de sa liaison avec le ligand. Nous retrouvons à 22 minutes le pic d'activité observé lors de l'analyse du sérum à H3 post-injection (Figure 53). Les éluats correspondant aux pics d'activité ont été recueillis en sortie de colonne et analysés par spectrométrie de masse mais aucune molécule n'a pu être identifiée.

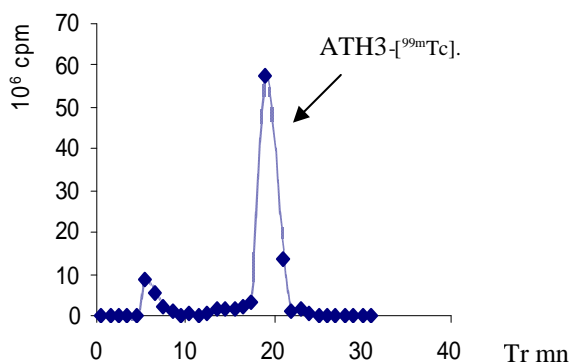


Figure 50 : Radiochromatogramme du produit brut $\text{ATH3-}^{99m}\text{Tc}$. Analyse sur colonne C18 Bondapak. Gradient d'éluion (acétonitrile-TFA0,1%)-(H₂O-TFA 0,1%) (90/10) (A) / H₂O-TFA 0,1% (B) avec de 0-5 mn 20% B, de 5 mn à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% de A. Détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité avec une sonde gamma Novelec. Débit 0,7 ml/mn.

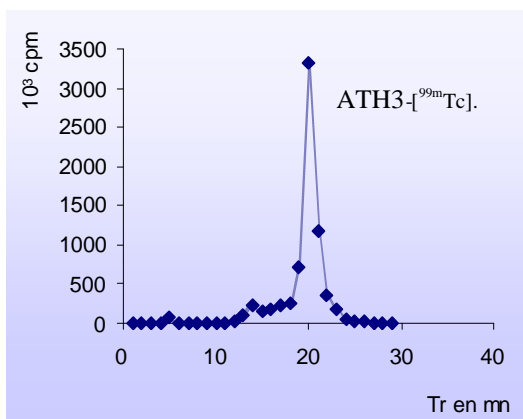


Figure 51 : Radiochromatogramme du plasma de lapin prélevé 1 heure après l'injection du traceur. Analyse sur colonne C18 Bondapak. Gradient d'éluion (acétonitrile-TFA0,1%)-(H₂O-TFA0,1%) (90/10) (A) / H₂O-TFA 0,1% (B) avec de 0-5 mn 20% A, de 5 mn à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% de A. Détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité avec une sonde gamma Novelec. Débit 0,7 ml/mn.

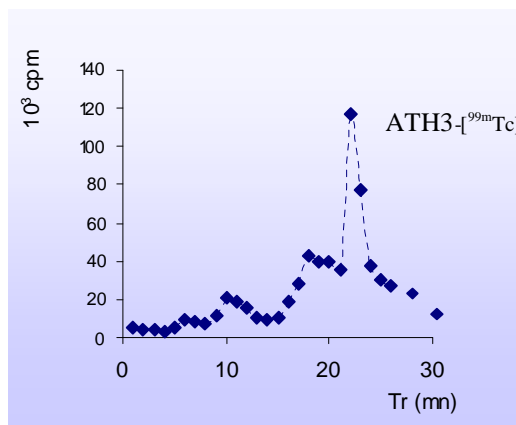


Figure 52 : Radiochromatogramme du plasma de lapin prélevé 3 heures après l'injection du traceur. Analyse sur colonne C18 Bondapak. Gradient d'éluion (acétonitrile-TFA0,1%)-(H₂O-TFA0,1%) (90/10) (A) / H₂O-TFA 0,1% (B) avec de 0-5 mn 20% A, de 5 mn à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% de A. Détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité avec une sonde gamma Novelec. Débit 0,7 ml/mn.

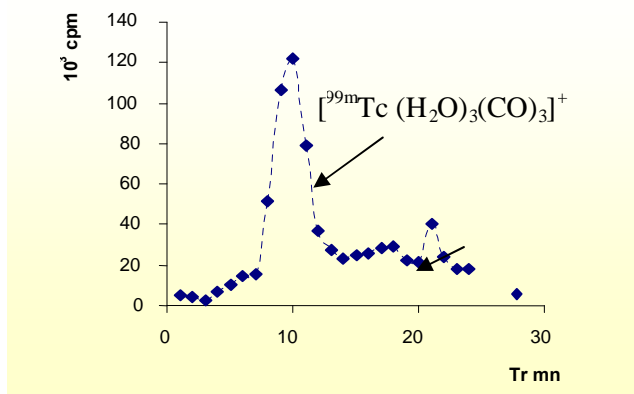


Figure 53 : Radiochromatogramme de l'urine de lapin prélevée 3 heures après l'injection du traceur. Analyse sur colonne C18 Bondapak. Gradient d'élution (acétonitrile-TFA0,1%)-(H₂O-TFA 0,1%) (90/10) (A) / H₂O-TFA 0,1% (B) avec de 0-5 mn 20% A, de 5 mn à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% de A. Détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité avec une sonde gamma Novelec. Débit 0,7 ml/mn.

III-2-4) Stabilité *in vivo* de (B2702)₄-Raft-H-[^{99m}Tc] (ATH4-[^{99m}Tc])

L'analyse par chromatographie des échantillons de sérum, prélevés une heure après l'administration du traceur chez la souris, montre l'absence de dérivé tricarbonyle technétié dans le sang. On note la présence d'une faible activité de technétium 99m libre et l'absence de métabolites intermédiaires plus polaires. Cependant, si la présence du produit de départ est observée, on note un élargissement de la largeur du pic avec apparition d'un pic d'activité à 29 mn.

A 3 heures, le phénomène s'accroît. On observe un premier pic à 27 mn correspondant au produit brut mais il persiste une activité constante en plateau de 29 à 35 mn. L'activité diminue progressivement..

III-3) Conclusion

- B2702(84-75)-[¹²³I] est rapidement désiodé *in vivo*. 2 heures après l'injection du traceur, 30% de l'activité est présente dans le sérum sous forme d'iodure libre. Les images scintigraphiques montrent une fixation thyroïdienne après 80 minutes d'acquisition
- Le complexe B2702(84-75)-H-[^{99m}Tc] est stable jusqu'à 1 heure post-injection. Cependant, il est ensuite rapidement dégradé et 50% de l'activité dans le sérum est retrouvée sous forme métabolisée 3 heures après l'administration intraveineuse. La molécule est éliminée par voie urinaire sous forme « froide », on retrouve essentiellement du pertechnétate dans les urines.

- Le complexe [B2702(84-75)]4-Raft-H-[99mTc] est fortement lié aux protéines plasmatiques. Il ne semble pas métabolisé dans le sang car on ne retrouve pas de technétium sous forme libre ou sous forme carbonyle. Cependant, la forte fixation aux protéines plasmatiques n'a pas permis de réaliser des analyses chromatographiques correctes, le pic correspondant à la molécule marquée s'élargissant progressivement au cours du temps.

IV) EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DES TRACEURS : ETUDES PRECLINIQUES

Dans un premier temps, les expérimentations ont été réalisées sur le hamster syrien doré puis les expérimentations ont été poursuivies chez le lapin « New Zealand White ». Les propriétés physico-chimiques définissent la pharmacocinétique de la molécule. Cette dernière est déterminée à partir des études de cinétiques sanguines et des études de biodistribution.

IV-1) Etudes des cinétiques sanguines

L'objectif est de comparer les cinétiques sanguines de tous les traceurs qu'ils soient marqués à l'iode ou au technétium, et de comparer les peptides en fonction de leur structure chimique et notamment d'étudier l'influence de la structure Raft sur les propriétés pharmacologiques des molécules.

Les cinétiques sanguines des peptides iodés sont présentées dans la figure 54. Les cinétiques sont déterminées chez le lapin « WHHL » et chez le lapin sain « Contrôle ».

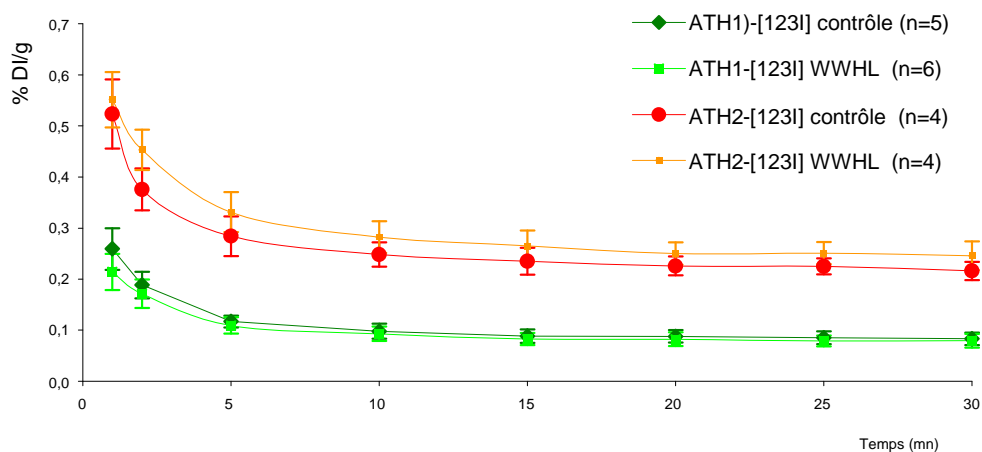


Figure 54 : Cinétiques sanguines de ATH1-[¹²³I] et ATH2-[¹²³I] chez le lapin hypercholestérolémique Watanabe (WHHL) et le lapin « Contrôle ». Analyse sur 30 minutes.

Aucune différence significative n'a été observée entre les animaux « Contrôles » et « WHHL » hyperlipidémiques. L'activité sanguine des traceurs suit une décroissance exponentielle, avec un $T_{1/2}$ de 2,5 minutes pour les deux traceurs. L'activité circulante en ATH1- ^{123}I et ATH2- ^{123}I , 30 minutes après l'injection, représente $34,7 \pm 1,9\%$ et $44,6 \pm 1,2\%$ de l'activité circulante initiale à 1 minute. 10 minutes après l'injection, nous observons pour les deux traceurs une activité circulante en plateau qui décroît faiblement. Cette activité est plus importante pour ATH1- ^{123}I que pour ATH2- ^{123}I ce qui peut conduire à un rapport signal/ bruit plus défavorable pour le premier dérivé peptidique. La demi-vie d'administration des peptides est rapide, la demi-vie d'élimination est lente. Les cinétiques sanguines de ATH2- ^{123}I , ATH3- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ATH4- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sont représentées sur les figures 55 et 56. Aucune différence significative n'est observée entre les animaux « Contrôle » et « WHHL », et seuls les résultats des animaux « Contrôle » sont représentés. Les cinétiques sanguines sont de type bi-exponentiel, avec une composante initiale rapide ($T_{\alpha 1/2} = 2\text{-}4$ mn pour les trois traceurs) suivie d'une composante lente ($T_{\beta 1/2} = 800$ mn pour ATH2- ^{123}I , 135 mn pour ATH3- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, et 500 mn pour ATH4-Raft- $^{99\text{m}}\text{Tc}$).

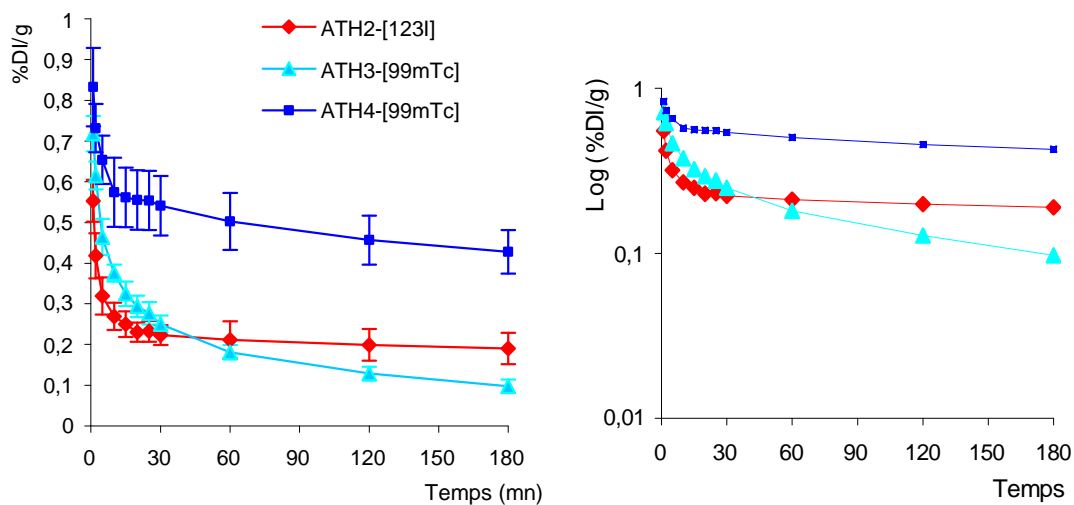


Figure 55 : Comparaison des cinétiques sanguines, chez le lapin « Contrôle », de ATH2- ^{123}I , ATH3- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ATH4- $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Mesure sur 180 minutes en % de la dose injectée (DI) par gramme de sang. Les résultats sont exprimés en %DI/g et en Log (%DI/g).

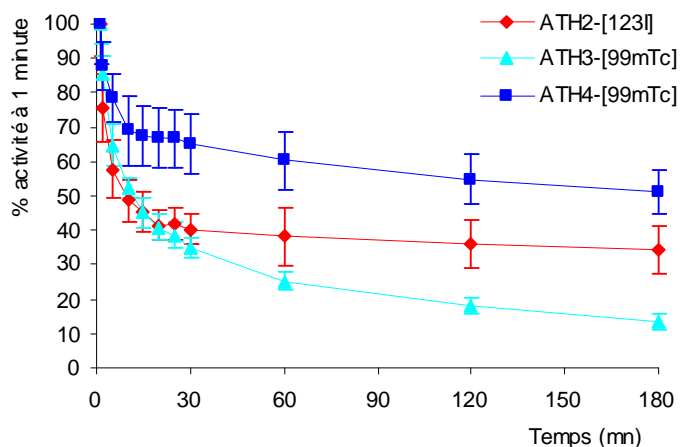


Figure 56 : Comparaison de la cinétique sanguine, chez le lapin contrôlé, de ATH2-[¹²³I], ATH3-[^{99m}Tc], et ATH4-[^{99m}Tc]. Mesure sur 180 minutes. Les résultats sont exprimés en % de l'activité mesurée à 1 minute.

Le peptide iodé présente la vitesse d'élimination la plus lente, il persiste une activité sanguine, soit sous forme d'iode libre par désiodation du peptide, soit sous forme liée aux protéines plasmatiques. Cependant, si une fixation importante à l'albumine a été montrée par électrophorèse, cette dernière n'a pas été observée sur les échantillons sanguins analysés par précipitation des protéines au TCA ou par filtration sur Nanosep®.

Le peptide technétié monobrin présente une vitesse d'élimination plus rapide que le peptide iodé ou le peptide-Raft-technétié. La différence entre les deux formes technétiées peut être due à la fixation non spécifique aux protéines beaucoup plus importante pour ATH4-[^{99m}Tc] par rapport à celle de ATH3-[^{99m}Tc]. D'autre part, le peptide ATH4-[^{99m}Tc] est moins hydrophile que le peptide marqué ATH3-[^{99m}Tc].

180 minutes après l'injection des traceurs, les activités circulantes de ATH2-[¹²³I], ATH3-[^{99m}Tc], et ATH4-[^{99m}Tc] représentent respectivement $32,9 \pm 3,5\%$, $12,8 \pm 1,8\%$ et $53,5 \pm 2,7\%$ de l'activité initiale à 1 min, activités corrigées de la décroissance radioactive. Du fait de sa clairance plus sanguine rapide, le rapport signal/bruit est plus favorable pour le dérivé peptidique technétié ATH3-[^{99m}Tc] que pour le dérivé iodé ou le dérivé Raft technétié.

IV-2) Etude de la biodistribution des marqueurs de VCAM-1

IV-2-1) Comparaison des deux traceurs iodés ATH1-[¹²³I] et ATH2-[¹²³I]

- Chez le hamster comme chez le lapin, ATH1-[¹²³I] présente une fixation pulmonaire importante (mesure des ROI = 80 % de l'activité ROI totale, ou mesure de

l'activité par gramme d'organe = 10 %/g). Des images effectuées à 24 heures, chez un lapin et chez les hamsters, ont mis en évidence que cette fixation non spécifique persiste au cours du temps. Cette localisation préférentielle pulmonaire n'est pas observée pour ATH2-[¹²³I], la fixation représentant en moyenne 0,3 % de l'activité totale mesurée par gramme de tissu pulmonaire.

Cette captation pulmonaire entraîne une diminution de la redistribution du ligand et par conséquent une diminution de la radioactivité dans les autres organes. Elle est probablement responsable des différences significatives de biodistribution dans le sang, les muscles et les reins observées entre les deux dérivés peptidiques ATH1-[¹²³I] et ATH2-[¹²³I] .

La fixation pulmonaire de ATH1-[¹²³I] importante et surtout prolongée sur plusieurs heures ne permet pas d'envisager son utilisation en clinique. Cependant, la détection par autoradiographie d'une fixation spécifique du traceur sur les plaques d'athérome a conduit le laboratoire à poursuivre l'étude des dérivés de HLA B2702 radiomarqués. C'est pourquoi, il a été décidé de tester le peptide monobrin ATH2-[I].

- ATH1-[¹²³I] est éliminé par voie hépato-biliaire et rénale. Les activités retrouvées au niveau du foie et de la rate sont plus importantes que celles de ATH2-[¹²³I] (Tableau X). Cette fixation est fréquemment retrouvée pour les grosses molécules et les colloïdes.

La différence observée au niveau rénal (Figure 57), où la concentration de ATH1-[¹²³I] est plus faible que celle de ATH2-[¹²³I], peut être la conséquence de la captation pulmonaire de ATH1-[¹²³I] ou d'une clairance rénale plus élevée de ATH2-[¹²³I] par rapport à celle de ATH1-[¹²³I]. La molécule est éliminée essentiellement par voie urinaire, l'activité vésicale étant importante sur les images scintigraphiques . La vessie se vide au décès de l'animal et l'activité réelle éliminée ne peut pas être déterminée.

- L'étude des biodistributions ne met pas en évidence de différence entre les lapins « WHHL » et « Contrôle » dans les principaux organes. La fixation de ATH1-[¹²³I] et ATH2-[¹²³I] dans le tissu graisseux est comparable entre le groupe « contrôle » et le groupe « WHHL » (Figure 57).

Organes	ATH1-[¹²⁵ I] (n = 11)	ATH2-[¹²⁵ I] (n = 8)
Sang	0,081 +/- 0,013	0,287 *** +/- 0,018
Coeur	0,044 +/- 0,009	0,114 *** +/- 0,009
Aorte	0,018 +/- 0,004	0,042 *** +/- 0,011
Poumons	8,100 +/- 2,491	0,280 *** +/- 0,058
Foie	0,373 +/- 0,100	0,161 *** +/- 0,011
Rate	0,630 +/- 0,266	0,113 *** +/- 0,009
Reins	0,303 +/- 0,100	0,455 *** +/- 0,065
Graisse	0,008 +/- 0,002	0,024 *** +/- 0,005
Muscle	0,012 +/- 0,003	0,043 *** +/- 0,003
Estomac	0,044 +/- 0,007	0,120 *** +/- 0,013

Tableau X : Comparaison des biodistributions du peptide iodé monomérique ATH2-[¹²³I] et du peptide iodé dimérique ATH1-[¹²³I] chez le lapin (lapin WHHL et Contrôle). Mesure en % DI/g d'organe. Analyse statistique par un test à l'écart réduit pour de petits échantillons au risque α 5%. *** p<0,001.

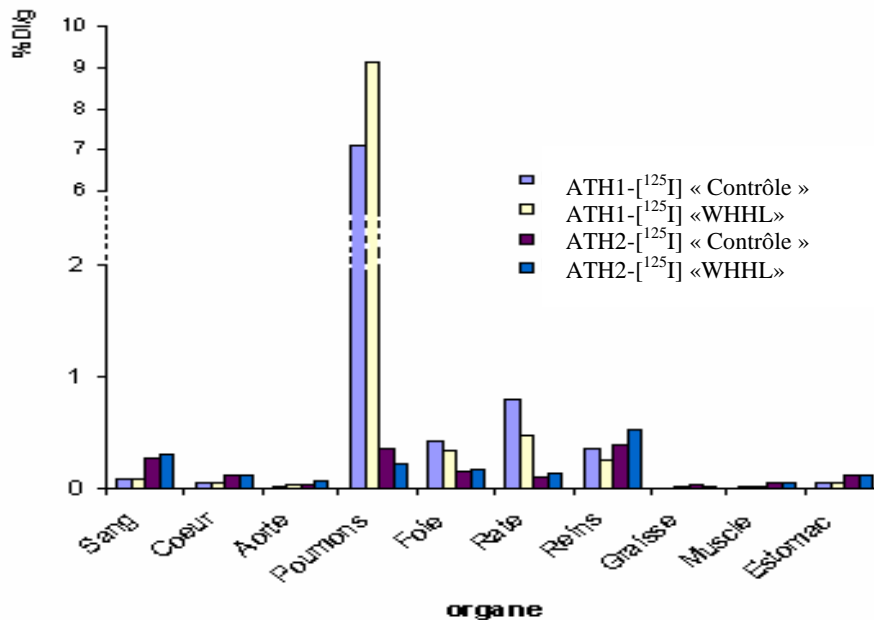


Figure 57 : Comparaison des biodistributions du peptide iodé monobrins ATH2-[¹²³I] et du peptide iodé double-brin ATH1-[¹²³I] chez les lapins « Watanabe » et « Contrôle ». Analyse 3 heures post-injection. Les résultats sont exprimés en %DI/g d'organe.

IV-2-2) Comparaison des traceurs iodés et technétiés

- Aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes d'animaux malades et sains, aussi bien pour ATH2-[¹²³I] que pour ATH3-[^{99m}Tc]. En revanche, la fixation de ATH4-[^{99m}Tc] au niveau du tissu graisseux est plus élevée chez les animaux du groupe « WHHL » que chez les animaux du groupe « Contrôle » (P < 0,05).

Les biodistributions de ATH2-[¹²³I], ATH3-[^{99m}Tc] et ATH4-[^{99m}Tc] sont comparées trois heures après administration de 18,5 MBq/kg de traceurs iodés ou technétiés (Tableau VI).

- La fixation pulmonaire de ATH4-[^{99m}Tc] est plus élevée que celle des deux autres traceurs (10 fois supérieure à celle de ATH2-[¹²³I] et 7 fois supérieure à celle de ATH3-[^{99m}Tc]). Ce résultat pourrait être expliqué par la taille, la basicité, et la lipophilie plus importante de la molécule, liées à la présence du gabatit Raft.

- Les trois radiotraceurs sont principalement éliminés par les reins qui présentent le pourcentage de dose injectée par gramme d'organe le plus élevé (Tableau XI). La cinétique d'élimination est plus rapide pour les traceurs technétiés que pour le traceur iodé, l'activité à trois heures étant respectivement de l'ordre de 1,5% DI/g pour les premiers contre 0,5% DI/g pour le second.

Organes	ATH2-[¹²³ I]	ATH3-[^{99m} Tc]	ATH4-[^{99m} Tc]
Sang	0,161±0,048	0,102±0,033	0,482±0,048
Coeur	0,088±0,031	0,044±0,015	0,126±0,013
Aorte	0,034±0,012	0,046±0,012	0,083±0,014
Poumons	0,163±0,044	0,208±0,044	1,379±0,485
Foie	0,096±0,029	0,332±0,042	1,071±0,120
Rate	0,089±0,029	0,172±0,070	0,527±0,277
Reins	0,490±0,184	1,361±0,721	1,588±0,153
Graisse	0,015±0,006	0,019±0,009	0,025±0,003
Muscle	0,026±0,009	0,017±0,003	0,024±0,004
Estomac	0,114±0,040	0,052±0,015	0,128±0,009

Tableau XI : Biodistributions de ATH2-[¹²³I], ATH3-[^{99m}Tc], et ATH4-[^{99m}Tc] chez le lapin « New Zealand White ». Les organes sont prélevés 180 minutes post-injection. L'activité est mesurée au compteur gamma. Les résultats sont exprimés en %DI/g d'organe. ATH2-[¹²³I] n= 3, ATH3-[^{99m}Tc] n = 3, et ATH3-[^{99m}Tc] n=6.

IV-3) Images scintigraphiques

- ATH1-[¹²³I]

- L'étude de la biodistribution par détection externe à l'aide de la caméra dédiée au petit animal (γ imager Biospace), montre une fixation pulmonaire non spécifique majeure.

Nous retrouvons plus de 80% de l'activité dans les poumons et cette activité persiste plusieurs heures. Ces résultats sont observés aussi bien chez le hamster que chez le lapin.

▪ Il existe une différence inter-espèce du métabolisme et plus particulièrement de la stabilité du marquage. L'analyse des images scintigraphiques montre que la fixation thyroïdienne augmente progressivement à partir de la première heure jusqu'à la fin de l'expérience à trois heures et cette augmentation est plus importante chez le hamster que chez le lapin.

• ATH2-[¹²³I]

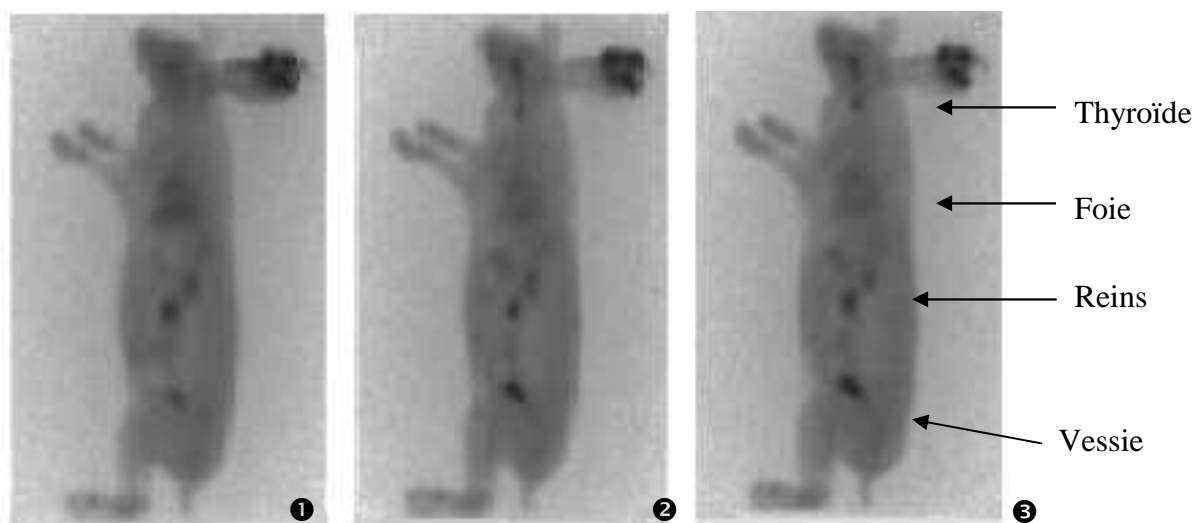


Figure 58 : Images scintigraphiques de la biodistribution de ATH2-[¹²³I]chez le lapin. Images à 60 minutes (1), 110 minutes (2) et 150 minutes (3) post-injection.

L'analyse des images scintigraphiques montre :

- L'absence de fixation pulmonaire.
- Une accumulation hépatique et rénale
- Une élimination urinaire prépondérante (hyperfixation vésicale)
- Une fixation thyroïdienne apparaît à partir de 60 minutes d'acquisition puis le taux de fixation thyroïdienne augmente progressivement au cours du temps (Figure 58). La fixation thyroïdienne est bien visualisée à partir de 80 minutes d'acquisition.

▪ ATH3-[^{99m}Tc]

L'image scintigraphique qui somme les 30 minutes d'acquisition, de 150 minutes à 180 minutes post-injection (Figure 59, image C), montre une concentration de l'activité dans les reins et la vessie, ainsi qu'une accumulation hépatique et intestinale. La bile qui

accumule le traceur est excrétée dans l'intestin et est responsable de l'activité intestinale observée en imagerie. L'activité rénale de ATH3-[^{99m}Tc] est plus importante que celle observée à la même période avec les traceurs iodés, notamment si elle est comparée à l'activité hépatique. Une légère fixation thyroïdienne est observée. La pureté radiochimique du traceur avant injection est supérieure à 90% ; il est probable que le complexe soit métabolisé et que le technétium 99m soit libéré dans l'organisme où il se concentre naturellement dans la thyroïde et dans l'estomac.

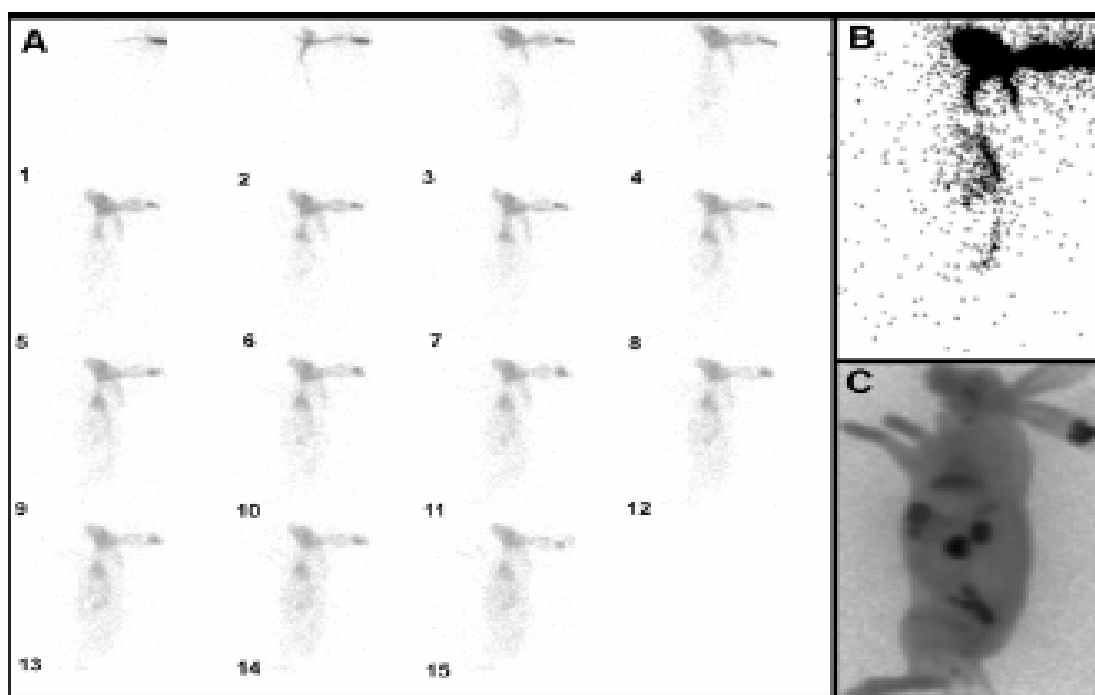


Figure 59 : Exemple d'images en vue latérale obtenues en imagerie planaire. Sur cet exemple, les images sont réalisées avec ATH3-[^{99m}Tc]. En A, numérotées de 1 à 15 sont représentées les 30 premières secondes d'acquisition. Chaque image représente 2 secondes d'acquisition de la radioactivité. On peut suivre le premier passage du radiotracer dans l'organisme depuis son injection dans la veine de l'oreille (image 1), son passage cardiaque (image 6), aortique (image 9) jusqu'à sa diffusion dans l'organisme (image 15). Les images correspondant au passage aortique sont sommées afin de localiser cette structure avec précision (B). L'aorte n'est pas visible aux temps longs (en C, sommation des 30 dernières minutes d'acquisition) (D'après Broisat A. 2005).

LES MARQUEURS DE LA NEOANGIOGENESE

I) OPTIMISATION DE LA REACTION DE MARQUAGE

I-1) Marquage des peptides ligands de « $\alpha_v\beta_3$ » à l'iode 125

I-1-1) Analyses chromatographiques

- **Analyse CLHP**

Le marquage est réalisé en conditions équimolaires : une mole d'iode pour une mole de peptide, et ce afin de pouvoir analyser le nombre d'atomes d'iode qui peuvent se fixer sur les deux résidus tyrosyls. Les peptides possédant deux tyrosines, on peut obtenir théoriquement, des dérivés possédant entre 0 et 4 atomes d'iode.

La chromatographie séparative de ANG1 a permis d'identifier la molécule non marquée, monoiodée, diiodée et triiodée. Les espèces non iodées et monoiodées sont majoritaires.

- **Analyse CCM : détermination de la pureté radiochimique**

La chromatographie sur couche mince est réalisée sur plaque de silice C18 RP₆₅₄ (Merck). L'éluant retenu pour la chromatographie des peptides « $\alpha_v\beta_3$ » est un mélange acétonitrile / eau (75 /25). Dans ces conditions, les iodures (¹²⁵I) migrent au front du solvant (Rf = 1) tandis que le peptide marqué reste au point de dépôt (Rf = 0,2).

I-1-2) Paramètres de la réaction de marquage

Le radiomarquage à l'iode est réalisé par substitution électrophile sur le résidu tyrosine fixé au gabarit Raft. L'iode est oxydé soit par la méthode à la chloramine-T, par le N-Bromosuccinimide ou par le couple lactoperoxydase/ peroxyde d'hydrogène.

I-1-2-1) Marquage à la chloramine-T

Différents paramètres sont déterminés : temps de réaction, concentration en peptide et concentration en réactif oxydant.

• Concentration en peptide

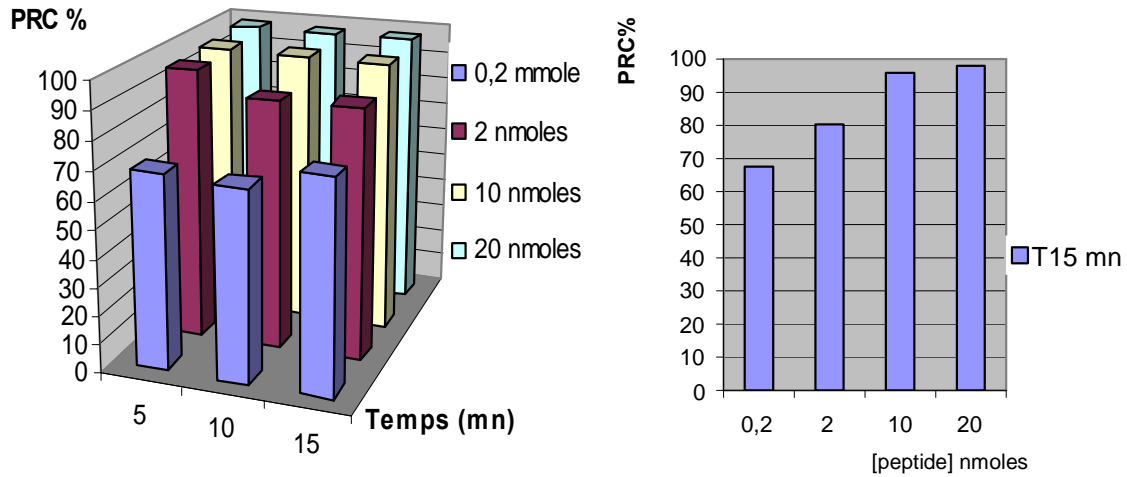


Figure 60 : Optimisation de la réaction de marquage à l'iode 125 de ANG1. Etude de la pureté radiochimique par chromatographie couche mince sur plaque de silice C18 RP₆₅₄, solvant mélange acétonitrile/eau (75/25). Marquage à la chloramine-T (44 nmoles) en présence de 18,5 MBq (250 pmoles) d'iode 125 et de quantités croissantes de peptide : 0,2 nmoles, 2 nmoles, 10 nmoles et 20 nmoles (1µg, 10µg, 50µg et 100 µg).

- Le peptide ANG3 est radiomarké avec une pureté radiochimique supérieure à 95% pour 12 nmoles de peptide (10 µg), soit une activité spécifique de 0,6 TBq/mmoles.

- Les essais de radiomarkage pour de faibles concentrations de ANG1 et ANG2, 0,2 et 2 nmoles de peptide (soit environ 1 µg et 10 µg) en présence de 18,5 MBq d'iode 125 (250 pmoles), n'ont pas permis d'obtenir une pureté radiochimique suffisante, et ce quelle que soit la durée de l'étape oxydante (Figure 60). La PRC est toujours inférieure à 90%. L'analyse par CLHP d'une préparation présentant une PRC de 80% montre un pic d'activité correspondant à l'iodure libre et un pic intermédiaire non identifié.

La pureté radiochimique obtenue est supérieure avec ANG2 par rapport à ANG1. Pour 0,2 nmole de peptide, on obtient des PRC de 81% et 68% respectivement, et pour 2 nmoles de peptide des PRC de 96% et 81% respectivement.

- A des concentrations supérieures, les résultats sont identiques pour tous les dérivés. Une pureté radiochimique supérieure à 95% est atteinte avec 10 nmoles de peptide ANG1 ou ANG2 pour 250 pmoles d'iode 125, soit une activité spécifique de 1,85 TBq/mmoles.

- L'allongement du temps d'incubation modifie peu la pureté radiochimique.

- Influence de la concentration en Chloramine-T

- L'analyse CLHP du peptide ANG1 en présence de fortes concentrations de chloramine-T ne montre pas de dégradation du peptide en détection ultraviolet.

- L'analyse CLHP de ANG1-[¹²⁵I], ANG2-[¹²⁵I] et ANG3-[¹²⁵I] après 30 minutes de réaction en présence de chloramine-T à 0,3M ne montre pas de dégradation du peptide iodé, par détection UV et détection de la radioactivité.

- En présence de 10 nmoles de peptide, la pureté radiochimique est comprise entre 95 et 98%, au-delà d'un certain seuil fixé ici à 11 nmoles de chloramine-T, dans un volume total de 150 µl et ce quel que soit le temps d'incubation (Figure 61).

Cette valeur en réactif oxydant est retrouvée pour les trois peptides ANG1-[¹²⁵I], ANG2-[¹²⁵I] et ANG3-[¹²⁵I].

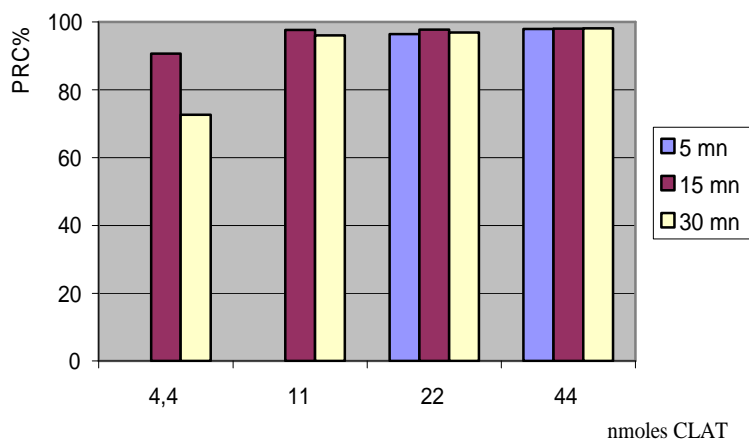


Figure 61 : Détermination de la pureté radiochimique de ANG1 (10 nmoles, 50µg) à différentes concentrations en chloramine-T (CLAT) : 4,4 ; 11 ; 22 et 44 nmoles dans la solution, à différents temps : 5, 15, 30 minutes, par 250 pmoles de NaI (activité théorique 18,5 MBq). Mesure par CCM C18 RP₆₅₄, solvant acétonitrile/eau (75/25).

I-1-2-2) Marquage au N-bromosuccinimide

- Le N-Bromosuccinimide a un fort pouvoir oxydant. Pour une même nombre de moles en agent oxydant, défini entre 5 et 6 nmoles, la pureté radiochimique approche 95% avec NBS, et 75% avec la chloramine-T.

- Pour un temps de réaction de 15 minutes et une quantité de 10 nmoles de peptides "RGD", la quantité optimale de N-Bromosuccinimide à ajouter à la solution est de 1 µg (5,6 nmoles) pour obtenir un rendement de marquage supérieur à 90% (Tableau XII).

Peptide	NSB en µg				
	1	2	3	4	5
ANG3	97,10%	99,38%	96,09%	96,95%	92,08%
ANG2	95,66%	92,10%	97,18%	97,31%	97,41%
ANG1	96,14%	94,50%	96,35%	96,85%	93,41%

Tableau XII : Influence de la concentration de N-bromosuccinimide sur la pureté radiochimique du marquage à l'iode des peptides ligands de « $\alpha_v\beta_3$ ». Mesure par CCM sur plaque de silice C18 RP₆₅₄, solvant acétonitrile/eau (75/25).

I-1-2-3) Iodation par la lactoperoxydase

- La réaction de marquage dépend de la concentration en enzyme et en peroxyde d'hydrogène. Une pureté radiochimique supérieure à 95% est obtenue avec une quantité de lactoperoxydase de 0,4 µg (5 pmoles) et de peroxyde d'hydrogène de 2 µg (52 nmoles). Le marquage est optimal pour tous les peptides « $\alpha_v\beta_3$ » (Tableau XIII).

- la pureté radiochimique, quelles que soient les concentrations en réactifs, est moindre pour ANG2-[¹²⁵I] que pour ANG1-[¹²⁵I]

- 10 nmoles de peptide sont marquées par 18,5 MBq (250 pmoles) d'iode 125 en présence de l'agent oxydant peroxyde d'hydrogène en concentration équivalente à l'agent oxydant chloramine-T mais avec un risque de dégradation moindre. Par contre, en présence de 5 nmoles de peroxyde d'hydrogène, l'iode n'est pas oxydé alors qu'à la même concentration en chloramine-T, on retrouve entre 70 et 85% de peptide radiomarqué.

Peptide (10 nmoles)		lactoperoxydase en µg	H ₂ O ₂ 30% en µg	Pureté radiochimique
ANG3	n=1	0,4	2	98,62%
	n=1	0,4	3	99,22%
	n=1	0,4	5	94,24%
ANG2	n=1	0,4	2	92,73%
	n=1	0,4	3	89,55%
	n=1	0,4	5	90,41%
	n=3	2	0,2	0,56%
ANG1	n=1	0,4	2	96,83%
	n=1	0,4	3	94,92%
	n=1	0,4	5	97,52%
	n=3	2	0,2	8,04%

Tableau XIII : Influence de la concentration du couple lactoperoxydase/péroxyde d'hydrogène sur la pureté radiochimique du marquage à l'iode des peptides « $\alpha_v\beta_3$ ». Mesure de la PRC par CCM sur plaque de silice C18 RP₆₅₄, solvant acétonitrile/eau (75/25).

I-1-2-4) Conclusion

Les trois méthodes d'oxydation : Chloramine-T, couple lactoperoxydase-H₂O₂, et NBS sont équivalentes.

Nous avons pu définir pour 10 nmoles de peptides « $\alpha_1\beta_3$ », 18,5 MBq (500 μ Ci) d'iode 125 et une pureté radiochimique supérieure à 90%, une valeur seuil en réactif oxydant de :

- 22 nmoles de Chloramine-T
- 60 pmoles de lactoperoxydase et 52 nmoles H₂O₂
- 5,6 nmoles de N-Bromosuccinimide

Quelle que soit la méthode choisie, les réactions d'oxydation et de radiomarquage sont rapides avec un temps de réaction inférieur à 15 minutes, et la réaction est complète.

I-1-3) Purification de RDG-Raft175-[¹²³I] (ANG1-[¹²³I])

Différentes méthodes de séparation ont été testées : chromatographie d'exclusion sur colonne Sephadex G5, chromatographie échangeuse d'ions et chromatographie de partage sur colonne Sep-pak C18.

- La méthode choisie pour purifier le peptide marqué est la chromatographie de partage. Si la chromatographie par échange d'ion permet d'éliminer l'iode libre (sous forme I⁻ ou I⁺), le pourcentage de récupération du peptide marqué est plus faible qu'avec la méthode de séparation sur colonne C18. Dans ce dernier cas, les iodures libres sont éliminés par élution de la colonne avec 1 ml d'eau, le peptide marqué resté fixé dans la colonne Sep-Pak C18 est récupéré par passage de 1,5 ml d'une solution éthanolique (mélange éthanol 2 ml/ HCl 0,5 ml, pH 4).

- La chromatographie d'exclusion permet d'éluer le peptide ANG1-[¹²⁵I] avec un pourcentage de récupération de 70%. Le solvant d'élution est une solution de tampon phosphate pH 7,4. Deux pics de radioactivité sont observés. L'analyse de ces pics par CCM n'a pas mis en évidence d'iode libre, les molécules restent au point de dépôt dans les deux essais. Cette méthode pourrait séparer les formes monoiodées des molécules pluriiodées.

I-1-4) Essais de stabilité dans les solvants

Les trois produits sont stables au maximum 24 heures, en solution aqueuse et dans les solvants NaCl 0,9%, et PBS. La molécule iodée est synthétisée avec une PRC supérieure à 97%. A 24 heures, nous retrouvons 10 à 15 % d'iodure libre. A 48 heures, nous retrouvons 50% d'iodure libre dans le milieu. Dans le solvant NaCl 0,9%, cette désiodation peut résulter d'un échange d'halogène entre l'atome d'iode fixé sur le cycle aromatique et l'atome de chlore du solvant, cependant il existe peu de différences de stabilité en fonction des solvants.

I-2) Marquage des peptides ligands de « $\alpha_v\beta_3$ » au technétium 99m

I-2-1) Radiomarquage de RGD-Raft 175 (ANG1)

Sachant que de nombreux acides aminés sont susceptibles de réagir avec le synthon carbonyle technétié, il a été décidé de tester le marquage du peptide Raft-tyrosine : ANG1. La pureté radiochimique ne dépasse pas 30 %. L'étude des chromatogrammes de la CLHP avec détecteur de radioactivité montre la présence de tricarbonyl technétié (premier pic de sortie) mais aussi de multiples pics. Après chauffage 20 minutes à 80°C, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ ainsi que deux molécules technétiées (X1 et X2) sont séparés en CLHP (Figure 62).

Le synthon technétié interagit sur de multiples sites de liaison et probablement avec des liaisons intra et intermoléculaires. Il peut notamment réagir avec les résidus lysine, arginine, et phénylalanine, mais avec une très faible affinité. C'est pourquoi, il a été décidé de fixer une histidine, qui possède une excellente affinité pour le synthon tricarbonyl, sur la structure Raft.

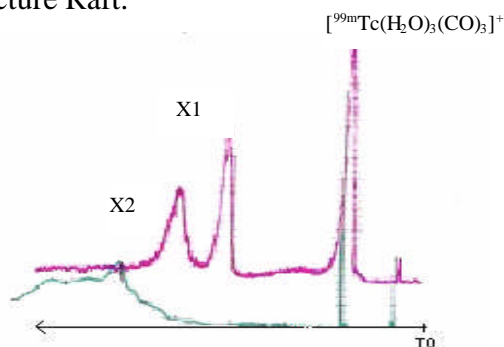


Figure 62 : Radiochromatogramme de la préparation de ANG1- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]$, détection de la radioactivité par une sonde gamma (Novelec).

I-2-2) Radiomarquage de RGD-Raft-H (ANG4) au technétium 99m

Une histidine est introduite dans la structure peptidique au niveau du gabarit Raft en remplacement des résidus tyrosine. Le marquage n'interfère pas avec les sites actifs de la molécule, l'histidine étant localisée sur le plan opposé aux ligands.

I-2-2-1) Influence de la température

Les résultats de la PRC en fonction de la température du milieu réactionnel sont donnés dans le tableau XIV.

- Si le marquage est réalisé à 25°C, la pureté radiochimique ne dépasse pas 20%. Lorsque le mélange réactionnel est maintenu à 40°C, la PRC croît de 50% après 30 minutes d'incubation à 90% à 60 minutes d'incubation. Cependant, que ce soit après 30 minutes ou 60 minutes d'incubation, l'analyse CLHP des solutions montre la présence de deux structures radiomarquées, probablement la molécule ANG4-^{99m}Tc (Pic 2) avec un temps de rétention de 28 minutes et un réactif intermédiaire (Pic 3) avec un temps de rétention de 20 minutes (Figure 63). A 60°C, la pureté radiochimique s'élève de 70% après 30 minutes à 90% après 60 minutes d'incubation. L'intermédiaire observé à 40°C est présent mais de façon plus ou moins importante en fonction des échantillons. A 80°C, la pureté radiochimique croît avec le temps de 25 % à 60 %, elle est inférieure à celle observée à plus basse température et l'on observe la présence d'un pic intermédiaire.

T°	25 °C	40 °C	60 °C	80 °C
PRC à 30 mn	20%	50%	70%	42%
PRC à 60 mn	20%	90%	90%	60%

Tableau XIV : Influence de la température d'incubation sur la PRC du radiomarquage au technétium 99m de ANG4 . Marquage réalisé par l'intermédiaire d'un synthon tricarbonyle technétié (Isolink[®], Mallinckrodt)

L'analyse CLHP démontre l'absence de ^{99m}Tc libre et une diminution progressive de [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ au cours du temps. Mais, en fonction de la température du milieu réactionnel, le radiomarquage est plus ou moins spécifique et des produits intermédiaires sont observés (Figure 63). D'autre part, à 80°C en milieu concentré, des produits de dégradation sont observés en UV et détection radioactive.

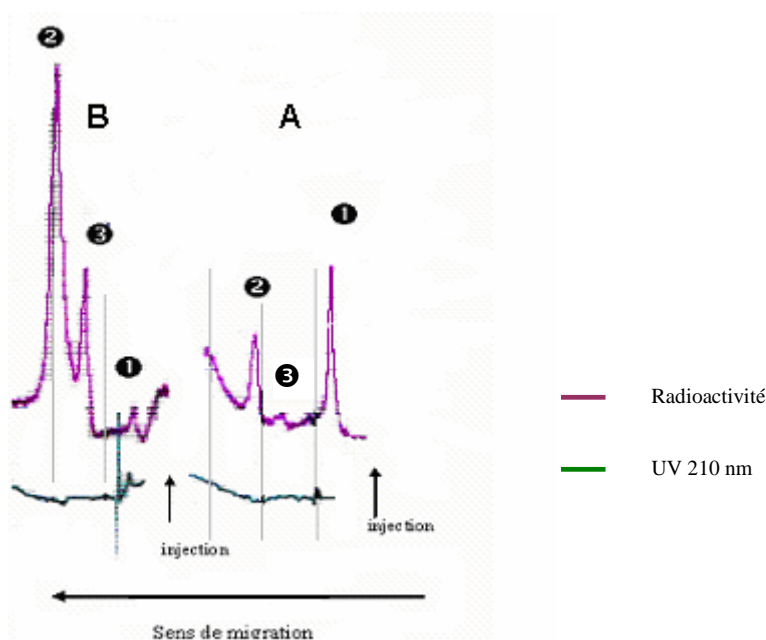


Figure 63 : Radiomarquage de ANG4 au ^{99m}Tc : étude de la pureté radiochimique en fonction de la durée d'incubation. Incubation de 50 μg de ANG4 en présence de 370 MBq de solution d'Isolink® technétium pendant 60 minutes à 40°C. Analyse à T30 mn (A) et T 60 mn (B). CLHP: colonne Bondapak® C18, gradient acétonitrile/H₂O/TFA0,1%, débit 1 ml/mn.; Tr : $^{99m}\text{TcO}_4^-$: 5 mn, [$^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$]⁺ : 10 mn (❶) , 2 pics non identifiés par spectrométrie de masse à 20 mn (❷) et 28 mn (❸).

▪ Au cours d'expériences supplémentaires, nous avons observé que la pureté radiochimique était améliorée si le volume du milieu réactionnel était augmenté : en travaillant dans un volume réactionnel de 1 millilitre avec dilution du mélange par une solution aqueuse, le rendement de marquage approche les 90% même si la solution est incubée à 80°C pendant 20 minutes. Les peptides Raft sont peu solubles dans l'eau, et à la concentration de 1 mg/ml on pourrait se situer à la limite de solubilité, ce qui explique le faible rendement de marquage. Ou, en diminuant la concentration, on augmente la distance entre les molécules dans le milieu réactionnel et on diminue la probabilité que deux (ou plus) molécules de peptide réagissent avec un seul complexe carbonyle pour former un complexe de type [$^{99m}\text{Tc}(\text{L})_2(\text{CO})_3$].

Toutes ces approches nous ont conduits à proposer une méthode de marquage dans un volume réactionnel de 1 ml par dilution dans une solution aqueuse, avec une étape de chauffage entre 60°C et 80°C maximum pendant 20 minutes.

I-2-2-2) Influence de la concentration en peptide

- Analyse CCM

La pureté radiochimique mesurée par CCM dans le cadre du marquage de 25 µg, 50 µg et 100 µg (\cong 5, 10, 20 nmoles) de peptide par 740 MBq de $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ est de 75,49%, 78,87% et 94,86% respectivement (n=3).

- Analyse CLHP

Quelle que soit la réaction et la concentration en peptide testée, le pourcentage de $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ est faible, entre 5 et 10 %. Par exemple, dans le premier échantillon (Figure 64, échantillon A), le pourcentage de $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ est de 2,83%, 5,63% et 11,3% dans les solutions contenant respectivement 100 µg, 50 µg et 25 µg de peptide. Par contre, le marquage n'est pas spécifique pour une masse de peptide de 25 µg ou 50 µg en présence de 740 MBq de carbonyle technétié. A 50 µg/740 MBq, deux pics d'activité à 25,5 minutes et 28 minutes sont détectés et l'activité diminue progressivement de 30 à 35 minutes. A 100 µg/740 MBq, souvent, un seul pic est observé à 28 minutes (échantillon A) mais parfois on observe un pic à 33 minutes (échantillon B). La spécificité du marquage est améliorée si l'on augmente le volume de dilution et surtout si la préparation est laissée à température ambiante pendant au minimum 20 minutes après avoir été placée à 60°C pendant 20 minutes.

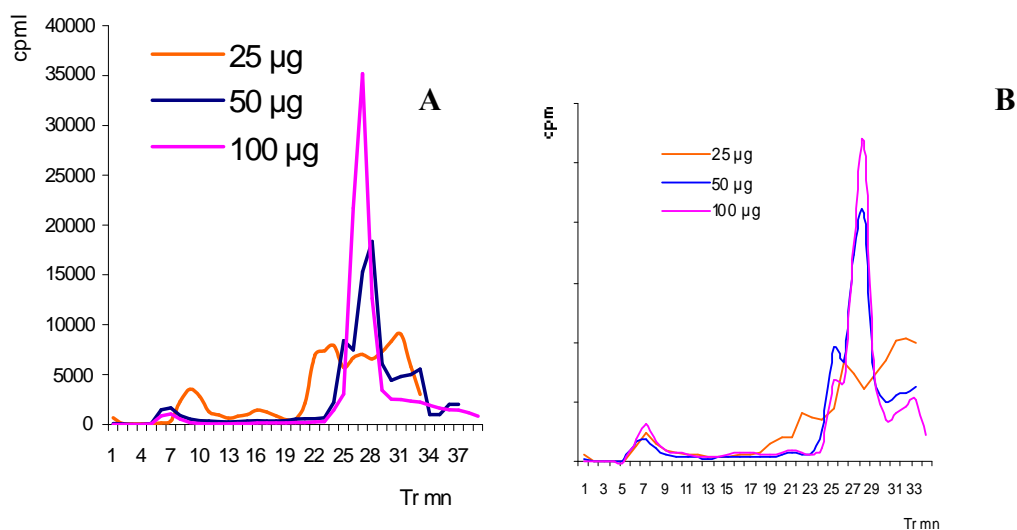


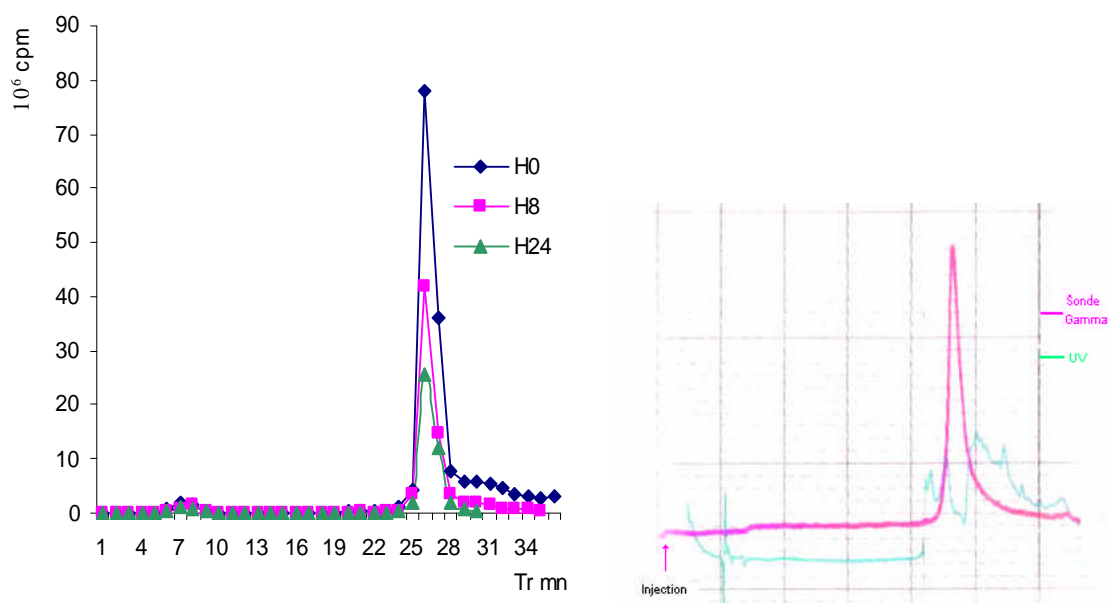
Figure 64 : Marquage de ANG4 au technétium (740 MBq). Détermination de l'activité spécifique maximum. Analyse CLHP, colonne C18 Bondapak 5µm 20 cm, gradient d'élution (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; 0 à 5 mn 5 % de A, de 5 à 25 mn de 5% à 60 % de A, de 25 à 35 mn 60% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur UV et détecteur de radioactivité. Analyse de deux échantillons A et B.

I-2-2-3) Conclusion

L'optimisation de la réaction de radiomarquage au technétium du peptide « $\alpha_v\beta_3$ » ANG4-[^{99m}TcI] nous a conduits à proposer un protocole de marquage de 100 μg de peptide par 740 MBq d'une solution d'Isolink[®] technétié précédemment neutralisée à pH 8 par une solution de HCl 2N. Le mélange réactionnel est dilué dans une solution d'eau purifiée q.s.p. 1 millilitre, incubé à 60 °C pendant 20 à 30 minutes puis laissé à température ambiante pendant 30 minutes avant son analyse et son administration. La réaction est réalisée en présence d'un excès de peptide, soit environ 40 moles de peptide pour 1 mole de technétium 99m.

I-2-3) Stabilité de la préparation RGD-Raft-H-[^{99m}Tc] (ANG4-[^{99m}Tc])

La durée de conservation du peptide marqué est élevée. L'absence de technétium 99m libre ($[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]$) et de $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ est constatée dans le milieu réactionnel, 24 heures après la réaction de marquage. La pureté radiochimique est de 97,3% à H 0, de 95,6% à H 8 et 94,4% à H 24 (Figure 65).



II) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIOUES DES MOLECULES MARQUEES

II-1) Etude du coefficient de partage

Le coefficient de partage est déterminé en milieu octanol/ eau à pH 7,4 pour l'ensemble des peptides (Tableau XV).

Traceur	ANG3-[¹²⁵I]	ANG1-[¹²⁵I]	ANG4-[^{99m}Tc]
P=log([Oct]/[H₂O])	-2,47	-1,75	- 0,51
[Oct]/[H₂O]	0,34/100	1,8/100	31/100

Tableau XV: Coefficient de partage des peptides ANG en fonction de la formule chimique et de la méthode de radiomarquage.

Le coefficient de partage octanol/eau (Log₁₀P) à pH 7,4 de ANG1-[¹²⁵I], ANG2-[¹²⁵I] et ANG3-[^{99m}Tc] est respectivement de - 2,47, -1,75, et -0,51. Tous les dérivés ANG sont solubles dans l'eau et peu lipophiles mais la présence de l'histidine et/ou du synthon carbonyle-[^{99m}Tc] augmente la lipophilie. Selon la bibliographie, la présence d'un atome d'iode augmente l'hydrophobie de la molécule vectrice alors que l'atome de technétium augmente l'hydrophilie. Mais, la présence du chélate tricarbonyle plus lipophile que les autres chélates type étylène diamine ou N3S pourrait expliquer le caractère lipophile des peptides technétiés.

Le coefficient de partage permet d'évaluer la liposolubilité d'une molécule et donc son passage membranaire par diffusion passive. La molécule ANG1-[¹²⁵I] est moins liposoluble que son analogue ANG2-[¹²⁵I], et son passage membranaire par diffusion passive à pH physiologique est peu probable.

II-2) Analyses de la biodistribution sanguine

Comme spécifié dans le chapitre sur l'étude des marqueurs de la plaque d'athérome, l'étude de la fixation aux cellules sanguines détermine s'il existe une captation ou une fixation non spécifique sur ces cellules. La méthode de précipitation au TCA 10 % permet d'apprécier le taux de radiotracer fixé aux protéines plasmatiques. Ces deux facteurs vont jouer sur la clairance sanguine des traceurs.

II-2-1) Biodistribution de RGD-Raft175-[¹²⁵I] (ANG1-[¹²⁵I])

- Fixation cellulaire

La biodistribution sanguine a été analysée à partir de prélèvements de sang de souris après injection du traceur *in vivo*, ou après incubation dans des échantillons de sang prélevés chez des volontaires sains. Dans toutes nos analyses, nous retrouvons 30 à 35 % de l'activité dans le culot globulaire, et 65 à 70 % de l'activité dans le sérum.

- Fixation protéique

Le peptide ANG1-[¹²⁵I] est présent dans le sérum essentiellement sous forme libre non liée aux protéines plasmatiques. La fixation non spécifique aux protéines est constante au cours du temps, autour de 10 % de l'activité totale (Tableau XVI).

Temps d'incubation	30 minutes	1 heure	2 heures	3 heures
Activité surnageant %	87,32	93,55	86,75	90,47

Tableau XVI: Etude de la liaison du peptide ANG1-[¹²⁵I] aux protéines plasmatiques par précipitation des protéines sériques au TCA10%.

II-2-2) Biodistribution sanguine de RGD-Raft-H-[^{99m}Tc] (ANG4-[^{99m}Tc])

- Fixation cellulaire

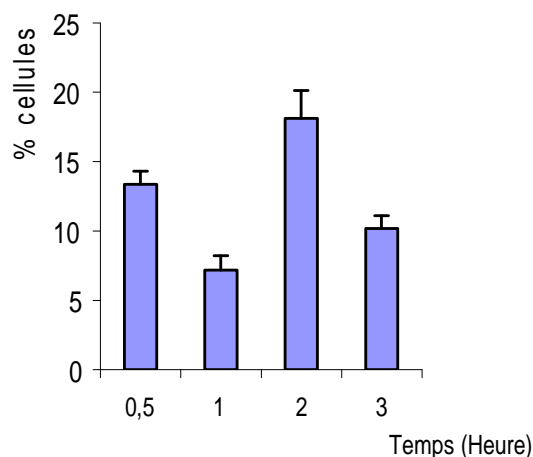


Figure 66 : Détermination de la fixation cellulaire du traceur en fonction du temps. Incubation du traceur ANG4-[^{99m}Tc] dans un échantillon de sang pendant 3 heures. Mesure de l'activité du culot cellulaire et du sérum au compteur gamma (Cobra).

La part de ANG4-[^{99m}Tc] fixé aux cellules sanguines représente entre 5% et 20% de l'activité totale en fonction des échantillons, et ce, même sur une durée d'incubation

longue de 3 heures (Figure 66). Nous n'avons pas déterminé si l'activité est intracytoplasmique ou si la molécule est fixée à la surface externe de la membrane cytoplasmique.

- Fixation aux protéines plasmatiques

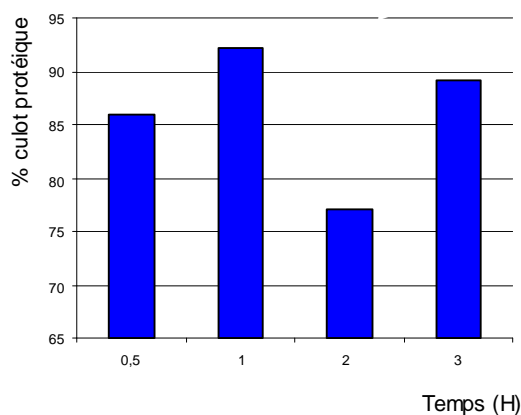


Figure 67 : Evaluation de la fixation non spécifique de ANG4-[^{99m}Tc] aux protéines plasmatiques. Mesure de l'activité du culot protéique après précipitation au TCA 10 %.

Après incubation du traceur dans un échantillon de sang et précipitation des protéines plasmatiques par une solution concentrée de TCA 10%, 75 à 90 % de la molécule marquée est retrouvée dans le culot protéique (Figure 67).

Cette fixation aux protéines plasmatiques a aussi été observée au cours des analyses des échantillons sanguins prélevés chez la souris. En effet, lorsque le sérum est filtré sur filtre Nanosep[®] 10K, pendant 20 minutes à 12 G, plus de 90% de l'activité est retrouvée dans le filtre.

Cette fixation non spécifique est observée lors des électrophorèses sur gel de polyacrylamide. En l'absence de BSA, le peptide marqué est rapidement élué du gel, en présence de BSA une partie de l'activité reste fixée à l'albumine sur le gel.

II-2-3) Conclusion

Le peptide ANG4-[^{99m}Tc] est présent en faible pourcentage sous forme libre dans le sang. Le taux de fixation aux protéines plasmatique est identique à celui observé avec le peptide ATH4-[^{99m}Tc]. Si nous comparons ce résultat à celui déterminé pour le peptide de structure voisine ANG1-[¹²⁵I] (structure Raft), pour lequel seulement 10 % de l'activité est retrouvée dans le culot protéique, nous pouvons conclure que la liaison de ANG4-[^{99m}Tc] aux protéines plasmatiques n'est pas en relation avec la structure polycyclique Raft mais

qu'elle résulte de la présence du complexe histidine-carbonyle-technétium^{99m} et probablement de l'augmentation de la lipophilie de la molécule technétée.

Le motif RGD est susceptible de reconnaître l'intégrine plaquettaire $\alpha_v\beta_5$ et donc de se fixer au culot cellulaire ; la structure Raft faciliterait le passage transmembranaire par internalisation. Ces deux paramètres peuvent expliquer la forte fixation au culot de cellules sanguines même si une fixation non spécifique n'est pas exclue.

	ANG3-[¹²⁵ I]	ANG1-[¹²⁵ I]]	ANG4-[^{99m} Tc]
Cellules	35 %	30-35 %	5-20 %
Sérum	65 %	65-70 %	80-95 %
Fixation protéique	10 %	10-15 %	75-90 %

Tableau XVII : Biodistribution sanguine des peptides marqués : étude *in vitro*. Précipitation des protéines au TCA 10%.

III) ETUDES METABOLIQUES DES TRACEURS EN MILIEU BIOLOGIQUE :

Le devenir du radioligand dans l'organisme a été étudié soit par des méthodes *in vitro*, soit *in vivo* après injection des traceurs chez différents modèles animaux. *In Vitro*, nous avons cherché à analyser la dégradation sanguine du radioligand et plus particulièrement la stabilité de la fixation de l'isotope à la molécule biologique.

III-1) Etude *in vitro* du métabolisme

Les traceurs ont été incubés dans un échantillon de sang prélevé chez des sujets sains et en présence de solutés complexes, cystéine, histidine, sérum de veau fœtal, pour les traceurs technétiés.

III-1-1) Stabilité sanguine du marquage de RGD-Raft175-[¹²⁵I] (ANG1-[¹²⁵I])

La mesure de la PRC après incubation dans un échantillon de sang permet d'apprécier la désiodation du traceur.

Après incubation du peptide marqué dans 1 millilitre de sang, sous agitation à 37°C au bain-marie, pendant 1 heure, 70% de l'activité est retrouvée dans le sérum, 30% dans le

culot cellulaire (n=6). Les analyses radiochromatographiques du sérum (CLHP et CCM) détectent la présence d'iodure libre avec un taux moyen de 15% (n=3) et l'absence de métabolites intermédiaires ; 85% de l'activité initiale à T0 est retrouvée sous forme de peptide marqué. Une désiodation est observée mais le peptide ANG1-[¹²⁵I] n'est pas dégradé par les enzymes du sérum.

III-1-2) Evaluation du métabolisme sanguin de RGD-Raft-H-[^{99m}Tc] (ANG4-[^{99m}Tc])

III-1-2-1) Réactions de compétition en présence de milieu complexe

- Stabilité en présence d'EDTA

Le marquage de l'Isolink[®] est réalisé avec une concentration volumique supérieure à 3,7 GBq/ml, le technétium 99m est élué du générateur (Elumatic III[®]) depuis moins de 4 heures et l'élution précédente remonte à moins de 24 heures. Dans 370 MBq de technétium, on retrouve entre 0,05 et 0,1 nmole de technétium. Après marquage, le rapport molaire peptide froid / peptide marqué se situe environ entre 200/1 et 100/1, soit un excès de mole à mole entre le chélate EDTA et le synthon tricarbonyle technétié, de 100, 1000, et 10000.

L'EDTA déplace le métal de son ligand carbonyle pour une faible concentration en EDTA. L'éluat au niveau des pics d'activité a été recueilli en sortie de colonne mais la spectrométrie de masse n'a pas permis de détecter un composé en raison de la trop faible quantité de produit. L'EDTA-[^{99m}Tc] sort en début de colonne, il est donc possible que le composé observé soit un chélate bifonctionnel incluant la liaison du tricarbonyle technétié avec les atomes ligands de l'histidine et de l'EDTA. La concentration du composé augmente avec la concentration en EDTA.

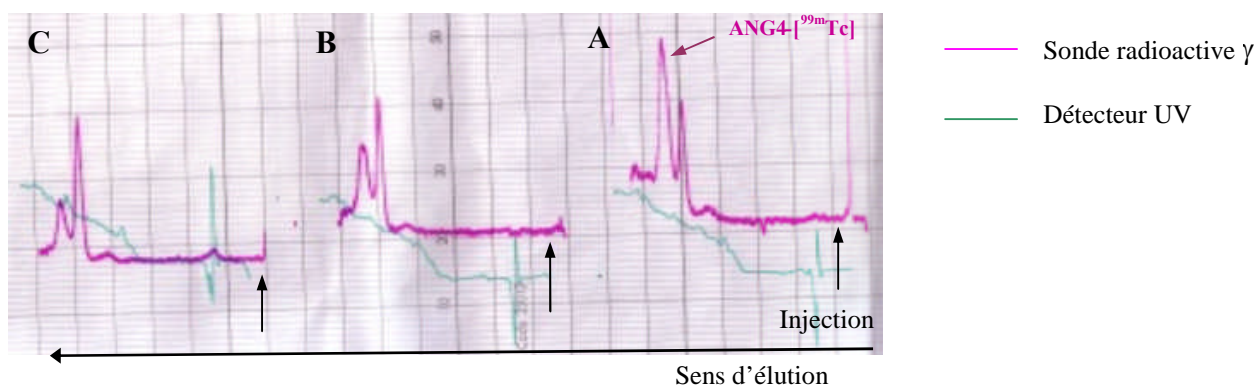


Figure 68 : Stabilité du marquage de ANG4-[^{99m}Tc] en milieu biologique. Etude de la réaction de transchélation en présence de concentrations croissantes d'EDTA : 1 nmole/ml (graphe A), 10 nmoles/ml (B) et 100 nmoles/ml (C). Analyse CLHP, colonne C18 Bondapak 5 μ m 20 cm, gradient d'élution (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; 0 à 5 mn 5 % de A, de 5 à 25 mn de 5% à 80 % de A et de 25 à 35 mn 80% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur UV et détecteur de radioactivité.

- Stabilité en présence de L-histidine

La pureté radiochimique diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration en histidine dans la solution. En présence de 100 nmoles d'histidine, l'analyse chromatographique montre un pic d'activité avec un temps de sortie à 21 minutes correspondant environ à 10% de l'activité totale, ainsi qu'un pic d'activité dans le temps mort de la colonne. L'activité au pic de sortie de 21 minutes a augmenté progressivement avec l'augmentation de la concentration en histidine libre. L'impureté a été identifiée par CCM comme étant de l'histidine marquée par le synthon tricarbonyl technétié.

L'acide aminé histidine libre est en large excès par rapport au peptide marqué et par conséquent par rapport à l'histidine fixée sur le gabarit Raft. Respectivement un excès de 100/1, 1000/1, et 10000/1 pour une concentration en histidine libre de 1 nmole/ml, 10 nmoles/ml et 100 nmoles/ml. Par conséquent, l'histidine incorporée au peptide ANG4 est fortement liée au synthon tricarbonyl technétié. Le complexe est stable (Figure 69, Tableau XVIII).

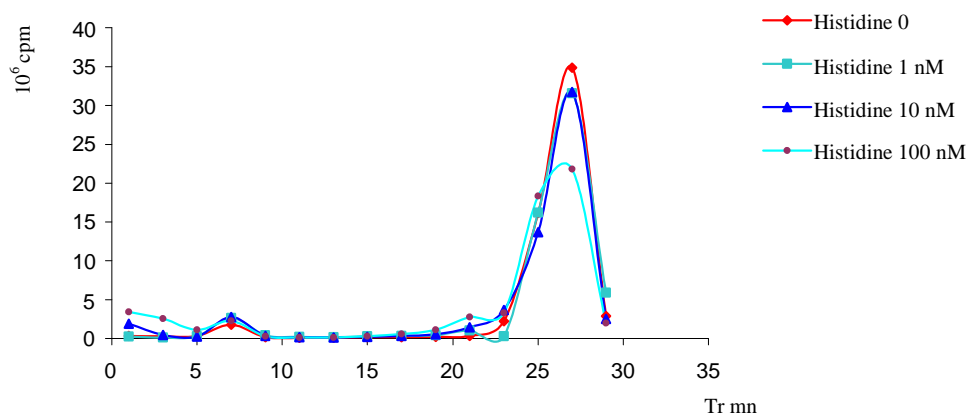


Figure 69 : Stabilité du marquage de ANG4-[^{99m}Tc] en milieu biologique. Etude de la réaction de transchélation en présence de concentrations croissantes de L-histidine à 1 nmole/ml, 10 nmoles/ml et 100 nmoles/ml. Analyse CLHP, colonne C18 Bondapak 5µm 20 cm, gradient d'élution (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn 5 % de A, de 5 à 25 mn 80 % de A et de 25 à 35 mn 80% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur de radioactivité.

Histidine	0	1 nmole	10 nmoles	100 nmoles
PRC %	94,0%	91,5%	88,3%	80,2%

Tableau XVIII : Evolution de la PRC d'une solution de ANG4-[^{99m}Tc]. 1 nmole en RGD-Raft-H est mise en présence de concentrations croissantes d'histidine, à 1 nmole, 10 nmoles et 100 nmoles.

- Stabilité en présence de cystéine

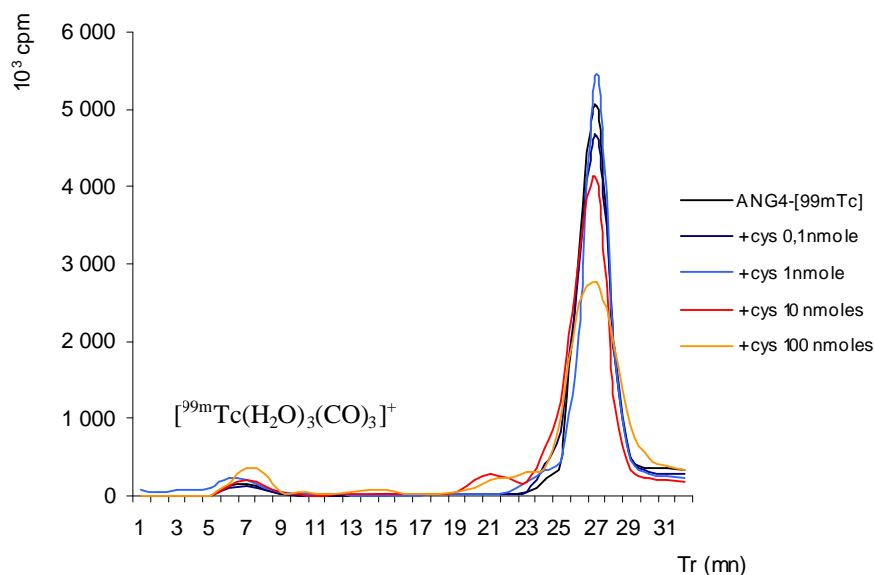
Une solution de cystéine à 1 mg/ml préalablement incubée à 37°C en présence de [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ et analysée en CLHP, présente à l'analyse radiochromatographique deux pics d'activité : un pic à 21,5 minutes et un pic à 25 minutes qui se superpose au pic de ANG4-[^{99m}Tc].

La solution de ANG4-[^{99m}Tc] est incubée en présence de cystéine (ligand du synthon tricarbonyle) en excès, pendant 2 heures. Après 1 heure d'incubation, en présence de cystéine à 10 nmoles/ml, des métabolites sont identifiés dans la solution par CLHP. Ces métabolites présentent des temps de rétention de 21 minutes et de 25 minutes, temps de rétention qui correspondent au temps de rétention des produits de la réaction d'un mélange cystéine-[^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃] (Figure 70). Une transchélation entre les trois atomes d'azote donneurs du peptide (dont les deux azotes de l'histidine) et les atomes donneurs (azote et soufre) de la cystéine est observée ; la cystéine déplace la liaison du complexe tricarbonyle avec l'histidine ([^{99m}Tc (his)(CO)₃]) pour former un nouveau complexe [^{99m}Tc(cys)(H₂O)(CO)₃]⁺. A la concentration en cystéine de 10 nmoles/ml, le rapport

molaire cystéine/peptide est de 10/1 et le rapport molaire cystéine/peptide marqué est de 1000/1.

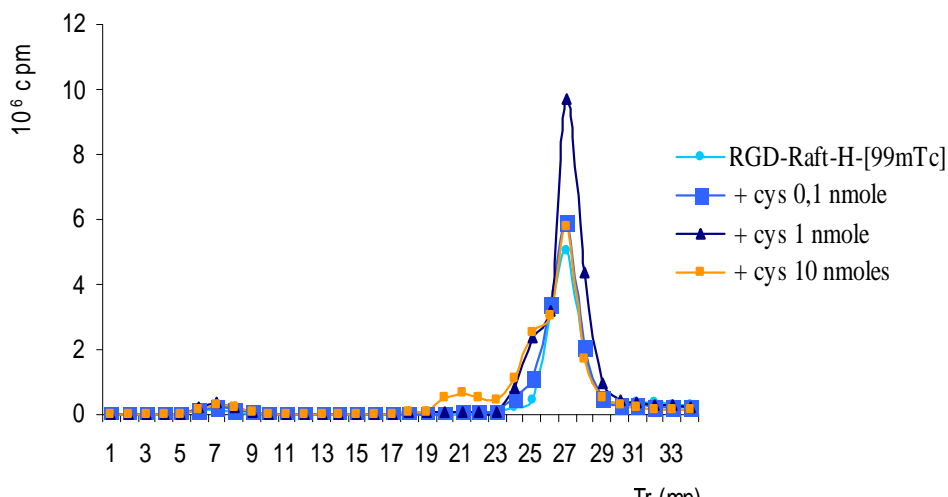
Après 2 heures d'incubation, une transchélation entre les atomes donneurs N du peptide (dont les deux azotes de l'histidine) et les atomes donneurs S et N de la cystéine sont observés à la concentration de 1 nmole/ml (Figure 71). Le rapport molaire cystéine/peptide est de 1/1 et le rapport molaire cystéine/peptide marqué est de 100/1.

Une augmentation de la concentration en $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ est observée avec l'augmentation de la concentration en cystéine mais cette augmentation est faible. De même, le taux d'impuretés (métabolites intermédiaires) augmente avec la concentration de cystéine en solution. Cependant, même en présence d'un large excès de ligands donneurs (cystéine), l'activité correspondant à ANG4- $[^{99m}\text{Tc}]$ demeure supérieure à 70% de l'activité totale.



Cystéine	0	0,1 nmole	1 nmole	10 nmoles	100 nmoles
	Activité au niveau du pic / Activité totale en %				
De 6 à 9 minutes	2,9	2,9	4,7	4,0	6,8
De 20 à 23 minutes	1	1,1	2,2	6,9	6,3
De 27 à 28 minutes	85,9	85,1	83,3	71,2	70,1

Figure 70 : Déplacement de la liaison au technétium du peptide ANG4- $[^{99m}\text{Tc}]$ en présence de concentration croissante de cystéine. La molécule radiomarquée à 1 nmole/ml est incubée à 37°C pendant 60 minutes en présence de cystéine à 0,1 nmole/ml, 1 nmole/ml, 10 nmoles/ml et 100 nmoles/ml.



Cystéine	0	0,1 nmole	1 nmole	10 nmoles
	Activité au niveau du pic / Activité totale en %			
De 5 à 10 minutes	2,00	3,46	3,95	4,75
De 19 à 23 minutes	0,63	0,52	0,68	1,11
De 23 à 26 minutes	1,82	3,98	3,92	9,36
De 26 à 29 minutes	95,9	90,71	89,84	71,11

Figure 71 : Déplacement de la liaison au technétium du peptide ANG4-[^{99m}Tc] en présence de concentrations croissantes de cystéine. La molécule radiomarquée à 1 nmole/ml est incubée à 37°C pendant 2 heures en présence de cystéine à 0,1 nmole/ml, 1 nmole/ml, 10 nmoles/ml.

- Stabilité en présence de sérum de veau fœtal

In vitro, aucune décomplexation du vecteur n'est observée après 1 heure d'incubation du radiopeptide en présence de sérum de veau fœtal. Sur une durée d'incubation de 3 heures, le complexe reste stable. Le pourcentage d'impuretés radioactives, essentiellement sous forme de pertechnétate ^{99m}Tc et de complexe tricarbonyl [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺, est inférieur à 10% de l'activité totale (Figure 72).

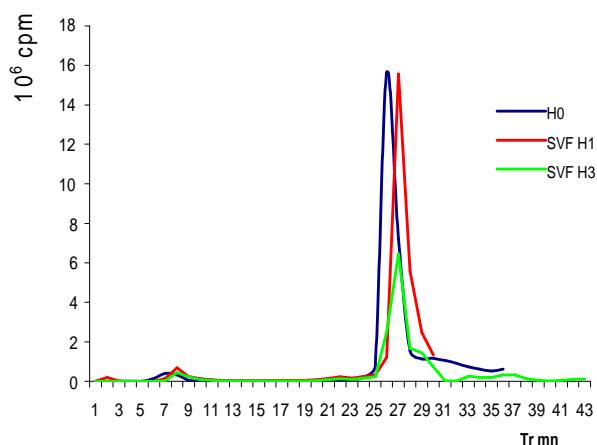


Figure 72 : Evolution de la PRC d'une solution de ANG4-[^{99m}Tc] à 1 nmole incubée en présence de sérum de veau fœtal pendant 1 heure ou 3 heures, à 37°C sous agitation. Le sérum est analysé par CLHP sur colonne C18, gradient acétonitrile / eau / TFA 0,1%. L'éluat est recueilli en sortie de colonne et mesuré au compteur gamma.

III-1-2-2) Stabilité sanguine de ANG4-[^{99m}Tc]

La chromatographie ne permet pas de séparer les molécules radioactives qui restent fixées sur la colonne. Il existe vraisemblablement une forte liaison aux protéines plasmatiques, liaison déjà observée lors des expériences précédentes *in vitro* (test au TCA, électrophorèse). A 24 heures, le technétium 99m est essentiellement présent sous forme de pertechnétate ou de métabolites très polaires dans le sérum.

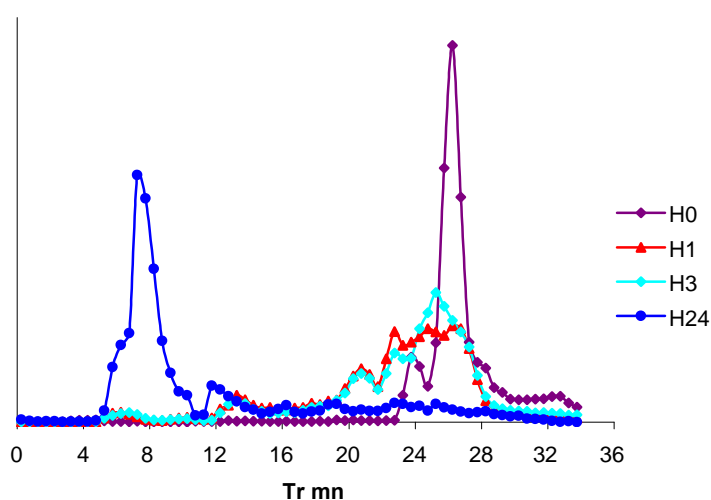


Figure 73 : Analyse *in vitro* de la stabilité sanguine de ANG4-[^{99m}Tc]. Incubation de ANG4-[^{99m}Tc] pendant 24 heures à 37°C sous agitation. Mesure CLHP d'une aliquote à 1, 3 et 24 heures.

III-2) Etudes analytiques des prélèvements sanguins et urinaires : analyses *in vivo*

III-2-1) Etudes analytiques des peptides iodés

Après contrôle de la pureté radiochimique du peptide iodé, 370 KBq de peptide radiomarqué sont injectés chez la souris. Cette injection est réalisée au niveau d'une veine latérale de la queue. A la fin de l'expérience, un échantillon de sang est prélevé. Le sang est centrifugé et le sérum est analysé par CLHP. La stabilité du marquage est analysée par mesure de l'activité. Ces analyses ont été réalisées pour ANG1-[¹²⁵I], ANG2-[¹²⁵I], et ANG3-[¹²⁵I].

- L'analyse d'échantillons sanguins de souris prélevés 1 heure après l'administration du radioligand ANG1-[¹²⁵I] ou ANG2-[¹²⁵I]. montre une désiodation rapide de la molécule

marquée avec 50 à 70% d'iode libre dans le sérum, en fonction des animaux. Chez une souris, on détecte un métabolite intermédiaire à 8 mn qui n'a pas été retrouvé dans d'autres analyses (souris n°3, Figure 74).

- L'analyse du contenu de l'estomac et de la paroi stomacale d'une souris 3 heures après l'administration de ANG1-[¹²⁵I], après passage dans une solution d'acétone, montre la présence d'iode libre mais aussi de peptide iodé.

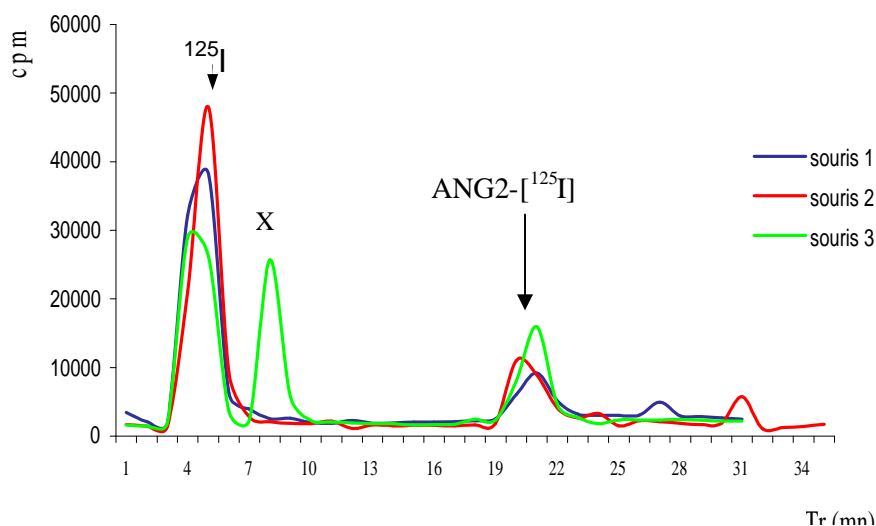


Figure 74 : Stabilité du marquage du peptide ANG2-[¹²⁵I]. Analyse du sérum de souris 1H post IV. Analyse par CLHP : colonne C18, gradient d'élution (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) : 0-5 mn 10% de A, 5-20 mn de 10 % à 60% de A, 20-35 mn 60 % de B, débit 0,7 ml/mn.

- Le peptide ANG3-[¹²³I] a été injecté chez le lapin athéromateux afin d'observer la fixation des peptides « $\alpha_v\beta_3$ » sur les plaques d'athérome. L'analyse du filtrat, 2 heures après l'injection, n'a pas mis en évidence la présence d'iodures libres. A 3 heures, 10% de l'activité totale est présente sous forme d'iodures.

Ces résultats sont corrélés avec les résultats obtenus lors de l'analyse des images scintigraphiques. Chez la souris, les peptides iodés sont désiodés *in vivo*, avec apparition d'une fixation stomacale et thyroïdienne croissante au cours du temps. Chez le lapin, l'image thyroïdienne montre la présence d'un faible spot à 3 heures. Il existe une spécificité d'espèce, probablement d'origine enzymatique, expliquant la désiodation *in vivo* du peptide chez la souris.

III-2-2) Etudes analytiques de RGD-Raft-H-[^{99m}Tc] (ANG4-[^{99m}Tc])

- Analyses sanguines

Dans le sang, la concentration de ANG4-[^{99m}Tc] décroît rapidement, ce qui rend les analyses difficiles et peu reproductibles. 4 heures après l'injection du radioligand, la concentration sérique est faible et la méthode d'analyse CLHP avec détection gamma peu sensible ; c'est pourquoi aucune conclusion ne peut être donnée.

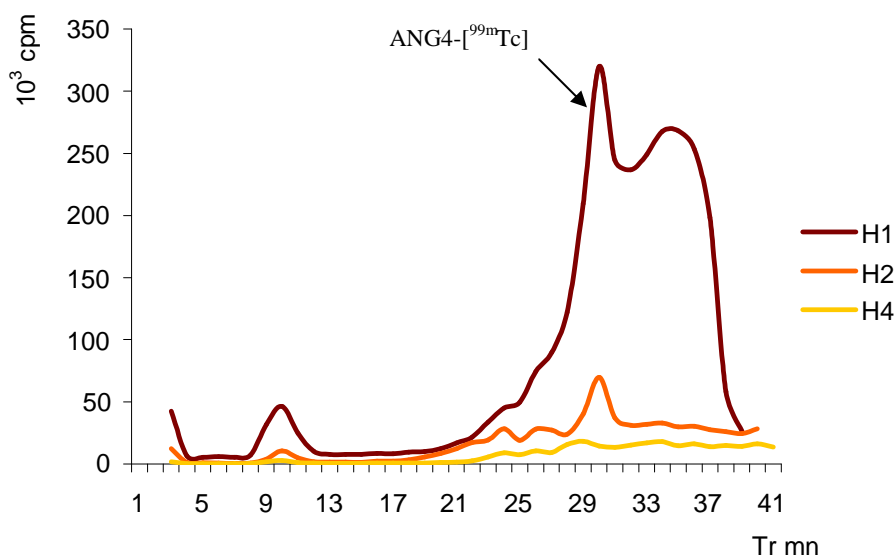


Figure 75: Analyse par CLHP de sérum de souris après administration de 20 MBq de ANG4-[^{99m}Tc]. Prélèvements 1 heure, 2 heures et 4 heures après administration. Analyse sur colonne Bondapak C18, gradient d'élution acétonitrile/ eau avec 0,1% de TFA, débit 0,7 ml.

Au niveau sanguin, on retrouve du technétium 99m sous forme libre en faible pourcentage, et le synthon technétié [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ (Tr 10 mn) (10%). Aucun métabolite de ANG4-[^{99m}Tc] n'est observé entre 10 et 28 minutes de rétention, le peptide marqué possédant un temps de rétention de 28 mn. La fixation de ANG4-[^{99m}Tc] sur les protéines plasmatiques est probable, ce qui pourrait expliquer, pour le prélèvement effectué une heure après l'administration de la molécule marquée, l'activité persistante dans la colonne après 28 minutes d'élution (n=3). 2 heures après l'administration de la molécule, l'activité sanguine est insuffisante pour pouvoir détecter un métabolite, et il persiste un bruit de fond important sur la colonne qui ne permet aucune interprétation (Figure 75)

Il n'a pas été possible de déterminer si le pic à 34 minutes correspond à un produit de dégradation ou à notre radioligand fixé aux protéines plasmatiques.

- Analyses des urines

L'élimination du peptide ANG4-[^{99m}Tc] et de ses métabolites se fait essentiellement par voie urinaire.

Des prélèvements urinaires sont réalisés chez deux souris deux heures après l'injection 30 MBq de ANG4-[^{99m}Tc]. Puis deux prélèvements urinaires sont effectués chez une souris, à la sortie des voies émonctoires, 2 heures et 4 heures après l'administration du traceur. Chez cette dernière souris, 2 heures après l'injection du traceur, on recueille 80 µl d'urine avec une activité de 1,48 MBq ; 4 heures après l'injection on recueille 150 µl d'urine avec une activité de 600 KBq (la mesure de l'activité volumique est de 18,5 GBq/L à 2 heures et de 4,4 GBq/L à 4 heures).

- Dans l'urine recueillies 2 heures après l'injection du traceur, sont détectés le peptide technétié sous forme non métabolisé (temps de rétention (Tr) à 27 mn), et plusieurs molécules technétiées (métabolites du peptide marqué ou molécules biologiques ayant fixé le technétium 99m) dont une molécule avec un temps de rétention de 13 minutes (1 analyse), une molécule avec un temps de rétention de 21 minutes (3 analyses), et une molécule avec un temps de rétention de 25 minutes (3 analyses). Chez les deux premières souris, le peptide marqué est éliminé à 30% sous forme non métabolisée (Figure 76), chez la troisième souris, on retrouve essentiellement des métabolites dans les urines (Figure 77).

- Dans l'urine recueillies 4 heures après l'injection du traceur, sont détectés le peptide technétié sous forme non métabolisée (temps de rétention (Tr) à 27 mn), plusieurs molécules marquées dont une molécule avec un temps de rétention de 8 minutes (probablement [^{99m}Tc (H₂O)₃(CO)₃]⁺ ou ^{99m}TcO₄⁻), une molécule avec un temps de rétention de 21 minutes, une molécule avec un temps de rétention de 24 minutes, et une molécule avec un temps de rétention de 30 minutes. L'activité du premier pic ([^{99m}Tc (H₂O)₃(CO)₃]⁺) ne dépasse pas 5 à 10 % de l'activité totale de l'échantillon en fonction des expériences.

1 heure après son administration, le traceur est majoritairement présent dans l'urine sous forme non métabolisée (50% de l'activité chez 2 souris). 2 à 3 heures après son administration, 20 à 30% du traceur est présent sous forme non métabolisée (ANG4-

[^{99m}Tc]) (3 analyses). Des métabolites technétiés urinaires apparaissent dans les urines et leurs proportions augmentent au cours du temps.

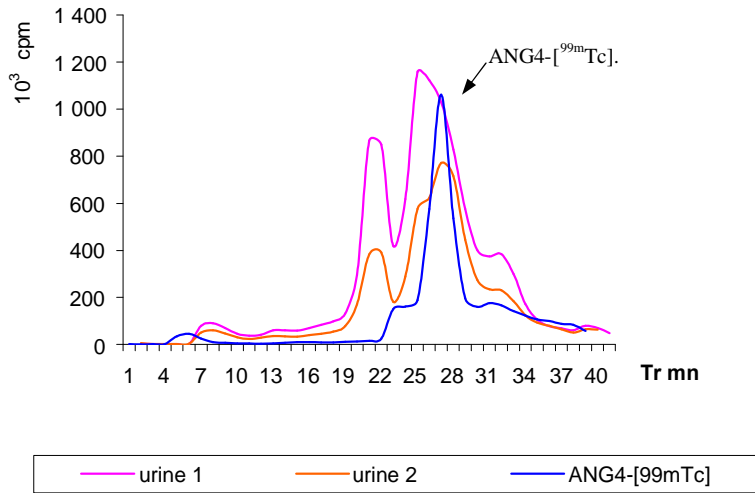


Figure 76 : Analyse des urines de souris 2 heures après l'injection de 30 MBq de ANG4-[^{99m}Tc] (2 souris). CLHP des urines sur colonne C18, gradient acétonitrile/eau/TFA 0,1%, débit 0,7 ml/mn, détection de la radioactivité par une sonde γ Novelec. Recueil de l'éluat en sortie de colonne et comptage au compteur gamma.

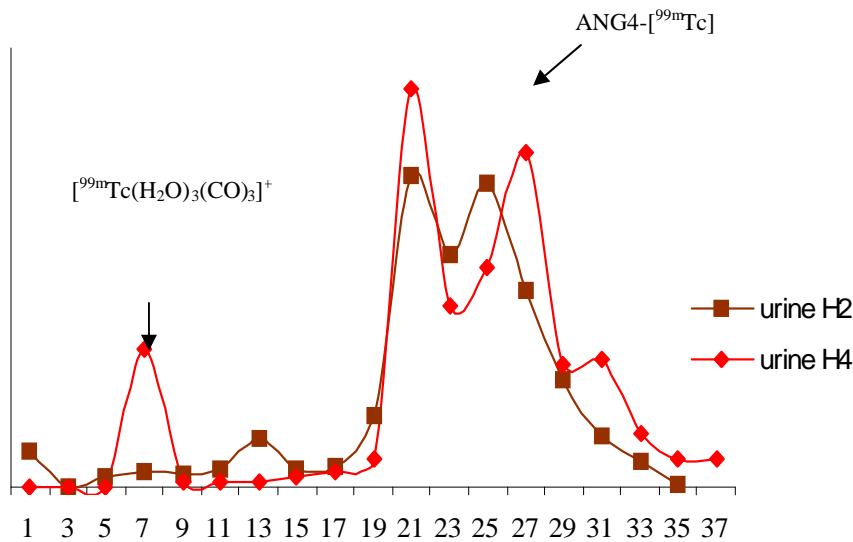


Figure 77 : Analyse des urines d'une souris 2 heures et 4 heures après l'injection de 30 MBq de ANG4-[^{99m}Tc]. CLHP des urines sur colonne C18, gradient acétonitrile /eau /TFA 0,1%, débit 0,7 ml/mn, détection de la radioactivité par une sonde γ Novelec. Recueil de l'éluat en sortie de colonne par fraction de 0,7 ml et comptage au compteur gamma. (l'échelle des activités des comptages à H4 est multipliée par quatre).

IV) EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DES TRACEURS : ETUDES PRECLINIQUES

Les expérimentations sur animaux ont été réalisées chez la souris Balb/c , C57B1/6, ou chez la souris « nude » en conformité avec les lois sur l'expérimentation animale. la préparation est injectée au niveau d'une veine latérale de la queue de la souris. Les molécules iodées sont injectées à raison de 3,7 MBq par souris et les peptides technétiés à raison de 20-30 MBq par souris. Des échantillons des principaux organes sont prélevés, pesés et mesurés au compteur gamma Cobra pour l'étude de la biodistribution du traceur. Ces résultats sont corrélés à l'étude des images scintigraphiques.

IV-1) Biodistribution des peptides RGD181-[¹²⁵I] (ANG3-[¹²⁵I]) et RGD-Raft175-[¹²⁵I] (ANG1-[¹²⁵I])

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe. Dans un premier temps, nous avons analysé la cinétique de biodistribution de chaque traceur sur différentes espèces de souris, Balb/c, C57B1/6, et « nude » (n=15), puis nous avons comparé les deux traceurs sur un échantillon de souris Balb/c stabulée et élevé en même temps et dans les mêmes conditions.

- **Biodistribution de ANG3-[¹²⁵I]**

- L'accumulation du peptide dans les organes est maximale deux heures après l'administration du traceur, et ce quel que soit l'organe mesuré, puis elle décroît rapidement (Figure 78).

- On retrouve une fixation importante dans les reins et une légère accumulation de l'activité dans le foie, l'intestin et la rate : la molécule est métabolisée par voie rénale et par voie hépatique. Cependant, la molécule est éliminée prioritairement par les voies urinaires (Figure 78). L'élimination est rapide : deux heures après l'injection, 10% de l'activité initiale est retrouvée dans les reins. Dans les urines, les études analytiques ont montré que l'activité est présente essentiellement sous forme d'iodure libre. La thyroïde n'a pas été prélevée mais les images scintigraphiques montrent une fixation thyroïdienne importante.

- L'activité stomacale, paroi et contenu stomacal, est importante. Chez une souris, qui a reçu 370 KBq de ANG1-[¹²⁵I], 90 KBq (24%DI) sont retrouvés dans l'estomac, 1 heure après l'administration du traceur.
- La molécule ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (Figure 78).
- 8 heures après l'administration du produit, l'activité a fortement diminué dans tous les organes prélevés. L'activité sanguine résiduelle est faible. Le traceur a été éliminé de l'organisme dans les urines. L'activité totale dans la vessie ainsi que l'activité éliminée par l'animal entre deux scintigraphies n'ont pas été mesurées.

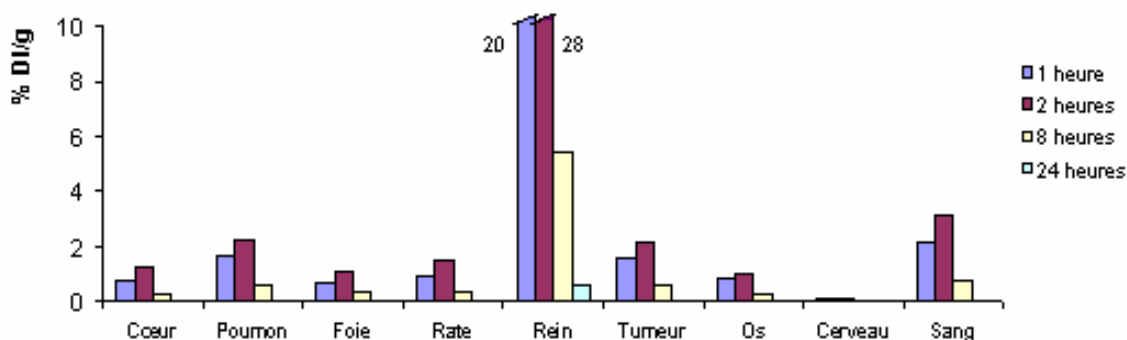


Figure 78 : Cinétique de biodistribution de ANG3-[¹²⁵I] chez la souris (n=15). Les organes sont prélevés chez la souris 1, 2, 8 et 24 heures après l'administration de la molécule marquée.

• Biodistribution de ANG1-[¹²⁵I]

ANG1-[¹²⁵I] présente une biodistribution comparable à celle du peptide cyclique ANG3-[¹²⁵I].

- Dans tous les organes sauf les reins, l'activité est inférieure ou égale à 2 % DI/g. ANG1-[¹²⁵I] est éliminé préférentiellement par les voies urinaires. 5% de l'activité totale injectée est retrouvée dans les deux reins 1 heure après l'injection du traceur.
- Il existe une faible fixation hépatique et splénique.
- On observe cependant une augmentation progressive du traceur dans le sang, de 1 à 6 heures post-injection puis l'activité chute pour être voisine de 0 % à 24 heures (Figure 79),.

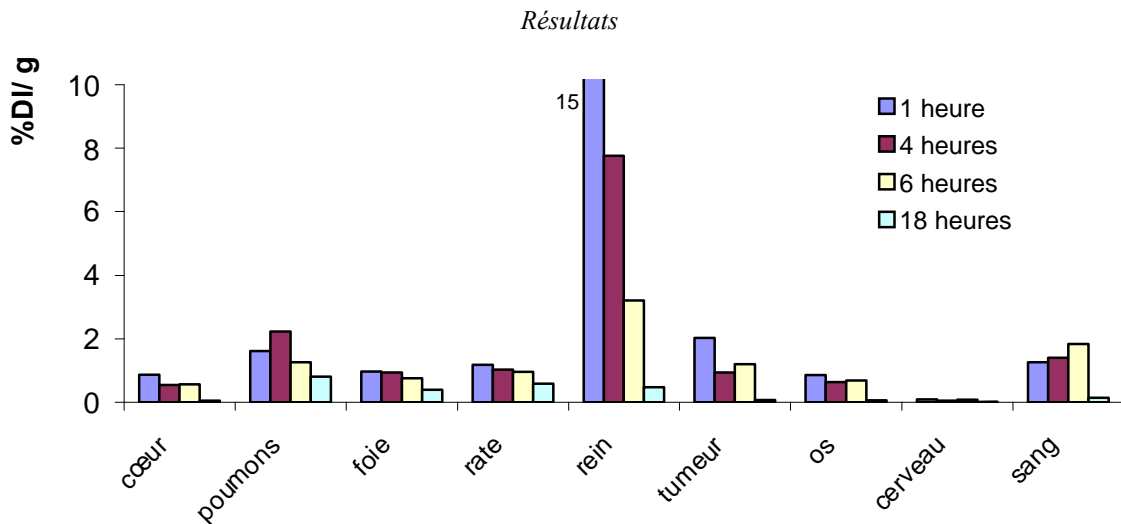


Figure 79 : Biodistribution de ANG1-¹²⁵I marqué à l'iode 125 chez la souris (n=15). Etude de la biodistribution en fonction du temps, prélèvement 1 heure, 4 heures, 6 heures, et 18 heures après l'injection.

- Comparaison de ANG1-¹²⁵I et ANG3-¹²⁵I chez la souris Balb/c

La biodistribution des deux traceurs a été analysée chez la souris Balb/c 1 et 4 heures après leur administration. L'activité est exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe(Figure 80).

- Une heure après l'injection de la molécule marquée (Figure 80, graphe A), les activités sanguine et rénale de ANG3-¹²⁵I sont plus importantes que celles de ANG1-¹²⁵I. En moyenne, l'activité rénale de ANG3-¹²⁵I est de 18% DI/g, celle de ANG1-¹²⁵I est de 15 %DI/g. La distribution de l'activité est comparable dans les autres organes.

- Par contre, quatre heures après l'injection (Figure 80, graphe B), les activités rénale et sanguine de ANG3-¹²⁵I sont inférieures à celle de ANG1-¹²⁵I. L'activité rénale de ANG3-¹²⁵I a été divisée par quatre alors que celle de ANG1-¹²⁵I a été divisée par deux (Figure 80) (ANG3-¹²⁵I 5% DI/g et ANG1-¹²⁵I 7 %DI/g). La clairance rénale de ANG3-¹²⁵I est supérieure à celle de ANG1-¹²⁵I.

- La captation pulmonaire de ANG1-¹²⁵I augmente progressivement au cours du temps alors que la captation de ANG3-¹²⁵I reste constante.

- L'activité cérébrale pour les deux traceurs est faible, la molécule est hydrophile et ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique.

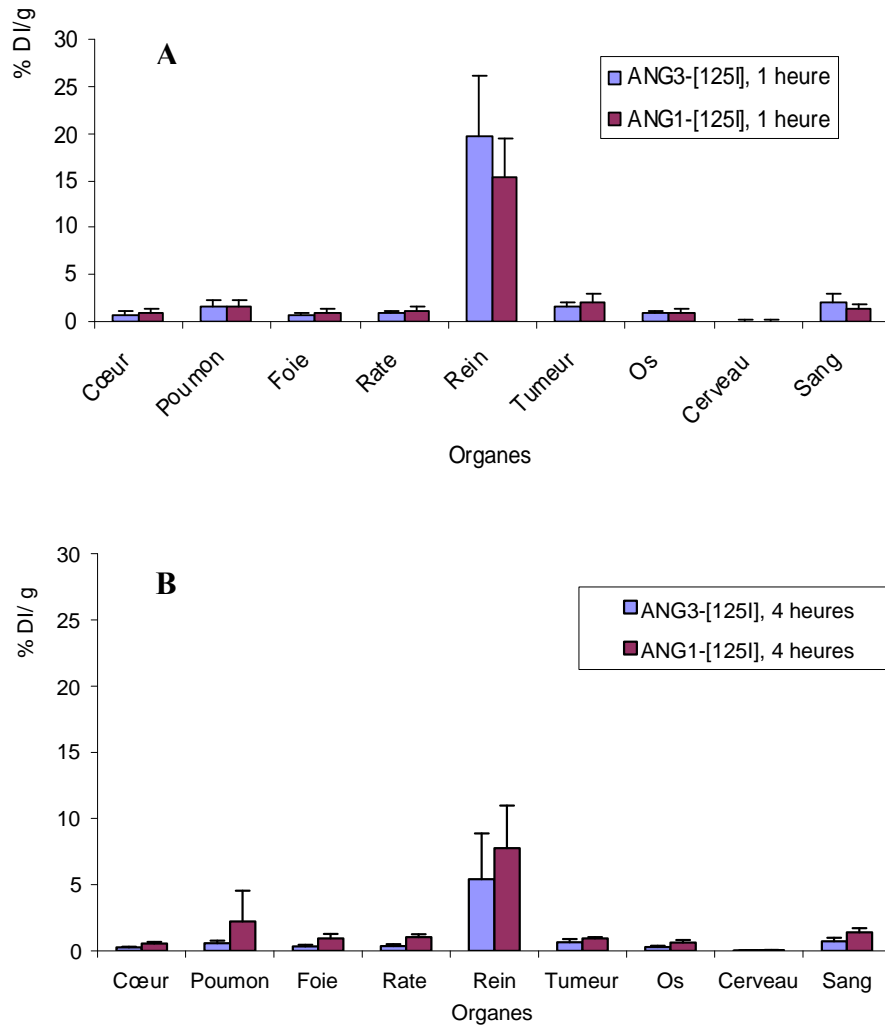


Figure 80 : Comparaison des biodistributions de ANG1-[¹²⁵I] et de ANG3-[¹²⁵I] chez la souris Balb/c. Etude de la biodistribution 1 heure (A), et 4 heures (B), après l’injection des traceurs. Activité exprimée en %DI/g.

Une étude statistique des biodistributions des peptides ANG1-[¹²⁵I] et ANG3-[¹²⁵I], 4 heures après leur administration (pour les organes cœur, poumons, foie, rate, reins, estomac, intestin, pancréas, muscle, os, tumeur, cerveau, et sang) a été effectuée par différents tests statistiques d’analyse des moyennes de petits échantillons : test de Mann et Whitney avec lecture dans la table de U, test d’égalité des variances, comparaison des moyennes de petits échantillons et lecture dans la table de l’écart-réduit (Tableau XIX). Pour les trois tests, une différence significative est observé dans deux organes, les reins et l’intestin, avec un risque d’erreur < 5 %.

Organe	t	p
Cœur	1,78	NS
Poumons	0,60	NS
Foie	0,07	NS
Rate	0,97	NS
Rein	3,06	<0,05
Estomac	0,41	NS
Intestin	2,96	<0,05
Pancréas	0,16	NS
Muscle	1,27	NS
Os	1,25	NS
Tumeur	0,30	NS
Cerveau	0,58	NS
Peau	0,47	NS
Sang	0,99	NS

Tableau XIX : Comparaison des biodistributions de ANG3- ^{125}I , et ANG1- ^{125}I chez la souris Balb/c. Etude statistique : comparaison des moyennes de petits échantillons. Lecture sur la table de l'écart-réduit t avec ddl = 7.

La comparaison des pharmacocinétiques nous montre que la cinétique d'élimination de ANG3- ^{125}I est plus rapide que celle de ANG1- ^{125}I avec une élimination rénale prépondérante pour les deux traceurs (Figures 78 à 80). Le pourcentage de l'activité totale injectée exprimé en DI/g dans les principaux organes est de 2 à 5 % sauf pour les reins et le foie où il augmente légèrement pendant les premières heures puis il diminue rapidement, probablement par désiodation de la molécule et élimination des iodures libres. L'élimination hépato-biliaire de ANG1- ^{125}I est plus importante en raison de son haut poids moléculaire et de sa plus grande lipophilie.

ANG3- ^{125}I , de plus petite taille et plus hydrophile que ANG1- ^{125}I , présente une vitesse d'élimination plus rapide que le dérivé Raft. La désiodation observée *in vitro* et *in vivo* est moins importante et plus lente que celle du dérivé Raft. L'activité circulante de ANG1- ^{125}I ainsi que la désiodation *in vivo* sont défavorables à l'imagerie.

IV-2) Biodistribution de RGD-Raft-H- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (ANG4- $^{99\text{m}}\text{Tc}$)

- La clairance sanguine de ANG4- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ est plus lente que celle des dérivés iodés : 1 heure après l'injection du traceur 10%DI/g persiste dans le sang contre 2% pour ANG1- ^{125}I et ANG3- ^{125}I . Sachant qu'en moyenne une souris de 20 g contient 1,4 ml de sang, l'activité sanguine totale peut être évaluée à 15% de la dose injectée initiale.

▪ La molécule est éliminée par les voies rénale et hépatique (Figure 81). 1 heure après l'injection du traceur, 15 à 20% de l'activité est localisée dans les deux reins et 30% de l'activité injectée est localisée dans le foie. (la masse d'un foie de souris est de 1,5g, celle d'un rein de 0,15g). La fixation hépatique pourrait être liée à la taille de la molécule, et à sa grande lipophilie. On observe une fixation dans l'estomac qui pourrait être liée à la présence de pertechnétate, mais aucune fixation thyroïdienne n'est observée sur les images scintigraphiques.

▪ 4 heures après l'administration, les activités ont été diminuées de moitié dans tous les organes sauf dans les organes de la voie hépato-gastrique à savoir le foie, l'estomac et l'intestin. Le traceur est éliminé par voie hépato-biliaire.

▪ 24 heures après l'administration du traceur, il persiste toujours une activité hépatique et rénale.

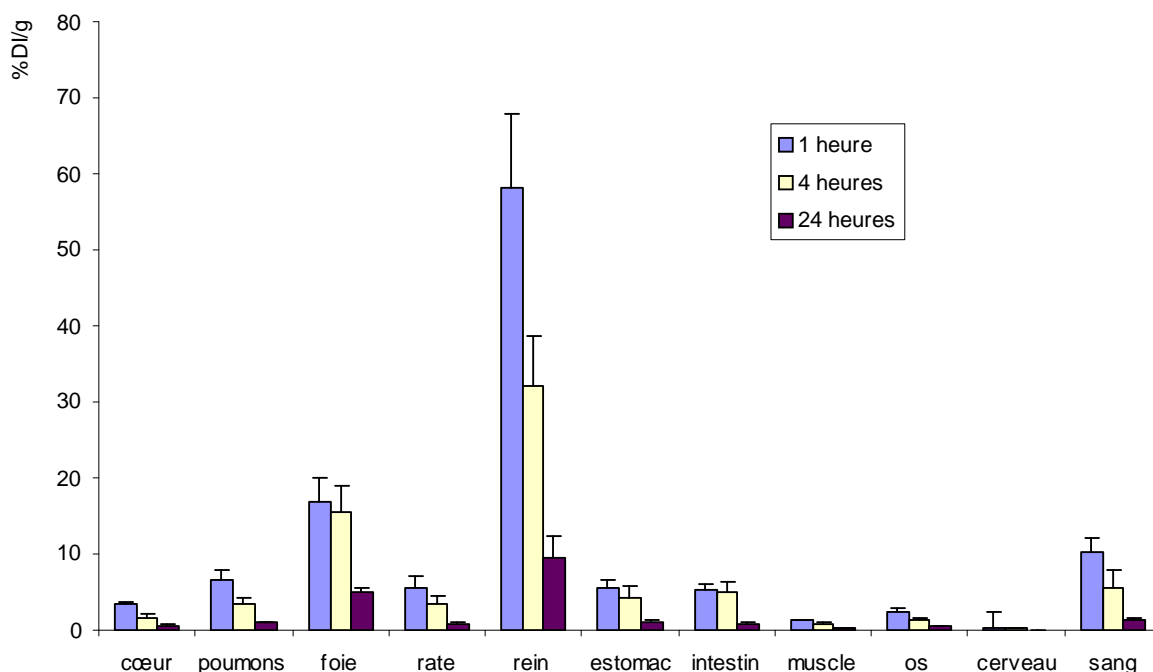


Figure 81 : Biodistribution de ANG4-[^{99m}Tc] chez la souris, après administration de 18,5 MBq de peptide. Prélèvement 1 heure (n= 12), 4 heures (n= 16) et 24 heures (n= 3) après l'administration du traceur.

IV-3) Images scintigraphiques

Les études scintigraphiques des peptides marqués à l'iode 125 et au technétium 99m chez la souris ont été réalisées sur la caméra dédiée petit animal (γ Imager Biospace). La souris est placée le dos directement sur le collimateur, la tête vers l'avant.

IV-3-1) Image scintigraphique de RGD-Raft175-[¹²⁵I] (ANG1-[¹²⁵I])

- 4 heures après l'injection du traceur, une fixation thyroïdienne, rénale, et vésicale est observée. On remarque l'absence de fixation hépatique et une faible fixation stomacale. Cependant, une fixation stomacale importante a été observée sur certaines images, et l'analyse chromatographique du contenu de l'estomac a confirmé la présence d'iodure libre. Il existe donc une désiodation progressive du peptide (Figure 82).
- Le traceur est rapidement éliminé de l'organisme par voie urinaire (Figure 82).

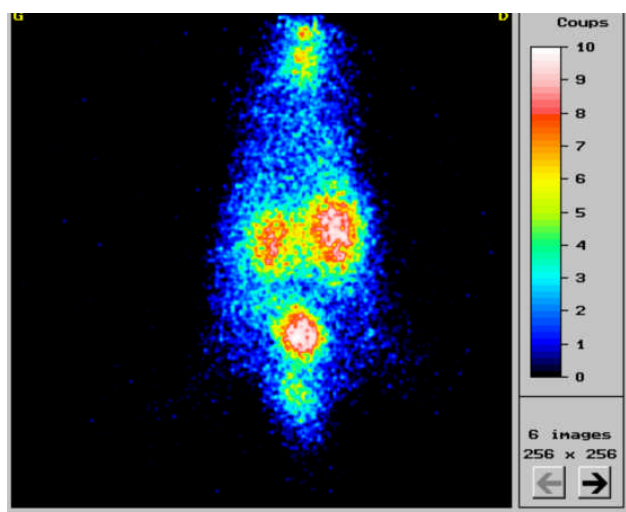


Figure 82 : Image scintigraphie de souris 4 heures après l'injection de ANG1-[¹²⁵I]. Injection au niveau de la queue de la souris (masquée sur l'image). Il existe une accumulation isotopique au niveau des reins et de la vessie, ainsi qu'au niveau de la thyroïde.

IV-3-2) Images scintigraphiques de RGD-Raft-H-[^{99m}Tc] (ANG4-[^{99m}Tc])

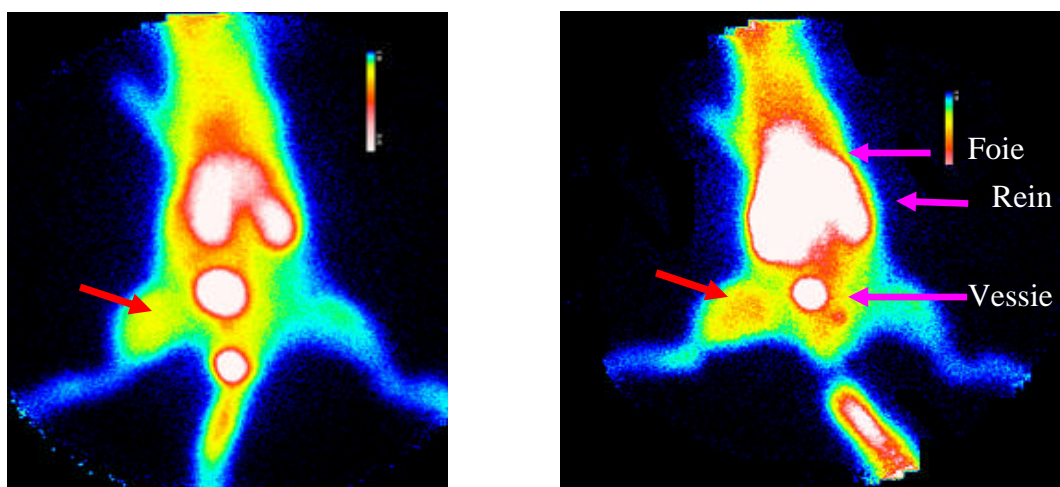


Figure 83 : Images scintigraphiques de ANG4-[^{99m}Tc] chez la souris C57Bl/6J porteuse de tumeur B16F0 $\alpha_v\beta_3^+$, 2 heures post-injection. La tumeur est implantée dans la cuisse droite (flèche rouge). On observe une hyperfixation rénale, vésicale et hépatique. Images scintigraphiques chez deux souris.

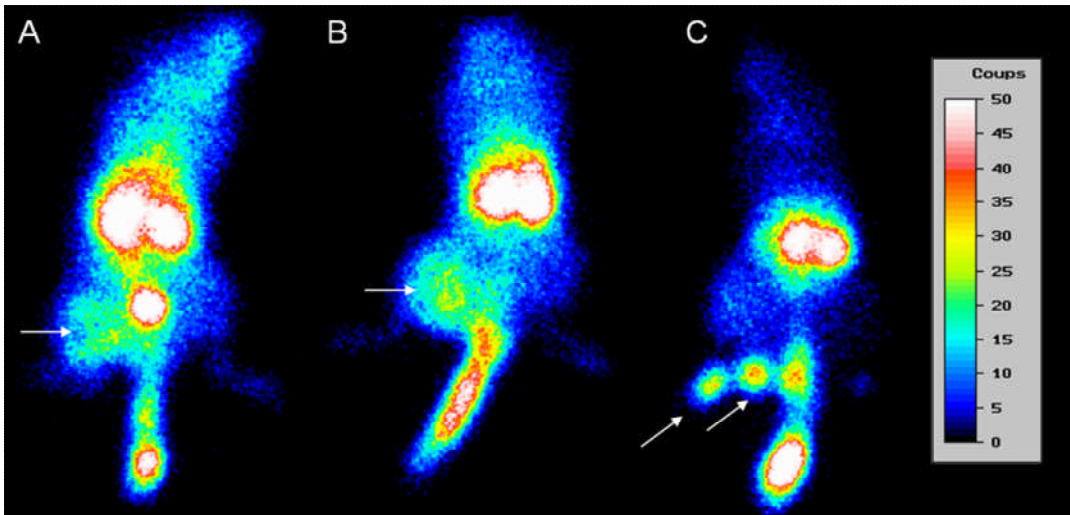


Figure 84 : Images scintigraphiques du ANG4-[^{99m}Tc] chez la souris C57Bl/6J porteuse de tumeur B16F0, $\alpha_v\beta_3^+$ à 30 minutes (A), 1 heure (B) et 2 heures (C) post-injection. La tumeur est indiquée par une flèche. Les reins, un peu plus haut, captent fortement le traceur. Par ailleurs, on note le point d'injection du traceur dans la queue.

La fixation hépatique est beaucoup plus importante pour ANG4-[^{99m}Tc] que pour ANG1-[¹²⁵I]. Le produit est métabolisé par les voies rénale et hépatique (Figure 83). La fixation hépatique pourrait être liée à la taille de la molécule, à sa plus grande lipophilie et à sa fixation non spécifique sur les protéines plasmatiques (Figure 83).

Les peptides technétiés sont éliminés préférentiellement par voie urinaire. La fixation reste stable dans le temps.

On note une fixation plus importante dans la cuisse droite où la tumeur a été implantée par rapport au membre controlatéral contrôle. La captation tumorale augmente progressivement au cours du temps. La présence du chélate technétié ne modifie pas l'activité biologique du vecteur qui se concentre au niveau de la tumeur (Figure 84).

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION

La médecine nucléaire est une méthode de diagnostic non invasive dans de nombreuses pathologies. Ses indications principales sont l'oncologie, l'étude de la perfusion myocardique et les pathologies ostéo-articulaires. L'objectif de nos expériences est d'évaluer de nouveaux radiopharmaceutiques permettant, par imagerie non invasive, d'aider au diagnostic de deux processus pathologiques qui représentent un problème de santé publique : la plaque d'athérome, et plus précisément la plaque d'athérome vulnérable, et la néoangiogenèse tumorale.

La médecine nucléaire utilise une large gamme de radiopharmaceutiques de structures chimiques très différentes : des ions, des complexes métalliques, des traceurs biologiques, des protéines ou des colloïdes. Ce sont souvent de petites molécules organiques ou inorganiques. Depuis quelques années, de nombreux peptides marqués au technétium ont été développés. Le marquage des petits peptides reste attractif à cause de leurs propriétés biologiques et physiques : absence de pouvoir antigénique, site unique de reconnaissance aux récepteurs et clairance sanguine rapide.

Le radiomarquage des anticorps monoclonaux a débuté en 1970 pour la détection de tumeurs, puis la synthèse de nouveaux ligands pour la médecine nucléaire s'est orientée vers des structures protéiques et peptidiques. Initialement, le marquage était réalisé à l'iode radioactif ; cependant le développement de nouveaux chélates fonctionnels a permis la synthèse de traceurs organométalliques. La recherche préférentielle de ces traceurs organométalliques marqués à l'indium (^{111}In), au technétium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), au cuivre (^{64}Cu ou ^{67}Cu), à l'yttrium (^{90}Y) ou au rhénium (^{186}Re ou ^{188}Re) vient essentiellement d'un rapport tumeur/bruit de fond meilleur par rapport aux traceurs iodés en raison d'une meilleure stabilité du marquage.

Excepté pour les isotopes utilisés tels quels, l'étape de marquage est l'étape prépondérante de la préparation du radiopharmaceutique. Le challenge majeur des chimistes spécialisés dans les radiopharmaceutiques est de synthétiser des molécules marquées chimiquement et radiochimiquement pures, qui ne sont pas métabolisées *in vivo* avec une fixation de l'isotope à la molécule jusqu'à son élimination ou jusqu'à sa décroissance dans la cible, spécifiques d'un organe ou d'une fonction, qui se fixent avec

une bonne affinité sur leur cible, et qui sont rapidement éliminées de la circulation sanguine.

La connaissance de la chimie est indispensable pour marquer une molécule sans la dénaturer. Deux stratégies sont appliquées, que ce soit pour un marquage à l'iode ou au technétium 99m : la fixation (ou liaison) de l'isotope directement sur une molécule vectrice, et l'approche indirecte par l'intermédiaire d'un synthon bifonctionnel. Aujourd'hui, de nouveaux ligands bifonctionnels sont mis au point pour permettre un marquage simple, stable et rapide de biomolécules : DTPA, HYNIC, MAG3, carbonyle pour le technétium, tyrosine ou réactif de Bolton-Hunter pour l'iode.

La fixation de l'iode au substrat organique modifiant peu la structure de la molécule du fait de son faible encombrement stérique (par rapport à l'association chélate-isotope), il est utilisé essentiellement pour le marquage de petites molécules et des ligands de récepteur afin de limiter les interactions avec les sites de reconnaissance et les modifications des propriétés pharmacocinétiques de la molécule biologique. Le marquage à l'iode des peptides et des protéines permet de produire un traceur à haute activité spécifique. Cette caractéristique est nécessaire pour l'étude de voies métaboliques, l'étude de la liaison des ligands aux récepteurs ou les mesures physiologiques quantitatives. La radioiodation des peptides est donc une méthode de choix en recherche.

De nombreuses stratégies ont été développées pour marquer les peptides avec du technétium 99m. Cependant, la méthode de marquage peut avoir un effet important sur la biodistribution de la molécule surtout pour les petits peptides. L'encombrement stérique peut modifier de façon plus ou moins importante la structure de la molécule, chaque chélate possédant des propriétés qui lui sont propres. Ces deux facteurs peuvent modifier les propriétés physico-chimiques et biologiques des molécules marquées. Il est donc nécessaire de choisir le synthon en fonction de ses propriétés intrinsèques et en fonction de la molécule à marquer.

La réaction de marquage doit être définie et contrôlée afin de préparer une molécule avec une bonne activité spécifique. Elle doit présenter un bon rendement de marquage et la pureté radiochimique de la molécule active doit être supérieure, si possible, à 90% afin d'éviter une étape de purification supplémentaire difficilement réalisable en routine au laboratoire de préparation des radiopharmaceutiques.

Après avoir défini les conditions de marquage, il est nécessaire d'étudier le métabolisme de cette molécule et notamment la stabilité du marquage. L'iode est un bon groupe partant, il s'échange rapidement avec les halogènes en excès, notamment les atomes de chlore présents dans les solutés physiologiques. *In vivo*, la présence de désiodases, enzymes essentielles au métabolisme des hormones thyroïdiennes, conduit souvent à une désiodation de l'iode fixé sur une tyrosine et par analogie structurale sur le cycle aromatique de nombreuses molécules. Le métal peut être lié au chélate par des liaisons non covalentes, la stabilité du chélate va être fonction de la stabilité cinétique et thermodynamique du complexe, et donc de la nature des atomes donneurs, du nombre et de la structure du chélate. *In vivo*, certains acides aminés sont des chélatants du technétium 99m comme la cystéine, et une démétallation du traceur est toujours possible.

Le métabolisme des molécules radiomarquées regroupe différents phénomènes : la catalyse enzymatique des peptides, la formation de grosses molécules à partir d'un petit peptide, l'acétylation ou la glucuroconjugaison hépatique, la dissociation suivie ou non d'une transchélation du métal. La question que l'on doit se poser lors de l'imagerie nucléaire est donc de savoir à quoi correspond la radioactivité détectée : au ligand radiomarqué, à ses métabolites ou à l'isotope seul.

Enfin, le marquage par l'intermédiaire d'un halogène ou d'un chélate technétié a des conséquences importantes sur les caractéristiques physico-chimiques, pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la molécule biologique. L'influence de la méthode de marquage sur la biodistribution a été étudiée *in vitro* et *in vivo* et les résultats sont montrés dans ce travail ; l'influence du marquage sur l'activité biologique a été étudiée par A. Broisat pour les marqueurs de la plaque d'athérome (Broisat A. 2005) et L. Sancey pour les marqueurs de la neoangiogenèse (Sancey L 2006).

I) LES MARQUEURS DE LA PLAQUE D'ATHEROME : LES LIGANDS DE VCAM-1

Les traceurs évalués sont des dérivés de la molécule HLAB2702, ligand de la molécule d'adhésion VCAM-1. La cible VCAM-1 est surexprimée dans la plaque d'athérome vulnérable et sujette à la rupture. Ces ligands ont été radiomarqués à l'iode ou au technétium 99m par des méthodes susceptibles d'être utilisées en routine, et qui permettent la formation de complexes ou d'analogues marqués stables et utilisables chez l'homme. Les traceurs doivent présenter des propriétés pharmacocinétiques compatibles

avec une utilisation *in vivo* (clairance sanguine rapide, élimination urinaire, temps de diffusion vers la cible compatible avec la demi-vie de l'isotope) ; les modifications chimiques introduites dans la molécule afin de faciliter le radiomarquage ne doivent pas modifier la spécificité du ligand pour son récepteur.

- **Synthèse chimique**

Toutes les molécules peptidiques ont été synthétisées au LEDSS V de Grenoble (Pr P. Dumy) par le Dr. D. Boturny.

L'option de marquer les peptides au technétium 99m ou à l'iode 123/125 nécessite d'introduire des modifications chimiques sur la molécule biologiquement active. Plus ces modifications sont importantes, plus le risque d'inhiber l'affinité du ligand pour son récepteur augmente. Dans le cas de B2702(84-75) (ATH2) et de son dérivé B2702(75-84/84-75) (ATH1), la présence d'une tyrosine à l'extrémité C terminale de la chaîne peptidique a porté notre choix vers un marquage à l'iode par substitution électrophile de l'acide aminé aromatique. De ce fait, aucun spacer, synthon ou structure chimique supplémentaire susceptible de modifier la structure conformationnelle, et donc l'activité biologique, n'est ajouté sur la molécule biologiquement active (peptide froid). Cependant, la fixation d'un atome d'iode sur le ligand peut toujours entraîner une perte de reconnaissance pour la cible.

Le marquage au technétium est réalisé à l'aide d'un petit synthon tricarbonyle nouvellement commercialisé par la société Mallinckrodt sous forme de kit : l'Isolink[®]. Ce kit permet la formation d'un petit synthon tricarbonyle-technétium stable capable de se lier avec trois atomes donneurs. Le complexe idéal doit déplacer rapidement la liaison de coordination des molécules d'eau en raison de la demi-vie de l'isotope ; la stabilité du complexe doit être importante en raison de la présence de ligands donneurs en excès dans le sérum. Les études ont montré que l'histidine est l'acide aminé qui présente le plus d'affinité pour ce petit synthon hydrophile (Waibel R.1999, Bullok K.E. 2002). C'est pourquoi, il a été décidé de fixer sur le peptide B2702(84-75) un résidu histidine à l'extrémité N terminale, extrémité qui serait peu impliquée dans les mécanismes de reconnaissance. Ce peptide B2702(84-75)-H est appelé ATH3.

Dans un deuxième temps, le laboratoire de chimie du LEDSS V de Grenoble (Dr D. Boturny) a synthétisé une molécule vectrice constituée d'un gabarit cyclique polypeptidique, le Raft, sur lequel quatre structures B2702(84-75) ont été fixées :

[B2702(84-75)]₄-Raft-H (ATH4). Le Raft joue le rôle d'un bras espaceur entre les ligands et le système de détection (radioactivité, chimiluminescence, fluorescence), la disposition de part et d'autre du cycle des vecteurs et du traceur limitant les interactions ; il permet d'intégrer plusieurs ligands cibles dans une même structure (4 dans notre étude, 16 pour le marquage de dérivés du glucose) et donc d'augmenter l'avidité de la molécule marquée. Enfin, il aurait la propriété de faciliter l'internalisation de la molécule (Boturyn D. 2004).

- **Optimisation de la réaction de marquage**

- Le marquage à l'iode des peptides ATH1 et ATH2 est réalisé par substitution électrophile sur le résidu tyrosine (AA 75) naturellement présent dans la molécule biologiquement active à l'extrémité C terminale. L'iodation par la chloramine-T est la méthode de choix pour de nombreux composés contenant une structure phénolique dont les peptides, les protéines et les anticorps. Simple, facile, peu coûteuse, elle est réalisée par addition simple de chloramine-T et de NaI en présence du substrat puis incubation à température ambiante. La réaction est stoppée par adjonction d'un réducteur, le pyrosulfite de sodium. La réaction est rapide, elle dure quelques minutes (10-15 minutes). Les paramètres de la réaction d'iodation : concentration en peptide, taux de chloramine-T, temps de réaction, ont été optimisés afin d'obtenir une réaction complète et un marquage avec une bonne activité spécifique (5,5TBq/mmmole pour ATH1-[¹²⁵I] et 3,1 TBq/mmmole pour ATH2-[¹²⁵I]). La réaction peut être réalisée en milieu acide, neutre ou basique, bien que la méthode utilisée généralement se déroule dans un tampon neutre à température ambiante (pH 7,4). Ce radiomarquage est reproductible avec un bon rendement et une pureté radiochimique supérieure à 95%.

Cependant, la chloramine-T est un oxydant fort, susceptible de dégrader les peptides, c'est pourquoi des marquages par la méthode d'oxydation au N-bromosuccinimide et au couple lactoperoxydase/peroxyde d'hydrogène ont été étudiés et les paramètres de la réaction optimisés afin d'obtenir un produit avec une pureté radiochimique supérieure à 95%.

Deux remarques peuvent être faites :

- Le volume de solvant nécessaire pour dissoudre le peptide froid est plus important pour ATH1 que pour ATH2. Lorsque que l'on met un excès de sel (pyrosulfite de sodium) à une concentration dix fois supérieure à celle utilisée pour le (4 mg/ml) marquage, la molécule précipite dans la solution.

- Le peptide « double brin » ATH1 présente une fixation non spécifique sur de nombreux matériaux inertes, que ce soit sur les matériaux plastiques ou les colonnes d'analyse chromatographique.

- ATH3 et ATH4 sont complexés au technétium 99m par marquage indirect à l'aide d'un petit synthon tricarbonyle $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$. La cinétique de complexation du peptide nécessite une étape de chauffage à 80°C pour ATH3 et à 60°C pour ATH4 qui est dégradé si la température de réaction est supérieure ou égale à 80°C. Cette étape est indispensable, mais elle doit être contrôlée pour obtenir une pureté radiochimique supérieure à 90%. Elle dure environ 20 minutes. D'autres facteurs ont été déterminés, comme l'activité volumique qui joue un rôle important pour le marquage de ATH4, et la durée d'incubation. ATH4 moins soluble que ATH3 doit être marqué dans un volume minimum de 1 millilitre afin d'obtenir une pureté radiochimique supérieure à 90%.

- **Caractéristiques physico-chimiques des marqueurs.**

- Les traceurs iodés, ATH1- ^{125}I et ATH2- ^{125}I , sont solubles dans de nombreux solvants : eau, chlorure de sodium 0,9%, tampon phosphate PBS, éthanol, tous compatibles avec une administration chez l'homme. De même, dans ces mêmes solvants, les produits radiomarqués sont stables pendant plusieurs heures (24 heures en solution aqueuse), permettant ainsi leur préparation sous forme de médicament prêt à l'emploi ou de médicament multidoses.

ATH3- ^{99m}Tc et ATH4- ^{99m}Tc sont solubilisés dans une solution de NaCl 0,9%, solvant de l'éluat de technétium 99m. En solution, le marquage est très stable puisque aucune décomplexation (ni par libération du technétium 99m ni par perte du complexe technétié) n'a été observée après 6 heures d'incubation pour ATH3- ^{99m}Tc et 3 heures pour ATH4- ^{99m}Tc (PRC>90%). Ce paramètre permet leur utilisation sous forme de préparations multidoses. Par contre, *in vitro*, les réactions de transchélation ont montré, en présence d'un excès d'agents chélatants (EDTA) ou de ligands donneurs susceptibles de lier le synthon tricarbonyle (Cystéine, Histidine, SVF), soit une décomplexation du technétium 99m, soit un échange de ligand entre ces molécules, pour un rapport molécule marquée/molécule en compétition de 1/100 à 1/1000. Des réactions d'échange avec les acides aminés de notre organisme et notamment ceux présents dans le sang sont possibles. Ceux-ci peuvent s'échanger avec un ou plusieurs sites de liaison du carbonyle.

- Le caractère hydrophile ou lipophile des peptides radiomarqués a été déterminé par mesure du coefficient de partage octanol/eau. Les peptides iodés sont hydrophiles, et donc solubles dans les solvants aqueux, ATH2-[¹²⁵I] étant plus hydrophile que ATH1-[¹²⁵I] ($\log(P) = -3,87 \pm 0,12$ de pH 4 à pH 8 pour ATH2-[¹²⁵I] contre $\log(P) = -1,41 \pm 0,14$ de pH 4 à pH 8 pour ATH1-[¹²⁵I]). La fixation des atomes d'iode, notamment pour le peptide ATH2-[¹²⁵I] ne semble pas avoir modifié les propriétés physico-chimiques de la molécule biologique.

Le synthon carbonyle est hydrophile et par conséquent il est susceptible d'augmenter le caractère hydrophile de la molécule biologique. Cependant, après radiomarquage, la présence de trois structures carbonyles au sein de la molécule marquée augmente la lipophilie du ligand, ATH3-[^{99m}Tc] étant plus liposoluble que ATH2-[¹²⁵I]. La présence du gabarit Raft et surtout la présence de quatre chaînes de ligand fixées au Raft modifient de façon importante les propriétés de la molécule. En effet, on observe une augmentation majeure de la liposolubilité de ATH4 par rapport à ATH3 et surtout par rapport à ATH2. Les coefficients de partage ($K = \log P$) à pH 7,4 de ATH4-[^{99m}Tc], de ATH3-[^{99m}Tc], et de ATH2-[¹²⁵I] sont de -0,45, de -1,08, et de -3, respectivement.

- **Etudes pharmacocinétiques**

Les analyses métaboliques *in vitro* ont montré que les traceurs iodés sont progressivement désiodés dans le sang. La cinétique de désiodation est identique pour ATH1-[¹²⁵I] et ATH2-[¹²⁵I], environ 20 % de l'activité est présente sous forme d'iodure libre dans le sérum après 3 heures d'incubation des traceurs dans un échantillon de sang.

Il existe une fixation non spécifique de ATH1 *in vivo* au niveau pulmonaire qui n'est pas expliquée. La molécule est apolaire mais hydrophile, le passage transmembranaire lors du premier passage pulmonaire est peu probable. La fixation protéique est faible, car après filtration sur filtre Nanosep® 10K, le pourcentage de récupération est de 90%. Par contre, par électrophorèse en présence de sérum albumine bovine, plus de 30% de l'activité est retrouvée liée à l'albumine. L'analyse du point isoélectrique donne un p*K*_i à 8,3, la molécule est légèrement basique et soluble en solution aqueuse et dans le sérum. Par contre, le caractère basique de la molécule et la présence dans le peptide d'arginine, acide aminé généralement situé à l'extérieur des protéines, peuvent expliquer la localisation pulmonaire observée en scintigraphie. Le poumon est le premier organe atteint par le traceur après injection par voie veineuse périphérique, et trois mécanismes peuvent

expliquer la localisation pulmonaire d'une molécule : l'agrégation du complexe au niveau des capillaires pulmonaires sous forme de particules si les molécules s'agrègent entre elles ou avec des composants biologiques sanguins (principe de la scintigraphie de perfusion pulmonaire avec des macroagrégats d'albumine humaine marqués au technétium 99m) ; des interactions ioniques, essentiellement avec des molécules basiques (Coenen H.H. 2006) ou des interactions hydrophobes, et enfin l'existence de récepteur du ligand *in situ*.

La fixation pulmonaire de ATH1-[¹²⁵I] persiste au cours du temps, elle est responsable d'une clairance sanguine rapide et d'une activité circulante faible. La molécule ATH1-[¹²⁵I] est excrétée par voie urinaire et par voie hépato-biliaire et la radioactivité est lentement éliminée par voie urinaire sous forme inchangée et sous forme d'iode libre. La présence de métabolites iodés n'a pas été observée. La fixation non spécifique de ATH1-[¹²⁵I] aussi bien *in vitro* que *in vivo*, mais surtout la localisation pulmonaire du traceur nous ont conduits à éliminer cette molécule.

La molécule ATH2-[¹²³I] est hydrophile. C'est un facteur qui peut expliquer l'absence de fixation non spécifique *in vivo* au niveau pulmonaire. Elle est faiblement liée aux cellules sanguines et aux protéines plasmatiques et surtout ATH2-[¹²³I] présente une pharmacocinétique plus compatible avec son utilisation comme radiopharmaceutique, avec une élimination rénale prépondérante. La fixation pulmonaire est vingt fois moins importante que celle de ATH1-[^{125/123}I] d'où une activité circulante plus grande. Il est excrété principalement par les voies urinaires.

Les traceurs technétiés ATH3-[^{99m}Tc] et ATH4-[^{99m}Tc] sont éliminés par les voies urinaires et hépato-biliaires. De l'activité est retrouvée dans la bile et dans l'intestin, parfois à une concentration importante. Les données recueillies lors des études de biodistribution sont cependant très hétérogènes et l'activité biliaire varie d'un animal à l'autre.

Le traceur ATH4-[^{99m}Tc] présente une fixation dans le tissu adipeux, fixation qui n'est pas observée pour les autres traceurs, ainsi qu'une fixation pulmonaire un peu plus importante ; la cinétique sanguine est lente et l'activité circulante est supérieure à celle de ATH3-[^{99m}Tc]. La présence du gabarit Raft et surtout de quatre structures de reconnaissance de la cible augmente la taille de la molécule et modifie la liposolubilité du radioligand (Log_{ATH4-[99mTc]} (P) de -0,45) ce qui pourrait expliquer ces localisations secondaires. La molécule froide est peu soluble en milieu aqueux, et la fixation aux protéines plasmatiques mesurée par précipitation à l'acide trichloroacétique et par électrophorèse est importante (supérieure à 70%). L'ensemble de ces facteurs peut expliquer les résultats précédents.

Pour tous les traceurs, les résultats des cinétiques sanguines, réalisées sur trois heures, montrent une décroissance bi-exponentielle de la radioactivité avec une phase de distribution rapide suivie d'une phase d'élimination lente. La demi-vie d'élimination de ATH3-[^{99m}Tc] est évaluée approximativement à 130 minutes, celle de ATH4-[^{99m}Tc] à 500 minutes alors que la demi-vie d'élimination de ATH2-[¹²³I] est mesurée à 800 minutes. La fixation du synthon tricarbonyle technétié augmente le caractère hydrophile du peptide et surtout facilite son élimination par voie urinaire. La clairance sanguine est augmentée ce qui améliore le rapport signal/bruit de fond au niveau du tissu cible et par conséquent la sensibilité du traceur.

- **Etudes biologiques**

Les études précliniques chez le lapin ont été effectuées par A. Broisat et L. Riou au laboratoire d'Etude des Radiopharmaceutiques.

Ex vivo, les études par autoradiographie des aortes de lapins montrent que l'ensemble des traceurs (ATH1-[¹²³I], ATH2-[¹²³I], ATH3-[^{99m}Tc], et ATH4-[^{99m}Tc]) s'accumulent au niveau des plaques d'athérome exprimant VCAM-1, l'expression du récepteur étant validée par une coloration au Sudan IV positive.

- Sur des lapins « Contrôle » sains (absence de plaque d'athérome), la fixation aortique non spécifique de ATH1-[¹²³I] est plus élevée que celle de ATH2-[¹²³I].

- Sur lapins Watanabe « WHHL » :

- Le rapport entre la fixation aortique au niveau des zones Sudan IV positives et négatives (zones athéromateuses et zones saines sur une même artère) est environ cinq fois plus faible pour ATH1-[¹²³I] que pour ATH2-[¹²³I]. Ce rapport est égal à 17 ± 9 pour ATH2-[¹²³I].

- Le rapport de fixation aortique entre les régions Sudan IV positives et les régions saines « contrôles » est égal à $5,9 \pm 1,8$ pour ATH3-[^{99m}Tc] et égal à $4,8 \pm 1$ pour ATH4-[^{99m}Tc].

Le traceur ATH2-[¹²³I] présente la meilleure spécificité pour la cible, la fixation non spécifique au niveau de l'endothélium vasculaire sain étant la plus faible.

- **Images scintigraphiques**

Une faible fixation thyroïdienne d'iode radioactif a été observée trois heures après l'administration de ATH2- ^{123}I , le marquage est stable *in vivo*. Cette fixation n'apparaît pas avec ATH1- ^{123}I , probablement en raison de la forte fixation pulmonaire qui modifie le contraste et surtout en raison de l'absence au niveau pulmonaire de désiodases localisées plutôt au niveau du foie et des reins.

Les études *ex vivo* réalisées au sein de notre laboratoire, par autoradiographie sur « phospo-imager » ou « béta-imager » ont montré que les traceurs se fixent préférentiellement sur les plaques d'athérome qui expriment VCAM-1. Cependant, *in vivo*, les études scintigraphiques réalisées chez le lapin Watanabe athéromateux n'ont pas permis de mettre en évidence des zones d'hyperfixation localisées sur les plaques d'athérome, et ce en raison d'un rapport signal/bruit insuffisant. Des modifications chimiques doivent être envisagées afin d'accélérer la clairance sanguine et d'améliorer le rapport signal/bruit sans modifier la liaison ligand-récepteur. Cependant, il est aussi possible que la concentration en récepteur au niveau des plaques d'athérome soit insuffisante pour pouvoir détecter une hyperfixation, même en présence de marqueurs présentant une haute affinité pour la cible.

ID LES LIGANDS DE $\alpha_v\beta_3$

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est surexprimée par les cellules endothéliales activées, ce qui en fait une cible potentielle pour les agents antiangiogéniques et les traceurs de la néoangiogenèse tumorale. Cette intégrine est le récepteur de nombreux ligands, ligands caractérisés par la présence d'un motif peptidique arginine, glycine, acide aspartique (RGD). Les traceurs synthétisés sont des ligands radiomarqués constitués de 4 sites de liaison possédant ce motif RGD, eux même fixés sur un gabarit Raft qui aurait la propriété de faciliter l'internalisation de la molécule en facilitant son passage transmembranaire par endocytose. Nous avons choisi de marquer les ligands à l'iode 125/123 par substitution électrophile en «ortho» d'une tyrosine, l'iode étant préalablement oxydé par un réactif oxydant, ou au technétium99m par l'intermédiaire d'un petit synthon bifonctionnel, le tricarbonyle technétié, qui réagit avec une histidine qui lui fournit trois sites de liaison. Les acides aminés tyrosine ou histidine, en fonction de la méthode de marquage choisie, sont fixés sur le Raft sur le plan opposé aux sites de reconnaissance du récepteur intégrine.

- **Optimisation de la réaction de marquage**

- Le marquage à l'iode des peptides est réalisé par substitution électrophile d'un résidu tyrosine. C'est un marquage simple, rapide. La présence de chloramine-T n'a induit aucune dégradation du peptide, même à forte concentration. Le marquage est obtenu avec un bon rendement et une pureté radiochimique supérieure à 95% et donc ne nécessite pas d'étape de purification. Les essais de radiomarquage, pour des concentrations de 0,2 et 2 nmoles de peptide ANG1 en présence de 18,5 MBq d'iode 125 sur 15 minutes, n'ont pas permis d'obtenir une pureté radiochimique supérieure à 80%. Une PRC de 95% est atteinte avec 10 nmoles de peptide soit une activité spécifique de 1,85 TBq/mmmole.

La molécule marquée est stable dans de nombreux solvants y compris une solution de sérum physiologique dont les atomes de chlore sont susceptibles de s'échanger avec les atomes d'iode.

Les études de stabilité en milieu biologique réalisées *in vitro* montrent une désiodation faible et progressive des peptides au cours du temps, la libération d'iode libre étant observée après 30 minutes d'incubation.

- Le précurseur $[M(OH)_2(CO)_3]^+$ peut échanger ses molécules d'eau avec une grande variété de ligands (azote, phosphine, acide cyanhydrique) par une réaction simple réalisable dans des conditions douces, parfois par simple mélange à température ambiante (Schibli R. 1999). Le marquage du peptide ANG4 doit être réalisé dans des conditions douces, sous une température de 60°C et au maximum de 80°C en milieu très dilué afin d'éviter la dégradation du peptide par la chaleur. La durée de la réaction est assez longue, la préparation est placée 20 minutes au bain-marie puis 30 minutes à température ambiante. Les conditions de pH sont définies entre pH 6 et pH 8 afin d'améliorer la pureté radiochimique. On obtient un complexe ANG4- $[^{99m}Tc]$ avec une bonne pureté radiochimique (> 95%) et stable pendant 24 heures. Ce complexe est injectable.

- **Propriétés physico-chimiques du marqueur technétié**

Des études ont montré que le synthon tricarbonyle technétié se lie rapidement et quantitativement à l'albumine et à l'histidine à température ambiante en quelques minutes. Afin de vérifier cette hypothèse, des solutions d'albumine (BSA), de cystéine et d'histidine ont été incubées en présence de la préparation d'Isolink® radiomarquée mais aucun

radiomarquage spécifique de l'histidine et de l'albumine n'a été observé à température ambiante : les liaisons aqueuses du complexe ne sont pas déplacées, seul un faible pourcentage de molécules (ligand) technétiées a été observé. Une liaison des molécules au complexe $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ est observée à 37°C et surtout à 100°C. Des expériences de déplacement de la liaison du complexe avec le peptide ANG4- $[^{99m}\text{Tc}]$ ont alors été réalisées dans des conditions biologiques, c'est à dire à 37°C sous agitation. ANG4- $[^{99m}\text{Tc}]$ a été incubé en présence d'un agent chélatant du technétium 99m (l'EDTA) et en présence de ligands donneurs susceptibles de déplacer, par compétition, la liaison du traceur au carbonyle technétié (cystéine, L-histidine). Si le rapport molaire entre le peptide marqué et un ligand donneur est supérieur à 100 une transchélation est observée ; le synthon technétié s'échange avec le ligand en excès. Cependant, la pureté radiochimique de la molécule biologique reste supérieure à 70% après un temps d'incubation de 2 heures ; le complexe est peu altéré par la présence de cystéine, d'histidine ou de SVF en excès. Les coordinants sont peu déplacés par les groupes fonctionnels nucléophiles présents dans les peptides du sérum et par conséquent la probabilité d'un échange rapide du technétium 99m avec les protéines sanguines est faible.

Il est connu que les molécules d'eau s'échangent avec les halogènes et que cet échange dépend de la concentration en halogène de la solution. L'élution du technétium étant réalisée par une solution NaCl 0,9% et sa neutralisation réalisée par une solution de HCl dont l'objectif est de neutraliser NaHB₄ et d'ajuster le pH, la formation de complexe $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{Cl})\text{L}]$ est possible, même si la réaction vers la coordination totale est favorisée. Des analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées sur des solutions de peptides marquées incubées seul ou en présence d'histidine et de cystéine. Elles ont toutes été négatives sans identification possible des complexes et de leurs métabolites en raison de la faible concentration des peptides. La caractérisation des complexes au niveau structural nécessite de travailler à un niveau macroscopique, en utilisant soit du technétium 99 soit du rhénium en présence de grande quantité de peptide. Ces expériences macroscopiques nous permettront de définir si la coordination est totale ou incomplète, ou si le complexe est présent sous forme chlorée $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{Cl})\text{L}]^+$.

- **Pharmacocinétique**

Le marquage au technétium 99m, ou par d'autres isotopes organométalliques, de biomolécules ligands spécifiques de récepteurs est en développement. Cependant, ce marquage nécessite la présence d'un chélate possédant un encombrement stérique plus important que l'atome d'iode. Ceci conduit à des modifications physico-chimiques et biologiques plus importantes. L'aquaion tricarbonyle est un complexe très hydrophile qui va favoriser l'élimination rénale et urinaire du radiopharmaceutique. Par contre, du fait de la présence du gabarit Raft sur lequel sont fixés quatre pentacycles au motif RGD, le poids de la molécule est élevé, ce qui concourt à son élimination par voie hépato-biliaire.

In vivo et *in vitro*, la fixation de ANG4-[^{99m}Tc] aux protéines plasmatiques est importante ; cette fixation a été observée après précipitation du sérum au TCA, filtration du sérum sur filtre Nanosep[®] 10K et électrophorèse. Le pourcentage de molécules libres susceptibles d'atteindre le site récepteur est donc faible et peut diminuer l'intensité du signal. Cette fixation aux protéines plasmatiques n'a pas été observée avec les molécules iodées, mais elle a été observée avec le peptide ATH4-[^{99m}Tc], peptide technétié qui possède le gabarit Raft. C'est donc l'association du gabarit et du synthon tricarbonyle technétié qui favorise la liaison aux protéines plasmatiques.

In vivo chez la souris, on observe une désiodation rapide de tous les peptides radioiodés. Trente minutes après l'administration de ANG1-[¹²⁵I] ou ANG2-[¹²⁵I], une fixation thyroïdienne est observée sur les images scintigraphiques et cette fixation est importante 3 heures après l'injection. Les études analytiques du sang, des urines, et du contenu stomacal ont montré la présence d'iodure libre en quantité importante (plus de 30% de l'activité totale à 3 heures), alors que la captation thyroïdienne était déjà importante. La qualité des images scintigraphiques est faible d'autant que nous n'avons pas la certitude de suivre le peptide marqué.

Cependant, cette désiodation a été observée au cours d'expériences complémentaires chez le lapin mais à un degré moindre. Elle pourrait impliquer des désiodases spécifiques d'espèce.

ANG4-[^{99m}Tc], radiomarqué par l'intermédiaire du synthon tricarbonyle, présente une élimination rénale et hépato-biliaire. Cette dernière voie d'élimination, qui était peu importante pour les traceurs iodés, avec des zones de fixation au niveau du foie et du tractus digestif, peut gêner l'interprétation des images scintigraphiques.

- **Etude biologique et efficacité clinique**

Des études sur cultures cellulaires effectuées par l'équipe E0340 ont montré que les cellules PC-3, qui expriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, présentent une meilleure affinité pour le peptide que les cellules n'exprimant pas l'intégrine. D'autres part, ces mêmes expériences ont montré que la captation cellulaire du peptide ANG1-[¹²⁵I] était meilleure que celle de ANG3-[¹²⁵I] et de ANG2-[¹²⁵I].

Les études précliniques effectuées par Lucie Sancey (Sancey L 2006) ont démontré l'affinité du ligand pour les tumeurs surexprimant $\alpha_v\beta_3$, par rapport aux tumeurs n'exprimant pas l'intégrine. D'autre part, des expériences réalisées après inoculation chez la souris de tumeurs plus ou moins angiogéniques ont montré que le rapport tumeur sur bruit de fond augmente avec le potentiel angiogénique de la tumeur.

Ces résultats indiquent que les peptides possédant un motif « RGD » peuvent être radiomarqués et donc utilisés comme traceurs de la néoangiogenèse pour l'imagerie nucléaire. L'étude des différentes tumeurs et de différents peptides « RGD-Raft » possédant une meilleure affinité pour la cible permettra de confirmer ces résultats.

Les études vont se poursuivre avec ces mêmes peptides marqués à l'indium 111 par l'intermédiaire d'un chélate DOTA et ce afin de réaliser des images à des temps plus longs et ainsi améliorer le rapport signal/ bruit.

CONCLUSION GENERALE

D) LES MARQUEURS DE LA PLAQUE D'ATHEROME

Les techniques actuelles d'imagerie non invasive ne permettent pas de déterminer la morphologie d'une plaque, de différencier les processus évolutifs et donc d'identifier les plaques à risque de rupture, des plaques d'athérome fibreuses obstruantes, ainsi que d'étudier l'efficacité des traitements.

Les principaux mécanismes impliqués dans le développement de l'athérome sont l'infiltration lipidique, l'invasion et la prolifération cellulaire, puis la formation d'un thrombus. De nombreux radiotraceurs ont été développés pour réaliser de l'imagerie des lésions ou pour détecter le thrombus intra-artériel associé à ces lésions : traceurs des LDL, traceurs des composants de la plaque comme les macrophages ou les plaquettes, mais aucun n'est utilisé en clinique.

Les traceurs idéaux pour l'imagerie des plaques d'athérome vulnérables doivent :

- Etre sensibles, c'est à dire capables de détecter la présence d'une plaque à risque le plus précocement possible.
- Etre spécifiques de la plaque à risque, c'est à dire être capables de détecter le cœur lipidique ou le thrombus, ou être capables de déterminer la densité en macrophages ou en cellules musculaires lisses.
- Etre capables de détecter les lésions dans les principales artères.
- Avoir une clairance sanguine rapide afin de d'augmenter le rapport lésion/bruit de fond et obtenir une meilleure qualité d'images
- Présenter un marquage stable. La présence de l'isotope sous forme libre ou de métabolites marqués doit être aussi faible que possible afin d'augmenter la spécificité et la sensibilité du diagnostic.
- Etre présentés sous forme de kit. Une formulation pour une préparation simple et rapide est un outil indispensable à une utilisation en routine. Son utilisation doit pouvoir être réalisée dans un but préventif, sur une large population.

Le but de ce travail était de mettre au point le radiomarquage d'un ligand présumé de VCAM-1, molécule d'adhésion surexprimée précocement au niveau des plaques d'athérome vulnérables.

Nous avons décrit une méthode de marquage simple et reproductible de plusieurs dérivés du ligand B2702(84-75), molécule dérivée de HLA B2702, cible de VCAM-1, à l'iode ou au technétium 99m. Le marquage à l'iode est réalisé par substitution électrophile avec utilisation d'un réactif oxydant : chloramine-T ou N Bromosuccinimide. Le marquage au technétium est réalisable par complexation du technétium 99m sur le ligand par l'intermédiaire d'un petit synthon tricarbonyle commercialisé sous forme de kit par la société Mallinckrodt (Isolink). Les dérivés ont été obtenus avec une bonne pureté radiochimique et le marquage est reproductible ; la stabilité du marquage *in vitro*, à l'iode ou au technétium, pendant plusieurs heures est compatible avec une utilisation en routine. La méthode de marquage à l'iode 123, pour une utilisation chez l'homme, est cependant plus onéreuse, compte tenu du coût de l'isotope, qu'une méthode de marquage au technétium 99m.

Ex vivo, une fixation a été observée pour tous les traceurs au niveau des plaques d'athérome qui expriment VCAM-1, le traceur B2702(84-75)-[¹²³I] (ATH2-[¹²³I]) étant le plus sensible, mais cette fixation est trop faible pour être observée *in vivo* par détection externe. *In vivo*, les études pharmacocinétiques ont montré que B2702(84-75)-H-[^{99m}Tc] (ATH3-[^{99m}Tc]) présente la clairance sanguine la plus rapide, ce qui favorise la détection d'une fixation spécifique par augmentation du rapport signal/bruit. [B2702(84-75)]₄-Raft-H (ATH4-[^{99m}Tc]) plus liposoluble, présente une forte fixation aux protéines plasmatiques, et une élimination hépato-biliaire qui ne sont pas favorables à l'imagerie. La stabilité *in vivo* des traceurs iodés est insuffisante, les molécules étant rapidement désiodées : 1 heure après l'administration de la molécule marquée, des iodures libres sont retrouvés dans le sang et la thyroïde. Les études seront poursuivies avec les traceurs technétiés mais des modifications chimiques devront être apportées à la structure peptidique afin d'augmenter le rapport signal/sang par augmentation de la clairance sanguine et afin d'améliorer la spécificité des marqueurs. Un marquage à l'indium 111 pourrait permettre de réaliser des images à des temps plus long après élimination de l'activité sanguine, urinaire et hépato-biliaire.

ID LES MARQUEURS DE LA NEOANGIOGENESE

Chaque année dans le monde, le cancer touche 10 millions de personnes et 6 millions de décès sont constatés. La chimiothérapie conventionnelle cytotoxique n'a pas de spécificité pour certains organes ou certains tissus, et ses effets secondaires sont importants. Même si des progrès importants ont été accomplis en terme de durée de survie, les chimiothérapies classiques ont peu d'effet curatif et sont peu efficaces chez les patients métastatiques. Les progrès dans les traitements anticancéreux viennent du développement de nouvelles thérapeutiques ciblées, c'est à dire spécifiques d'organes et de tissus. Ces cibles sont essentiellement des protéines. Le mécanisme d'action de ces nouveaux médicaments consiste à inhiber une fonction biologique ou une voie métabolique ; il est souvent plus spécifique des cellules tumorales car les progrès de la recherche permettent d'identifier des voies métaboliques spécifiques du processus étudié. Deux mécanismes de transmission du message sont impliqués dans ce processus tumoral : la voie des récepteurs nucléaires avec cible principale des médicaments hormonaux et les voies de transduction du signal caractérisées par une cascade protéique intervenant entre la membrane plasmique où se trouvent les récepteurs de ligands spécifiques et le noyau. La famille des récepteurs Tyrosine Kinase (rTK), récepteurs des hormones de croissance, est la plus étudiée. Ces récepteurs sont impliqués dans de nombreux mécanismes de prolifération et de différenciation cellulaire, dans les mécanismes apoptotiques, ou dans l'apparition de la néoangiogenèse. Ces récepteurs sont impliqués dans la genèse de nombreuses tumeurs ainsi que dans les processus de prolifération métastatique. De nombreux inhibiteurs des Tyrosine Kinases sont aujourd'hui étudiés en clinique, il s'agit soit d'anticorps monoclonaux, soit de molécules chimériques ayant une pénétration intracellulaire et qui vont inhiber l'activation du récepteur. Les autres molécules cibles en cours de développement sont celles impliquées dans les thérapies antiangiogéniques. Le traitement des cancers par inhibition de l'angiogenèse a pour cible la cellule endothéliale ou les facteurs de croissance angiogéniques comme le VEGF. Cette nouvelle thérapeutique par une action indirecte présente plusieurs avantages :

- La cellule endothéliale activée lors de la néoangiogenèse est facilement et rapidement atteinte par les molécules antiangiogéniques (anticancéreuses) alors que la molécule cytotoxique qui cible la cellule tumorale doit diffuser dans la tumeur qui n'est pas toujours irriguée, et atteindre la cellule.

– C'est une thérapie ciblée spécifique. Seules les cellules endothéliales activées, en prolifération, expriment la cible.

– Les cellules endothéliales sont stables, elles ne sont pas sujettes aux mutations et donc aux mécanismes de résistance aux traitements anti-cancéreux (résistance MDR).

Différentes molécules ont été testées :

– Les inhibiteurs des facteurs angiogéniques : les anticorps anti-facteurs angiogéniques, les récepteurs solubles pour ces facteurs ou des molécules se liant spécifiquement à ces facteurs, inhibent la fixation des molécules proangiogéniques (VEGF, FGF) sur la cellule endothéliale. Les essais sur des inhibiteurs de VEGF sont les plus nombreux.

– Les inhibiteurs des récepteurs angiogéniques. L'inhibition de VEGFR-2 a été testée suivant deux mécanismes, les anticorps monoclonaux et l'inhibition de la transduction du signal.

– Les peptides ligands spécifiques de $\alpha_v\beta_3$. Ils inhibent la migration, la croissance et la différenciation des cellules endothéliales provoquant ainsi l'inhibition de la croissance des nouveaux vaisseaux, et entraînent une régression tumorale. L'expression et l'activation de $\alpha_v\beta_3$ sont corrélées avec le potentiel invasif et métastatique de certaines tumeurs (Folkman J. 2002). L'utilisation de peptides cycliques, ou d'anticorps dirigés contre l'intégrine a montré au niveau vasculaire une inhibition de la néoangiogenèse et une augmentation de la perméabilité membranaire, et au niveau de la tumeur une diminution du nombre de métastases. Une fixation sélective tumorale a été démontrée avec des peptides cycliques radiomarqués.

De nombreux radioligands spécifiques de $\alpha_v\beta_3$ ont été synthétisés. Les indications de ces nouvelles molécules sont diagnostiques ou thérapeutiques :

– L'identification de néovaisseaux permet d'une part de prévoir si une tumeur a un fort potentiel métastatique et donc d'évaluer le pronostic, et d'autre part de prédire et d'évaluer l'utilité et l'efficacité des nouveaux traitements antiangiogéniques comme l'Avastin[®] et le Sutent[®].

– L'utilisation de peptides ligands spécifiques de $\alpha_v\beta_3$, radiomarqués par un émetteur β permettra d'associer l'effet antagoniste de la molécule froide à l'effet des rayonnements

ionisants sur la cellule endothéliale activée et, par effet de proximité, sur la tumeur ou ses métastases.

Ce travail a permis de montrer que le radiomarquage à l'iode 125 ou 123 du peptide RGD-Raft175 (ANG1), peptide synthétisé au LEDSS V, est simple à mettre en œuvre. La préparation est stable permettant la distribution d'un médicament prêt à l'emploi mais de coût élevé. Cependant, le peptide marqué présente une activité spécifique faible.

Les études *in vivo* montrent que le peptide RGD-Raft-[¹²⁵I] présente de nombreux inconvénients dont une stabilité *in vivo* inférieure à 1 heure, des iodures libres sont rapidement retrouvés dans le sang, la thyroïde et l'estomac, et une fixation sur les tumeurs exprimant $\alpha_v\beta_3$ trop faible pour détecter ces dernières en scintigraphie.

Le radiomarquage des peptides au technétium 99m est plus complexe car il présente trois étapes de marquage dont une étape de chauffage de la préparation peptidique, et la durée de préparation est plus longue. La préparation technétinée est stable sur plusieurs heures permettant la constitution de solution multidose et donc à moindre coût.

Les études *in vitro* complétées par les études *in vivo* ont démontré que le peptide RGD-Raft-H-[^{99m}Tc] est lipophile et fortement fixé aux protéines sanguines ce qui explique *in vivo* la clairance sanguine faible ainsi que l'élimination hépatobiliaire du traceur. *In vivo* RGD-Raft-H-[^{99m}Tc] présente plusieurs avantages par rapport à RGD-Raft-[¹²⁵I] : une stabilité d'environ 3 heures mais surtout une fixation importante sur les tumeurs et les vaisseaux exprimant $\alpha_v\beta_3$; par contre la molécule est éliminée par voie urinaire et hépatobiliaire, cette dernière étant préjudiciable à la détection des tumeurs localisées au niveau abdominale. Des modifications structurales devront être apportées afin de diminuer la fixation non spécifique et accélérer la vitesse d'élimination afin d'augmenter le rapport signal sur bruit et mieux visualiser par scintigraphie les tumeurs et les neovaisseaux.

Les perspectives sont une modification du traceur afin d'améliorer la captation tumorale et le contraste et faciliter l'élimination du traceur. Différents marquages devront être étudiés dont le marquage au fluor-18 et le marquage à l'indium 111 afin de proposer des images à des temps longs mais aussi d'envisager le développement de la radiothérapie interne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abrams M.J.**, Juweid M., tenKate C.I., Schwartz D.A., Hauser M.M., Gaul F.E., Fuccello A.J., Rubin R.H., Strauss H.W., Fischman A.J. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J. Nucl. Med.* 1990 ; 31 (12) : 2022-2027.
2. **Alberto R.**, Schibli R., Abram U., Egli A., Knapp F.F., and Schubiger P.A. Potential of organometallic $[M(CO)_3]^+$ (M = Re, Tc) fragment for the labelling of proteins and small molecules. *Radiochim. Acta.* 1997 ; 79 : 99-103
3. **Alberto R.**, Schibli R., Egli A., Schubiger P.A., Abram U., Kaden T.A. A novel organometallic aqua-complex of technetium for the labelling of biomolecules : Synthesis of $[^{99m}Tc(OH)_2(CO)_3]^+$ from $[^{99m}TcO_4^-]$ in aqueous solution and its reaction with bifunctional ligands. *J. Am. Chem. Soc.* 1998 ; 120 : 7987-7988
4. **Alberto R.**, Schibli R., Waibel R., Abram U., Schubiger A.P. Basic aqueous chemistry of $[M(OH)_2(CO)_3]^+$ (M = Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application. *Coord. Chem Rev.* 1999 ; 190-192 : 901-919
5. **Alberto R.** $[Tc(CO)_3]^{(+)}$ chemistry : a promising new concept for SPET? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2003 ; 30 (9) : 1299-1302.
6. **Anderson C.J.** Métabolism of radiometal-labeled proteins and peptides : What are the real radiopharmaceuticals in vivo? *Cancer Biother. Radiopharm.* 2001 ; 16(6) : 451-455
7. **Apparu M.**, Madelmont J.C. Molécules marquées à l'iode radioactif. Ln : Comet M., Vidal M. *Radiopharmaceutiques - Chimie des radiotraceurs et applications biologiques.* Presse Universitaire de Grenoble ; 1998 : 249-287
8. **Bailey G.S.** Labeling of peptides and proteins by radioiodination. *Methods Mol. Biol.* 1994 ; 32 : 441-448.

9. **Berliner J.A.**, Navab M., Fogelman A.M., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Watson A.D., Lusis A.J. Atherosclerosis : basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995 ; 91 : 2488-2496

10. **Blankenberg F.G.**, Katsikis P.D., Tait J.F., Davis R.E., Naumovski L., Ohtsuki K., Kopiwoda S., Abrams M.J., Darkes M., Robbins R.C., Maecker H.T., Strauss H.W. In vivo detection and imaging of phosphatidyl serine expression during programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1998 : 6349-6354

11. **Blok D.**, Feitsma H.I.J., Kooy Y.M.C., Welling M.M. New chelation strategy allows for quick and clean ^{99m}Tc-labelling of synthetic peptides. *Nucl. Med. Biol*. 2004; 31 : 815-820.

12. **Bolton A.E.** Comparative methods for the radiolabeling of peptides. *Methods Enzymol*. 1986 ; 124 : 18-29

13. **Boturyn D.**, Coll J.L, Garanger E., Favrot M.C., Dumy P. Template Assembled Cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J.Am.Chem. Soc*. 2004 ; 126 : 5730-5739

14. **Bourdoiseau M.** Iodine radiochemistry and radiopharmaceutical product labelling; *Nucl. Med. Biol*. 1986; 13(2) : 83-88

15. **Bouziotis P.**, Fani M., Archimandritis S.C., Loundos G., Paravatou M., Bicknell R., Harris A.L., Xanthopoulos S., Stratis N., Varvarigou A.D. Samarium-153 and technetium-99m-labeled monoclonal antibodies in angiogenesis for tumor visualization and inhibition. *Anticancer Res*. 2003 ; 23(3a) : 2167-2171

16. **Broisat A.** Médecine nucléaire et maladie coronarienne : Evaluation de traceurs de la perfusion myocardique et de la plaque d'athérome vulnérable. Doctorat Génie Biologique et Médical. 12 Avril 2005 ; Université Joseph Fourier Grenoble I

17. **Brooks P.C.**, Clarck R.A.F., Cheresh D.A. Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science*. 1994 ; 264 : 569-571

18. **Bulloak K.E.**, Dyszlewski M., Prior J.L., Pica C.M., Sharma V., Piwnica-Worms D. Characterization of novel histidine-tagged Tat-peptide complexes dual-labeled with (99m)Tc-tricarbonyl and fluorescein for scintigraphy and fluorescence microscopy. *Bioconjug. Chem.* 2002 ; 13(6) : 1226-1237.
19. **Burke P.A.**, DeNardo S.J., Miers L.A., Lamborn K.R., Matzku S., and DeNardo G.L. Cilengitide targeting of $\alpha v \beta 3$ integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res.* 2002 ; 62 : 4263-4272
20. **Carrio I.**, Pieri P.L., Narula J., Prat L., Riva P., Pedrini L., Pretolani E., Caruso G., Sarti G., Estorch M., Berna L., Rimbau V., Matias-Guiu X., Pak C., Ditlow C., Chen F., Khaw B.A. Noninvasive localization of human atherosclerotic lesions with indium 111-labeled monoclonal Z2D3 antibody specific for proliferating smooth muscle cells. *J Nucl Cardiol.* 1998 ; 5(6) : 551-557
21. **Chen X.**, Liu S., Hou Y., Tohme M., Park R., Bading J.R., Conti P.S. MicroPET imaging of breast cancer αv integrin expression with ^{64}Cu -labeled dimeric RGD peptides. *Mol. Imaging Biol.* 2004 ; 6 : 350-359
22. **Chen X.**, Park R., Hou Y., Khankaldyian V., Gonzales-Gomez I., Tohme M., Bading J.R., Laug W.E., Conti P.S. MicroPET imaging of brain tumor angiogenesis with ^{18}F -labelled PEGylated peptide. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2004 ; 31 : 1081-1089
23. **Chen X.**, Park R., Shahinian A.H., Bading J.R., Conti P.S. Pharmacokinetics and tumor retention of ^{125}I -labeled RGD peptide are improved by PEGylation. *Nucl. Med. Biol.* 2004 ; 31(1) : 11-19.
24. **Chen X.**, Tohme M., Park R., Hou Y., Bading J.R., Conti P.S. Micro-PET imaging of $\alpha v \beta 3$ -integrin expression with ^{18}F -labeled dimeric RGD peptide. *Mol. Imaging.* 2004 ; 3(2) : 96-104.

25. **Chen X.**, Sievers E., Hou Y. Park R., Tohme M., Bart R., Bremner R., Bading J.R., Conti P.S. Integrin alpha v beta 3–targeted imaging of lung cancer. *Neoplasia*. 2005 ; 7(3) : 271-279
26. **Cheresh D.A.** Integrins : structure, function, and biological properties. *Adv. mol. cell biol.*, 1993 ; 6 : 225-252
27. **Chia M.C.** The role of adhesion molecule in atherosclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1998 ; 35 (6) : 573-602
28. **Coenen H.H.**, Mertens J., Mazière B. Radioionidation reactions for pharmaceuticals, compendium for effective synthesis startegies. COST. Netherlands : Springer 2006.
29. **Cybulsky M.I.**, Gimbrone M.A. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*.1991 ; 25(1) : 788-789
30. **Cybulsky M.I.**, Iiyama K., Li H., Zhu S., Chen M., Iiyama M., Davis V., Gutierrez-Ramos J.C., Connelly P.W., Milstone D.S. A major Role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early artherosclerosis. *J. clin. Invest.* 2001 ; 107(10) : 1225-1262
31. **Davison P.F.** A versatile procedure for the radioiodination of proteins and labelling reagents. *Biochim. Biophys. Acta*. 1987 ; 926 (2) : 195-202
32. **Dechantsreiter MA**, Planker E., Mathä B., Lohof E., Holzemann G., Jonczyk A., Goodman S.L., Kessler H. N-Methylated Cyclic RGD peptides as highly Active and selective $\alpha v\beta 3$ Integrin Antagonists. *J. Med. Chem.* 1999 ; 42 : 3033-3040
33. **Dekker B.**, Keen H., Shaw D., Disley L., Hastings D., Hadfield J., Reader A. Allan D., Julyan P., Watson A., Zweit J. Functional comparaison of annexin V analogues labeled indirectly and directly with iodine-124. *Nucl. Med. Biol.* 2005 ; 32 : 403-413
34. **De Jonge F.**, Pauwels E. Technetium, the missing element. *Eur J. Nuc. Med.* 1996 ; 23 : 336-344

35. **DeNardo S.J.**, Burke P.A., Leigh B.R., O'Donnell R.T, Miers L.A., Kroger L.A., Goodman S.L., Matzku S., Jonczyk A., Lamborn K.R., and DeNardo G.L. Neovascular targeting with cyclic RGD peptide (cRGDf-ACHA) to enhance delivery of radioimmunotherapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2000 ; 15 : 71-79
36. **Dewannjee M.** The chemistry of ^{99m}Tc labelled radiopharmaceuticals. *Semin. Nucl. Med.* 1990 ; 1 : 5-27
37. **Dobrucki L.W.**, Sinusas A.J. Cardiovascular molecular imaging. *Semin. Nucl. Med.* 2005 ; 35 : 73-81
38. **Du Moulinet d'Hardemare A** , Pasqualini R., Ridhe F., Vidal M. Chimie du technétium ^{99m}Tc . Ln: Comet M. and Vidal M. Radiopharmaceutiques -Chimie des radiotraceurs et applications biologiques. Presse Universitaire de Grenoble. 1998 : 153-180
39. **Egli A.**, Alberto R., Tannahill L., Schibli R., Abram U., Schaffland A., Waibel R., Tourwe D., Jeannin L., Iterbeke K., Schubiger P.A. Organometallic ^{99m}Tc -aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity. *J Nucl Med.* 1999 ; 40(11) : 1913-1917.
40. **Elices M.J.**, Osborn L., Takada Y., Crouse C., Luhowskyj S., Hemler M.E., Lobb R.R. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4: fibronectin binding site. *Cell.* 1990 ; 60(4) : 577-584
41. **Elmaleh D.R.**, Narula J., Babich J.W., Petrov A, Fischman A.J., Khaw B.A., Rapaport E., Zamecnik P.C. Rapid noninvasive detection of experimental atherosclerotic lesions with novel ^{99m}Tc -labeled diadenosine tetraphosphates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998 ; 95 : 691-695
42. **Eskens F.A.**, Dumez H., Hoekstra R., Perschl A., Brindley C., Bottcher S.W., Drevs J., Verweij J., Van Oosterom A.T. Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ in patients with advanced solid tumours. *Eur. J. Cancer.* 2003 ; 39 : 917-926.

43. **Ferrara N.** Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol.* 2002 ; 29(6) : 10-14
44. **Ferro-Flores G.,** Arteaga de Murphy C., Rodriguez-Cortes J., Pedraza-Lopez M., Ramirez-Iglesias M.T. Preparation and evaluation of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-[Lys 3]-bombesin for imaging gastrin-releasing peptide receptor-positive tumours. *Nucl Med Commun.* 2006 ; 27(4) : 371-376.
45. **Folkman J.** Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 1971 ; 285 : 1182-1186
46. **Folkman J.,** Merler E., Abernathy C., Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 1971 ; 133 : 275 - 288
47. **Folkman J.** Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002 ; 29(6) : 15-18.
48. **Garanger E.** Conception, Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Systèmes de Guidage et de Vectorisation pour la Cancérologie. Doctorat Chimie-Biologie. 25 Juin 2005 ; Université Joseph Fourier Grenoble I.
49. **Gasparini G.,** Brooks P.C., Biganzoli E., Vermeulen P.B., Bonoldi E., Dirix LY, Ranieri G, Miceli R, Cheresch DA. Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 1998 ; 4(11) : 2625-2634.
50. **Giannis A.,** Rübsam F. Integrin antagonists and other low molecular weight compounds as inhibitors of angiogenesis : new drug in cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.Engl.* 1997 ; 36(6) : 558-590
51. **Glaser M.,**Brown D.J. Law M.P. Iozzo P., Waters S.L., Poole K., Knickmeier M., Camici P.G., Pike V.W. Preparation of no-carrier added [¹²⁴I]A14 iodinsulin as a radiotracer for positron emission tomography. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 2001 ; 44 : 465-480

52. **Glass C.K**, Witztum J.L. Atherosclerosis : the road ahead. *Cell*. 2001 ; 104 : 503-516
53. **Guerreau D.**, Saccavini J.C. Macromolécules d'intérêt biologique marquées à l'iode. Ln : Comet M., Vidal M. Radiopharmaceutiques - Chimie des radiotraceurs et applications biologiques. Presse Universitaire de Grenoble. 1998 : 350-364
54. **Guo W.**, Giancotti F.G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2004 ; 5(10) : 816-826
55. **Haubner R.**, Gratiass R., Diefenbach B., Goodman S., Jonczyk A., Kessler H. Structural and Functional Aspects of RGD-Containing Cyclic Pentapeptides as Highly Potent and Selective Integrin $\alpha_V\beta_3$ Antagonists. *J. Am. Chem. Soc.* 1996 ; 118 : 7461-7472.
56. **Haubner R.**, Finsinger G., Kessler H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha_V\beta_3$ integrin for a new cancer therapy. *Angew. Chem. Int.* 1997 ; 36 : 1374-1389
57. **Haubner R.**, Wester H.J., Reuning U., Senekowitsch-Schmidtke R., Diefenbach B., Kessler H., Stocklin G., Schwaiger M. Radiolabeled $\alpha_V\beta_3$ integrin antagonists : a new class of tracers for tumor targeting. *J. Nucl. Med.* 1999 ; 40 : 1061-1071
58. **Haubner R.**, Wester H.J., Burkhart F., Senekowitsch-Schmidtke R., Weber W., Godmann S.L., Kessler H., Schwaiger M. Glycosylated RGD-containing peptides: tracers for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics. *J. Nucl. Med.* 2001 ; 45(2) : 326-336
59. **Haubner R.H.**, Wester H.J., Weber W.A., Schwaiger M. Radiotracer-based strategies to image angiogenesis. *Q. J. Nucl. Med.* 2003 ; 47(3) : 189-199
60. **Haubner R.**, Wester H.J. Radiolabeled tracers for imaging of tumor angiogenesis and evaluation of anti-angiogenic therapies. *Curr. Pharm. Des.* 2004 ; 10(13) : 1419-1455

61. **Haubner R.**, Weber W.A., Beer A.J., Vabuliene E., Reim D., Sarbia M., Becker K.F., Goebel M., Hein R., Wester H.J., Kessler H., Schwaiger M. Non-invasive Visualization of the activated $\alpha_v\beta_3$ integrin in cancer patients by positron emission tomography and [18F] galacto-RGD. *Plos Medicine*. 2005 ; 2(3) ; e70 : 244-250
62. **Heimbold I.**, Drews A., Kretschmar M., Varnas K., Hall H., Halldin C., Syhre R., Kraus W., Pietzsch H.J., Seifert S., Brust P., Johannsen B. Synthesis, biological and autoradiographic evaluation of a novel Tc-99m radioligand derived from WAY 100635 with high affinity for the 5-HT(1A) receptor and the alpha1-adrenergic receptor. *Nucl. Med. Biol.* 2002 ; 29(4) : 375-387.
63. **Huo Y.**, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol. Scand.* 2001 ; 173 : 35-43
64. **Iiyama K.**, Hajra L., Iiyama M., Li H., DiChiara M., Medoff B. D., Cybulsky M.I. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and Intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion to lesion formation. *Circ. Res.* 1999 ; 85 : 199-207
65. **Iyer S.**, Woo J., Cornejo M.C., Gao L., McCoubrey W., Maines M., Buelow R. Characterization and biological significance of immunosuppressive peptide D2702.75-84(E-V) binding protein. Isolation of heme oxygenase-1. *J. Biol. Chem.* 1998 ; 273(5) : 2692-2697
66. **Jain R.K.** Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol.* 2002 ; 29(6): 3-9
67. **Jain R.K.** Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 2003 ; 9(6) : 685-693
68. **Janssen M.L.**, Oyen W.J., Dijkgraaf I., Massuger L.F., Frielink C., Edwards D.S., Rajopadhye M., Boonstra H., Corstens F.H., Boerman O.C. Tumor targeting with radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin binding peptides in a nude mouse model. *Cancer Res.* 2002 ; 62(21) : 6146-6151

69. **Janssen M.**, Oyen W.J., Massuger L.F., Frielink C., Dijkgraaf I., Edwards D.S., Radjopadhye M., Corstens F.H., Boerman O.C. Comparaison of a monomeric and dimeric radiolabeled-peptide for tumor targeting. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2002 ; 17 : 641-646
70. **Jones E.Y.**, Harlos K., Bottomley M.J., Robinson R.C., Driscoll P.C., Edwards R.M., Clements J.M., Dudgeon T.J., Stuart D.I. Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 and 1,8 resolution. *Nature.* 1995 ; 373 (6514) : 539-544
71. **Jurisson S.**, Lydon J.D. Potential technetium small molecule radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.* 1999 ; 99 : 2205-2218
72. **Kantlehner M.**, Finsinger D., Meyer J. Selective RGD mediated adhesion of osteoblaste at surface of implants. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999 ; 38(4) : 560-562
73. **Kang Z.**, Scott T.M., Wesolowski C., Feng L., Wang J., Wang L., Liu H. *Ex vivo* evaluation of a novel polyiodinated compound for early detection of atherosclerotic. *Radiat. Res.* 2003 ; 160 : 460-466
74. **Karonen S.L.** Developments in techniques for radioiodination of peptides hormones and other proteins. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 1990; 50(201) : 135-138
75. **Kessler H.**, Diefenbach B., Finsinger D., Geyer A., Gurrath M., Goodman S., Hölzemann, G., Haubner R., Jonczyk A., Muller G. Graf von Roedern E. Wermuth J. Design of superactive and selective integrin receptor antagonists containing the RGD sequence. *Lett. Pept. Sci.* 1995 ; 2 : 155-160.
76. **Kietselaer B.L.**, Reutelingsperger C.P., Heidendal G.A., Daemen M.J., Mess W.H., Hofstra L., Narula J. Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2004 ; 350(14) : 1472-1473.

77. **Kok R.J.**, Schraa A.J., Bos E.J., Moorlag H.E., Asgeirsdottir S.A., Everts M., Meijer D.K., Molema G. Preparation and functional evaluation of RGD modified proteins as $\alpha_v\beta_3$ integrin directed therapeutics. *Bioconjugate chem.* 2002 ; 13 : 128-135
78. **Kolodgie F.D.**, Petrov A., Virmani R., Narula N., Verjans J.W., Weber D.K., Hartung D., Steinmetz N., Vanderheyden J.L., Vannan M.A., Gold H.K., Reutelingsperger C.P., Hofstra L, Narula J. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V. A technique with potential for invasive imaging of vulnerable plaque. *Circulation.* 2003 ; 108 : 3134-3139
79. **La Bella R.**, Garcia-Garayoa E., Bahler M., Blauenstein P., Schibli R., Conrath P., Tourwe D., Schubiger P.A. A ^{99m}Tc (I)-postlabeled high affinity bombesin analogue as a potential tumor imaging agent. *Bioconjug Chem.* 2002 ; 13(3) : 599-604.
80. **Lederman R.J.**, Raylman R.R., Fisher S.J., Kison P.V., San H., Nabel E.G., Wahl R.L. Detection of atherosclerosis using a novel positron-sensitive probe and 18-fluorodeoxyglucose (FDG). *Nucl. Med. Commun.* 2001 ; 22(7) : 747-753.
81. **Le Gal J.** Nouveaux radiopharmaceutiques du ^{99m}Tc : de la conception à l'évaluation biologique. Doctorat chimie et radiochimie. 8 Nov 2004, Université Paul Sabatier Toulouse III.
82. **Ley K**, Huo Y. VCAM is critical in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 2001 ; 107(10) : 1209-1210
83. **Ling X.**, Tamaki T., Xiao Y., Kamangar S., Clayberger C., Lewis D.B., Krensky A.M.. An immunosuppressive and anti-inflammatory HLA class I-derived peptide binds vascular cell adhesion molecule-1. *Transplantation.* 2000 ; 70(4) : 662-667
84. **Liu S.**, Edwards S.D. ^{99m}Tc -labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.* 1999 ; 99 : 2235-2268

85. **Liu S.**, Edwards DS., Ziegler MC., Harris A.R., Hemingway S.J., Barrett J.A. 99mTc labeling of a hydrazinonicotinamide-conjugated vibronectin receptor antagonist useful for imaging tumor. *Bioconjug. Chem.* 2001 ; 12 : 624-629
86. **Madjid M.**, Zarrabi A., Litovsky S., Willerson J.T., Casscells W. Finding vulnerable atherosclerotic plaques. Is it worth the effort? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004 ; 24 : 1775-1782
87. **Malek A.**, Alper S., Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *J Am. Med. Ass.* 1999 ; 282(21) : 2035 – 2042
88. **McConahey P.J.**, Dixon F.J. Radioiodination of proteins by the use of the chloramine-T method. *Methods Enzymol.* 1980 ; 70(A) : 210-213
89. **McQuade P.**, Knight L.C. Radiopharmaceuticals for targeting the angiogenesis marker alpha(v)beta(3). *Q. J. Nucl. Med.* 2003 ; 47(3) : 209-220
90. **Marchalonis J.J.** An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.* 1969 ; 113 : 299-305
91. **Mattot V.**, Andenbunder B. De nouveaux outils pour bloquer l'angiogenèse tumorale. *Bull. Cancer.* 1997 ; 84(4), 447-450
92. **Milano M.**, Guérin O. Les traitements ciblés actuels dans le cancer colorectal avancé. *J. Pharm. Clin.* 2006 ; 25(1) : 5-8
93. **Mitra A.**, Mulholland J., Nan A., McNeill E., Ghandehari H., Line B.R. Targeting tumor angiogenic vasculature using polymer-RGD conjugates. *J. control. release.* 2005 ; 102(1) : 191-201
94. **Montgomery A.M.**, Reisfeld R.A., Cheresch D.A. Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 ; 91(19) : 8856-8860.

95. **Naghavi M.**, Libby P., Falk E., Casscells S.W., Litovsky S., Rumberger J., Badimon J.J., Stefanadis C., Moreno P., Pasterkamp G., Fayad Z., Stone P.H., Waxman S., Raggi P., Madjid M., Zarrabi A., Burke A., Yuan C., Fitzgerald P.J., Siscovick D.S., de Korte C.L., Aikawa M., Airaksinen K.E., Assmann G., Becker C.R., Chesebro J.H., Farb A., Galis Z.S., Jackson C., Jang I.K., Koenig W., Lodder R.A., March K., Demirovic J., Navab M., Priori S.G., Rekhter M.D., Bahr R., Grundy S.M., Mehran R., Colombo A., Boerwinkle E., Ballantyne C., Insull W. Jr, Schwartz R.S., Vogel R., Serruys P.W., Hansson G.K., Faxon D.P., Kaul S., Drexler H., Greenland P., Muller J.E., Virmani R., Ridker P.M., Zipes D.P., Shah P.K., Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies: part I. *Circulation*. 2003 ; 108 : 1664-1672
96. **Narula J.**, Strauss W. Imaging of unstable atherosclerotic lesions. *Eur. J. Nucl. Mol. Imaging*. 2005 ; 32 : 1-5
97. **Narula J.**, Petrov A., Pak KY., Ditlow C., Chen F., Khaw B.A. Noninvasive detection of atherosclerotic lesions by ^{99m}Tc-based immunoscintigraphic targeting of proliferating smooth muscle cells. *Chest*. 1997 ; 111 : 1684-1690
98. **Nielsen L.B.** Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1996 ; 123 : 1-15
99. **Nossner E.**, Goldberg J.E., Naftzger C., Lyu S.C., Clayberger C., Krensky A.M. HLA-derived peptides which inhibit T cell function bind to members of the heat shock protein 70 family. *J. Exp. Med*. 1996 ; 183(2) : 339-348
100. **Nowotnick D.P.**, Verbruggen A.M.. Practical and physicochemical aspects of the preparation of ^{99m}Tc-labelled radiopharmaceuticals. Ln: Textbook of radiopharmacy. Theory and practice, 3^{ed}, ed. C.B. Sampson. Gordon and Breach Science publishers. 1999 : 33-56

101. **O'Brien K.D.**, Allen M.D., McDonald T.O., Chait A., Harlan J.M. Fishbein D., McCarty J., Ferguson M., Hudkins K., Benjamin C.D., Lobb R., Alpers C.E. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implication for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 1993 ; 92 : 945-951
102. **Ogawa M.**, Ishino S., Mukai T., Asano D., Teramoto N., Watabe H. Kudomi N., Shiomi M., Magata Y., Iida H., Saji H. ¹⁸F-FDG accumulation in atherosclerotic plaques : immunohistochemical and PET imaging study. *J. Nuc. Med.* 2004 ; 45(7) : 1245-1250
103. **Ohtsuki K.**, Hayase M., Akashi K., Kapiwoda S., Strauss H.W. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 receptor expression in experimental atherosclerotic lesions: an autoradiographic study. *Circulation.* 2001 ; 104(2) : 203-208
104. **Ono M.**, Arano Y., Mukai T., Fujioka Y., Ogawa K., Uehara T., Saga T., Konishi J., Saji H. (99m)Tc-HYNIC-derivatized ternary ligand complexes for (99m)Tc-labeled polypeptides with low in vivo protein binding. *Nucl Med Biol.* 2001 ; 28(3) : 215-224.
105. **Osborn L.**, Hession C., Tizard R., Vassallo C., Luhowsky S., Chi-Rosso G., Lobb R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell.* 1989 ; 59 : 1203-1211
106. **Palmer M.** Basics mechanisms of radiolabelling. *L_n* : *Textbook of radiopharmacy. Theory and practice*, 3^{ed}, ed. C.B. Sampson. Gordon and Breach Science publishers. 1999 : 530
107. **Pietzsch H.J.**, Gupta A., Reisgys M., Drews A., Seifert S., Syhre R., Spies H., Alberto R., Abram U., Schubiger P.A., Johannsen B. Chemical and biological characterization of technetium(I) and Rhenium(I) tricarbonyl complexes with dithioether ligands serving as linkers for coupling the Tc(CO)(3) and Re(CO)(3) moieties to biologically active molecules. *Bioconjug. Chem.* 2000 ; 11(3) : 414-424.

108. **Qin G.**, Zhang Y., Cao W., An R., Gao Z., Li G., Xu W., Zhang K., Li S. Molecular imaging of atherosclerotic plaques with technetium-99m-labelled antisense oligonucleotides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* ; 2005 ; 32 : 6-14
109. **Regoezi E.** In Vivo Behavior of Catabolized labels derived from iodo proteins. Ln ; Iodine Labeled plasma proteins. 1987; Vol II, Part B ; CRC Press : 43-71
110. **Rice G.E.**, Munro J.M., Bevilacqua M.P. Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes : a CD11-CD18 independent adhesion mechanism. *J. Exp. Med.* 1990 ; 171 : 1369- 1374
111. **Risau W.** Differentiation of endothelium. *FASEB J.* 1995 ; 9 : 926-933
112. **Robles A.M.**, Balter H.S, Olivier P., Welling M.M., Pauwels E.K. Improved radioiodination of biomolecules using exhaustive Chloramine-T oxidation. *Nucl. Med. Biol.* 2001 ; 28 (8) : 999-1008
113. **Ross R.** Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999 ; 340(2) : 115-126
114. **Ross R.** Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.* 1995 ; 57 : 791-804.
115. **Rudd J.H.**, Warburton E.A., Fryer T.D., Jones H.A., Clark J.C., Antoun N., Johnstrom P., Davenport A.P., Kirkpatrick P.J., Arch B.N., Pickard J.D., Weissberg P.L. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation.* 2002 ; 105(23) : 2708-2711.
116. **Ruoslahti E.**, Pierschbacher M.D. Arg-Gly-Asp : A versatile Cell recognition signal. *Cell.* 1986 ; 44 : 517-518
117. **Rusckowski M.**, Qu T., Gupta S., Ley A., Hnatowich D.J. A comparison in monkeys of (^{99m}Tc) labeled to a peptide by 4 methods. *J. Nucl. Med.* 2001 ; 42(12) : 1870-1877

118. **Sadeghi M.M.**, Krassilnikova S., Zhang J., Gharaei A.A., Fassaei H.R., Esmailzadeh L., Kooshkabadi A., Edwards S., Yalamanchili P., Harris T.D., Sinusas A.J., Zaret B.L., Bender J.R. Detection of injury-induced vascular remodeling by targeting activated alphavbeta3 integrin in vivo. *Circulation*. 2004 ; 110(1) : 84-90.
119. **Sancey L.** Evaluation d'un radioligand de l'intégrine avb3, le Raft RGD, par l'imagerie moléculaire de l'angiogénèse tumorale. Doctorat Génie Biologique et Médical. 1 juin 2006 ; Université Joseph Fourier Grenoble
120. **Schafers M.**, Riemann B., Kopka K., Breyholz H.J., Wagner S., Schafers K.P., Law M.P., Schober O., Levkau B.. Scintigraphic imaging of matrix metalloproteinase activity in the arterial wall in vivo. *Circulation*. 2004 ; 109(21) : 2554-2559
121. **Sherman L.A.**, Harwig S., Hayne O. Macromolecular complexe formed as the result of chloramine-T radiodination of proteins. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 1974 ; 25(2) : 81-85
122. **Schibli R.**, Katti K.V., Higginbotham C., Volkert W.A., Alberto R. *In vitro* and *in vivo* evaluation of bidentate, water-soluble phosphine ligands as anchor groups for the organometallic *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃]⁺ core. *Nucl. Med. Biol.* 1999 ; 26 : 711-716
123. **Schibli R.**, Schubiger P.A. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2002 ; 29(11) : 1529-1542
124. **Schibli R.**, Schwarzbach R., Alberto R., Ortner K., Schmalle H., Dumas C., Egli A., Schubiger P.A. 2 Steps toward high specific activity labeling of biomolecules for therapeutic application: preparation of precursor [¹⁸⁸Re(H₂O)₍₃₎(CO)₍₃₎]⁽⁺⁾ and synthesis of tailor-made bifunctional ligand systems. *Bioconjug. Chem.* 2002 ; 13(4) : 750-756.
125. **Schibli R.**, Dumas C., Petrig J., Spadola L., Scapozza L., Garcia-Garayoa E., Schubiger P.A. Synthesis and *in vitro* characterization of organometallic rhenium and technetium glucose complexes against Glut 1 and hexokinase *Bioconjug. Chem.* 2005 ; 16(1) : 105-112.

126. **Schibli R.**, La Bella R., Alberto R., Garcia-Garayoa E., Ortner K., Abram U., Schubiger P.A. Influence of the denticity of ligand systems on the *in vitro* and *in vivo* behavior of ^{99m}Tc (I)-tricarbonyl complexes: a hint for the future functionalization of biomolecules. *Bioconjug. Chem.* 2000 ; 11(3) : 345-351.
127. **Schibli R.**, Katti K.V., Higginbotham C., Volkert W.A., Alberto R. *In vitro* and *in vivo* evaluation of bidentate, water-soluble phosphine ligands as anchor groups for the organometallic *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ -core. *Nucl. Med. Biol.* 1999 ; 26(6) : 711-716.
128. **Shannon K.E.**, Keene J.L., Settle S.L., Duffin D.T., Nickols M.A, Westlin M., Schroeter S., Ruminski P.G., Griggs D.W. anti-metastatic properties of RGD-peptidomimetic agents S137 and S247. *Clin. Exp. Metastasis.* 2004 ; 21 : 129-138
129. **Signore A.**, Annovazzi A., Chianelli M., Corsetti F., Van de Wiele C., Watherhouse R.N. Peptide Radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy. *Eur. J. Nucl. Med.* 2001 ; 28 : 1555-1565
130. **Stary H.**, Chair C., Bleakley S. A., Dinsmore R., Fuster V., Glagov S., Insull W.Jr, Rosenfeld M.E., Schwartz C.J., Colin J., Wagner W.D., Wissler R.W. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis. American Heart Association, special report. *Circulation.* 1995 ; 92 : 1355 - 1374
131. **Stary H.** An atlas of atherosclerosis progression and regression. Ed Hardcover 1999
132. **Stichelberger A.**, Waibel R., Dumas C., Schubiger P.A., Schibli R. Versatile synthetic approach to new bifunctional chelating agents tailor made for labeling with the *fac*- $[\text{M}(\text{CO})_3]^{(+)}$ core (M = Tc, ^{99m}Tc , Re) : synthesis, *in vitro*, and *in vivo* behavior of the model complex $[\text{M}(\text{APPA})(\text{CO})_3]$ (APPA = [(5-amino-pentyl)-pyridin-2-yl-methyl-amino]-acetic acid). *Nucl. Med. Biol.* 2003 ; 30(5) : 465-470
133. **Thakur M.L.** Radiolabelled peptides: now and the future. *Nucl. Med. Commun.* 1995 ; 16(9) : 724-732.

134. **Tarazona R.**, Lopez-Lluch G., Galiani M.D., Aguado E, Barahona F., Solana R., Pena J. HLA-B2702(77-83/83-77) peptides binds to betatubulin on human NK cells and blocks their cytotoxic capacity. *J. Immunol.* 2000 ; 165(12) : 6776-6782
135. **Tarli L.**, Balza E., Viti F., Borsi L., Castellani P., Berndorff D., Dinkelborg L., Neri D., Zardi L. A high-affinity human antibody that targets tumoral blood vessels. *Blood.* 1999 ; 94(1) : 192-198
136. **Tsimikas S.**, Palinski W., Halpern S.E., Yeung D.W., Curtiss L.K., Witztum J.L. Radiolabeled MDA2, an oxidation-specific, monoclonal antibody, identifies native atherosclerotic lesions in vivo. *J. Nucl. cardiol.* 1999; 6 : 41-53
137. **Tsimikas S.**, Shaw P.X. Non-invasive imaging of vulnerable plaques by molecular targeting of oxidized LDL with tagged oxidation-specific antibodies. *Cell. Biochem. Suppl.* 2002 ; 39 : 138-146.
138. **Tsimikas S.** Noninvasive imaging of oxidized low-density lipoprotein in atherosclerotic plaques with tagged oxidation-specific antibodies. *Am. J. Cardiol.* 2002 ; 90(10C) : 22L-27L
139. **Ünak T.**, Akgün Z. Yildiril A. Duman Y., Erenel G.. Self-radioiodation of iodogen. *Appl. Radiat. Isot.* 2001 ; 54 : 749-752
140. **Vallabhajosula S.**, Fuster V. Atherosclerosis : imaging techniques and the evolving role of nuclear medicine. *J. Nucl. Med.* 1997 ; 38(11) : 1788-1796
141. **Van Hagen P.M.**, Breeman W.A.P., Bernard H.F., Schaar M., Mooij C.M., Srinivasan A., Schmidt M.A., Krenning E.P., de Jong M. Evaluation of a radiolabelled cyclic DTPA-RGD Analogue for tumor imaging and radionuclide therapy. *Int. J. Cancer.* 2000 ; 8 : 186-198
142. **Verbeke K.**, Kieffer D., Vanderheyden J.L. Reutelingsperger C., Steinmetz N., Green A., Verbruggen A. Optimization of the preparation of ^{99m}Tc-labeled Hynic-derivatized Annexin V for human use. *Nucl. Med. Biol.* 2003 ; 30 : 771-778

143. **Waibel R.**, Alberto R., Willuda J., Finnern R., Schibli R., Stichelberger A., Egli A., Abram U., Mach J.P., Pluckthun A., Schubiger PA. Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex. *Nat. Biotechnol.* 1999 ; 17(9) : 897-901
144. **Weiner R.E.**, Thakur M.L. Radiolabeled peptides in diagnosis and therapy. *Semin Nucl Med.* 2001 ; 31(4) : 296-311.
145. **Weiner R.E.**, Thakur M.L. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. *Appl Radiat Isot.* 2002 ; 57(5) : 749-763.
146. **Weiner R.E.**, Thakur M.L. Radiolabeled peptides in oncology: role in diagnosis and treatment. *BioDrugs.* 2005 ; 19(3) : 145-163.
147. **Woo J.**, Iyer S., Cornejo M.C., Gao L., Cuturi C., Soullillou J.P., Buelow R. Immunosuppression by D-isomers of HLA class I heavy chain (amino acid 75 to 84)-derived peptides is independent of binding to HSC70. *Transplantation.* 1997 ; 64(10) : 1460-1467
148. **Woo J.**, Gao L., Cornejo M.C., Buelow R. A synthetic dimeric HLA class I peptide inhibits T cell activity in vitro and prolongs allogeneic heart graft survival in a mouse model. *Transplantation.* 1995 ; 60(10) : 156-1563
149. **Xiong J.P.**, Stehle T., Zhang R., Joachimiak A., Frech M., Goodman S.L., Arnaout M.A.. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science.* 2002 ; 296(5565): 151-155
150. **Zhang Y.M.**, Liu N., Zhu Z.H., Rusckowski M., Hnatowich D.J. Influence of different chelators (HYNIC, MAG3 and DTPA) on tumor cell accumulation and mouse biodistribution of technetium-99m labeled to antisens DNA. *Eur. J. Nuc. Med.* 2000 ; 27 : 1700-1707
151. **Zhang J.**, wang X., li C., Zhang J. Synthesis and biodistribution of a new (99m)Tc nitrido complex for cerebral imaging. *Nucl Med Biol.* 2002 ; 29(6) : 665-669

152. **Zobi F.**, Spingler B., Alberto R. Guanine and Plasmid DNA binding of Mono-and Trinuclear *fac*-[Re(CO)₃]⁽⁺⁾ Complexes with Amino Acid Ligands. *ChemBiochem*. 2005 ; 6(8):1397-1405.

153. **Zhu Z.**, Wang Y., Zhang Y., Liu G., Liu N., Rusckowski M., Hnatowich D.J. A novel and simplified route to the synthesis of N3S chelators for 99mTc labeling. *Nucl. Med. Biol.* 2001 ; 28(6) : 703-708.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du réactif de Bolton-Hunter.....	28
Figure 2 : Structure de la chloramine-T.....	32
Figure 3 : Structure de l'Iodogen.....	33
Figure 4 : Site d'halogénéation du résidu tyrosine.....	37
Figure 5 : Schéma de la désintégration du Molybdène 99.	44
Figure 6 : Générateur ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc (Elumatic III, Schering-Cis bio International).	45
Figure 7 : Structure d'un Complexe Tc (+I) : le MIBI-[^{99m} Tc] (Cardiolite®).	53
Figure 8 : Structure de deux complexes à cœur de technétium [TcO] ³⁺ : l'HMPAO-[^{99m} Tc] et l'ECD-[^{99m} Tc].	54
Figure 9 : Ligands à cœur [TcO ₂] ⁺ . A gauche le ligand phosphine Tetrofosmin [6,9-bis (2-ethoxyethyl)-3,12-dioxa-6,9-diphosphatetradecane (Myoview®), à droite un ligand amine tétradenté (cyclam).	55
Figure 10 : Représentation schématique de l'approche BFCA.	56
Figure 11 : Structure du complexe [^{99m} Tc]-HYNIC-molécule.....	57
Figure 12 : Marquage par TcO (+V) en présence de coligands (tricine, phosphine).	59
Figure 13 : Exemple de synthon N ₃ S : MAG3, bétiatide (à gauche) et MAG3-[^{99m} Tc], mertiatide-[^{99m} Tc]) (à droite).	61
Figure 14 : Rendement de marquage de fonction peptidique dans un milieu tampon phosphate sodique, pH7,4, après 1 heure d'incubation à 37°C. Rendement déterminé par CLHP. (A) acide aminé et fragment histidine. Met = méthionine ; Cys = cystéine. (B) : analogues de la Neurotensine comparés avec leur groupe de coordination. Ac = acétyle. D'après Egli A. 1999.....	63
Figure 15 : Schéma de la réaction de marquage au technétium 99m d'un résidu histidine, situé en bout de chaîne peptidique, par l'intermédiaire du kit de marquage Isolink® (Mallinckrodt).....	65
Figure 16 : Rupture de la plaque et formation du thrombus dans une artère coronaire (Glass 2001).....	72
Figure 17 : Evolution de la plaque d'athérome.	72
Figure 18 : Initiation de l'athérosclérose (Glass C.K. 2001). (VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1, ICAM-1 : Intercellular Cell Adhesion Molecule 1, M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor, MCP-1 : Macrophage Chemoattractant Protein 1, 15LO : 15 Lipoxygenase, SR-A : Scavenger Receptor A, ApoE : Apolipoprotéine E, ACAT : Acyl CoA Cholesterol Acetyl Tranferase.	73

Figure 19 : Développement de la plaque d'athérosclérose (Glass C.K. 2001). (IL : interleukine, IFN γ : interferon γ)	73
Figure 20 : Déstabilisation et rupture de la plaque d'athérome (Glass 2001).	74
Figure 21 : Structure de VCAM-1. VCAM-1 possède deux sites de liaison pour VLA-4 au niveau des domaines extracellulaires 1 et 4 (cercles). D'après Cybulsky 2001.	76
Figure 22 : Recrutement d'un leucocyte dans la paroi artérielle. La liaison des sélectines avec leur ligand entraîne un phénomène de « rolling », puis les liaisons immunoglobulines-intégrines permettent une adhésion ferme du monocyte à la surface de l'endothélium et la transmigration du monocyte. PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein 1, VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1, VLA-4 : Very Late Antigen 4, ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule.	76
Figure 23 : Images dorsales obtenues <i>in vivo</i> chez le lapin avec MDA2, 16 heures après l'injection de MDA2- ^{99m} Tc. L'aorte abdominale est bien visible chez les lapins hyperlipidémiques (flèches en A) comparativement aux lapins contrôles (B). F : Foie, Ra : Rate, E : Estomac, R : Rein, I : Intestin. (Tsimikas S. 2002).....	80
Figure 24 : Image latérale obtenue <i>in vivo</i> chez le lapin avec [¹¹¹ In]-Z2D3-Fab'. 12 heures après l'injection, l'aorte abdominale est visible chez les lapins hyperlipidémiques. R : Rein, V : Vessie. (Narula 1997).....	82
Figure 25 : Images scintigraphiques obtenues <i>in vivo</i> chez le lapin avec [^{99m} Tc]-Annexin V. Image à 2 heures chez le lapin déendothélialisé (A) et chez le lapin du groupe contrôle (B). F : foie, R : rein (Kolodgie F.D. 2003).	83
Figure 26 : Représentation schématique de l'angiogenèse physiologique.	86
Figure 27 : Représentation schématique de l'angiogenèse physiologique (A) et de la néoangiogenèse tumorale (B).	87
Figure 28 : Représentation schématique de la néoangiogenèse tumorale. Secrétions de facteur de croissance et de cytokines par la cellule tumorale, destruction de la matrice, prolifération et migration des cellules endothéliales, synthèse de neovaisseaux.	88
Figure 29 : Représentation de la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (sous-unité α_v en bleu, sous-unité β_3 en rouge). A : structure cristalline du récepteur, B : modèle du récepteur déployé (Xiong J.P. 2001).	90
Figure 30 : Comparaison de scintigraphie [¹⁸ F]FDG et [¹⁸ F]Galacto-RGD chez l'homme. Images coronales à 60 mn post-injection. Haubner PLoS Med. 2005 March; 2(3) : e70.....	96
Figure 31 : Structure du gabarit Raft. A : fonctionnalisation du Raft permettant la liaison de 4 structures identiques. B : structure tridimensionnelle dans l'espace (Garanger E. 2005).	108
Figure 32 : Schéma de synthèse de [B2702 (84-75)] ₄ -Raft-H.	109

Figure 33 : Structure des peptides « RGD ». A gauche, le contrôle négatif ANG2 caractérisé par une structure Raft (décapeptide plan) sur laquelle sont fixées par une liaison oxime 4 structures pentacycliques contenant une β alanine et à l'opposé deux tyrosines. A droite, le RGD-Raft 175 caractérisé par une structure Raft sur laquelle sont fixés par une liaison oxime 4 pentacycles contenant le motif RGD, et à l'opposé deux tyrosines permettant le radiomarquage.	111
Figure 34 : Analyse chromatographique par CLHP de ATH1-[¹²⁷ I]. Chromatographie phase inverse : colonne nucléosil C18, gradient de concentration eau-TFA 0,1% (A) /acétonitrile-TFA 0,1% (B) ; de 5 à 60% de B en 15 minutes ; débit 1,3 ml/mn, UV 264 nm. Analyse au temps T0, après 20 minutes et 60 minutes d'oxydation.	154
Figure 35 : Influence de la concentration en chloramine-T sur la pureté radiochimique de ATH1-[¹²⁵ I]. Peptide 10 μ g : 3,4 nmoles ; NaI : 0,156 nmoles. Mesure de la PRC sur plaque de silice RP ₆₅₄ , solvant acétonitrile/ eau (65/35).	155
Figure 36 : Etude de stabilité de ATH2-[¹²⁵ I] en solution aqueuse sur 24 heures. Conservation pendant 24 heures à +4°C - +8°C. Analyse à H0 et H24. Analyse par CLHP sur colonne C18 Bondapak ; gradient (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) 90/10 (A) / eau-TFA 0,1%(B), de 0 à 5 mn 20% de A, de 5 à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité (Sonde gamma Novelec).	158
Figure 37 : Etude de la stabilité à la chaleur de ATH3. Incubation en présence de NaCl 0,9% à 100°C ou 150°C pendant 30 minutes. Analyse par CLHP sur colonne C18 Bondapak ; (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) 90/10 (A) / eau-TFA 0,1% (B), de 0 à 5 mn 20% de A, de 5 à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% de A ; debit 0,7 ml/mn ; détection UV à 210 nm.	159
Figure 38 : Optimisation du marquage de ATH3 au technétium 99m. Influence du pH de la solution sur la pureté radiochimique. Mesure des impuretés par chromatographie couche mince sur plaque de silice C18 en présence de NaCl 0,9% (NaCl) ou d'un mélange acétonitrile/eau 80/20.	160
Figure 39: Mesure du coefficient de partage octanol/eau en fonction du pH des solutions aqueuses de ATH1-[¹²⁵ I] et ATH2-[¹²⁵ I].	166
Figure 40 : Migration de la BSA sur gel retard de polyacrylamide. Coloration des peptides et protéines au bleu de bromophénol et bleu de xylène	167
Figure 41: Contrôle de l'affinité de B2702(84-75)-[¹²⁵ I] pour VCAM-1. B2702(74-85)-[¹²⁵ I] est incubé en présence de son récepteur VCAM-1 en concentration équimolaire, en l'absence (gel A) ou en présence (gel B) de concentrations croissantes de BSA. Electrophorèse retard sur gel de polyacrylamide 4%-20%. Détection par autoradiographie et lecture au phospho-imager.	167
Figure 42 : Biodistribution sanguine <i>in vitro</i> . Détermination de la liaison de ATH3-[^{99m} Tc] aux globules rouges et aux protéines plasmatiques.	169

Figure 43 : Pourcentage de liaison de ATH4-[^{99m} Tc] aux cellules sanguines et aux protéines plasmatiques en fonction de la durée d'incubation. Mesure de l'activité au compteur gamma (Cobra).....	169
Figure 44 : Etude de la dégradation peptidique de ATH2-[¹²⁵ I]. Chauffage dans une solution d'HCl pH 1 pendant 30 minutes à 150°C. CLHP sur colonne C18 Bondapak ; gradient (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn : 20% de A, de 5 à 20 mn : de 20 à 60% de A; débit 0,7 ml/mn ; détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité (Sonde gamma Novelec).....	171
Figure 45 : Stabilité du complexe ATH3-[^{99m} Tc] en présence de L-histidine. Incubation de 1 µg (0,67 nmoles) de peptide en présence de 2,5 mmoles de L-histidine pendant 30 minutes. Analyse par CLHP sur colonne C18, gradient d'élution acétonitrile / eau, débit 0,7 ml/mn.	173
Figure 46 : Stabilité du complexe ATH3-[^{99m} Tc] en présence de L-histidine. Incubation de 1 µg (0,67 nmoles) de peptide en présence de 3 (A), 30 (B), et 300 nmoles (C) de L-histidine pendant 30 minutes. Analyse par CLHP sur colonne C18, gradient d'élution acétonitrile / eau, débit 0,7 ml/mn	173
Figure 47 : Stabilité du complexe ATH3-[^{99m} Tc] en présence de SVF. Incubation de 1 µg (0,67 nmole) de peptide dans 1 millilitre de SVF à 37°C pendant 90 minutes. Analyse par CLHP sur colonne C18, gradient d'élution acétonitrile / eau, débit 0,7 ml/mn. Recueil de l'éluat en sortie de colonne par fraction de 0,7 ml. Tr ATH3-[^{99m} Tc] de 17,5 mn.....	174
Figure 48 : Stabilité du complexe ATH3-[^{99m} Tc] dans le sang. Incubation de 1 µg (0,67 nmole) de peptide dans 1 millilitre de sang à 37°C sous agitation pendant 180 minutes. Analyse du sérum par CLHP sur colonne C18, gradient d'élution acétonitrile / eau, débit 0,7 ml/mn. Analyse de deux échantillons.....	175
Figure 49 : Analyse du sérum de lapin, avant injection (H0), 5 mn (H5 mn) et 30 mn (H 30 mn) après injection de ATH2-[¹²³ I] chez le lapin Watanabe. CLHP colonne C18; gradient (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn : 20% de A, de 5 à 25 mn : de 20 à 60% de A et de 25 à 35 mn : 60% de A ; débit 0,7 ml/mn ; recueil de l'éluat toutes les minutes et comptage des éluats au compteur gamma.	178
Figure 50: Radiochromatogramme du produit brut ATH3-[^{99m} Tc]. Analyse sur colonne C18 Bondapak. Gradient d'élution (acétonitrile-TFA0,1%)-(H ₂ O-TFA 0,1%) (90/10) (A) / H ₂ O-TFA 0,1% (B) avec de 0-5 mn 20% B, de 5 mn à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% de A. Détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité avec une sonde gamma Novelec. Débit 0,7 ml/mn.	179
Figure 51: Radiochromatogramme du plasma de lapin prélevé 1 heure après l'injection du traceur. Analyse sur colonne C18 Bondapak. Gradient d'élution (acétonitrile-TFA0,1%)-(H ₂ O-TFA0,1%).....	179

Figure 52 : Radiochromatogramme du plasma de lapin prélevé 3 heures après l'injection du traceur. Analyse sur colonne C18 Bondapak. Gradient d'élution (acétonitrile-TFA0,1%)-(H ₂ O-TFA0,1%) (90/10) (A) / H ₂ O-TFA 0,1% (B) avec de 0-5 mn 20% A, de 5 mn à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% de A. Détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité avec une sonde gamma Novelec. Débit 0,7 ml/mn.....	179
Figure 53 : Radiochromatogramme de l'urine de lapin prélevée 3 heures après l'injection du traceur. Analyse sur colonne C18 Bondapak. Gradient d'élution (acétonitrile-TFA0,1%)-(H ₂ O-TFA 0,1%) (90/10) (A) / H ₂ O-TFA 0,1% (B) avec de 0-5 mn 20% A, de 5 mn à 20 mn de 20 à 60% de A, de 20 à 30 mn 60% de A. Détection UV à 210 nm et détection de la radioactivité avec une sonde gamma Novelec. Débit 0,7 ml/mn.	180
Figure 54 : Cinétiques sanguines de ATH1-[¹²³ I] et ATH2-[¹²³ I] chez le lapin hypercholestérolémique Watanabe (WHHL) et le lapin « Contrôle ». Analyse sur 30 minutes.	181
Figure 55 : Comparaison des cinétiques sanguines, chez le lapin « Contrôle », de ATH2-[¹²³ I], ATH3-[^{99m} Tc], ATH4-[^{99m} Tc]. Mesure sur 180 minutes en % de la dose injectée (DI) par gramme de sang. Les résultats sont exprimés en %DI/g et en Log (%DI/g).....	182
Figure 56 : Comparaison de la cinétique sanguine, chez le lapin contrôle, de ATH2-[¹²³ I], ATH3-[^{99m} Tc], et ATH4-[^{99m} Tc]. Mesure sur 180 minutes. Les résultats sont exprimés en % de l'activité mesurée à 1 minute.	183
Figure 57 : Comparaison des biodistributions du peptide iodé monobrin ATH2-[¹²³ I] et du peptide iodé double-brin ATH1-[¹²³ I] chez les lapins « Watanabe » et « Contrôle ». Analyse 3 heures post-injection. Les résultats sont exprimés en %DI/g d'organe.....	185
Figure 58 : Images scintigraphiques de la biodistribution de ATH2-[¹²³ I] chez le lapin. Images à 60 minutes (1), 110 minutes (2) et 150 minutes (3) post-injection.	187
Figure 59 : Exemple d'images en vue latérale obtenues en imagerie planaire. Sur cet exemple, les images sont réalisées avec ATH3-[^{99m} Tc]. En A, numérotées de 1 à 15 sont représentées les 30 premières secondes d'acquisition. Chaque image représente 2 secondes d'acquisition de la radioactivité. On peut suivre le premier passage du radiotraceur dans l'organisme depuis son injection dans la veine de l'oreille (image 1), son passage cardiaque (image 6), aortique (image 9) jusqu'à sa diffusion dans l'organisme (image 15). Les images correspondant au passage aortique sont sommées afin de localiser cette structure avec précision (B). L'aorte n'est pas visible aux temps longs (en C, sommation des 30 dernières minutes d'acquisition) (D'après Broisat A. 2005).....	188
Figure 60 : Optimisation de la réaction de marquage à l'iode 125 de ANG1. Etude de la pureté radiochimique par chromatographie couche mince sur plaque de silice C18 RP ₆₅₄ , solvant mélange acétonitrile/eau (75/25). Marquage à la chloramine-T (44 nmoles) en présence de 18,5 MBq (250 pmoles) d'iode 125 et de quantités croissantes de peptide : 0,2 nmoles, 2 nmoles, 10 nmoles et 20 nmoles (1µg, 10µg, 50µg et 100 µg).....	190

- Figure 61 : Détermination de la pureté radiochimique de ANG1 (10 nmoles, 50µg) à différentes concentrations en chloramine-T (CLAT) : 4,4 ; 11 ; 22 et 44 nmoles dans la solution, à différents temps : 5, 15, 30 minutes, par 250 pmoles de NaI (activité théorique 18,5 MBq). Mesure par CCM C18 RP₆₅₄, solvant acétonitrile/eau (75/25). 191
- Figure 62 : Radiochromatogramme de la préparation de ANG1-[^{99m}Tc], détection de la radioactivité par une sonde gamma (Novelec). 194
- Figure 63 : Radiomarquage de ANG4 au ^{99m}Tc : étude de la pureté radiochimique en fonction de la durée d'incubation. Incubation de 50 µg de ANG4 en présence de 370 MBq de solution d'Isolink® technétié pendant 60 minutes à 40°C. Analyse à T30 mn (A) et T60 mn (B). CLHP: colonne Bondapak® C18, gradient acétonitrile/H₂O/TFA0,1%, débit 1 ml/mn.; Tr:^{99m}TcO₄⁻: 5 mn, [^{99m}Tc (H₂O)₃(CO)₃]⁺: 10 mn (❶), 2 pics non identifiés par spectrométrie de masse à 20 mn (❷) et 28 mn (❸). 196
- Figure 64: Marquage de ANG4 au technétium (740 MBq). Détermination de l'activité spécifique maximum. Analyse CLHP, colonne C18 Bondapak 5µm 20 cm, gradient d'élution (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; 0 à 5 mn 5 % de A, de 5 à 25 mn de 5% à 60 % de A, de 25 à 35 mn 60% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur UV et détecteur de radioactivité. Analyse de deux échantillons A et B. 197
- Figure 65 : Stabilité du marquage de ANG4-[^{99m}Tc]. Conservation à 4°C pendant 24 heures. Analyse CLHP, colonne C18 Bondapak 5µm 20 cm, gradient d'élution (90% acétonitrile-10% eau-0,1% TFA) (A) / (eau-0,1% TFA) (B) ; 0 à 5 mn 5 % de A, de 5 à 25 mn de 5 à 80% de A, et de 25 à 35 mn 80% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur de radioactivité : sonde γ (Novelec). A gauche comptage au spectromètre gamma Cobra de l'éluat en sortie de colonne chromatographique, à droite exemple de graphe CLHP de ANG4-[^{99m}Tc] à H0 198
- Figure 66 : Détermination de la fixation cellulaire du traceur en fonction du temps. Incubation du traceur ANG4-[^{99m}Tc] dans un échantillon de sang pendant 3 heures. Mesure de l'activité du culot cellulaire et du sérum au compteur gamma (Cobra)..... 200
- Figure 67 : Evaluation de la fixation non spécifique de ANG4-[^{99m}Tc] aux protéines plasmatiques. Mesure de l'activité du culot protéique après précipitation au TCA 10 %..... 201
- Figure 68 : Stabilité du marquage de ANG4-[^{99m}Tc] en milieu biologique. Etude de la réaction de transchélation en présence de concentrations croissantes d'EDTA : 1 nmole/ml (graphe A), 10 nmoles/ml (B) et 100 nmoles/ml (C). Analyse CLHP, colonne C18 Bondapak 5µm 20 cm, gradient d'élution (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; 0 à 5 mn 5 % de A, de 5 à 25 mn de 5% à 80 % de A et de 25 à 35 mn 80% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur UV et détecteur de radioactivité. 204

Figure 69 : Stabilité du marquage de ANG4-[^{99m} Tc] en milieu biologique. Etude de la réaction de transchélation en présence de concentrations croissantes de L-histidine à 1 nmole/ml, 10 nmoles/ml et 100 nmoles/ml. Analyse CLHP, colonne C18 Bondapak 5µm 20 cm, gradient d'éluion (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn 5 % de A, de 5 à 25 mn 80 % de A et de 25 à 35 mn 80% de A ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur de radioactivité.	205
Figure 70 : Déplacement de la liaison au technétium du peptide ANG4-[^{99m} Tc] en présence de concentration croissante de cystéine. La molécule radiomarquée à 1 nmole/ml est incubée à 37°C pendant 60 minutes en présence de cystéine à 0,1 nmole/ml, 1 nmole/ml, 10 nmoles/ml et 100 nmoles/ml.	206
Figure 71 : Déplacement de la liaison au technétium du peptide ANG4-[^{99m} Tc] en présence de concentrations croissantes de cystéine. La molécule radiomarquée à 1 nmole/ml est incubée à 37°C pendant 2 heures en présence de cystéine à 0,1 nmole/ml, 1 nmole/ml, 10 nmoles/ml.	207
Figure 72 : Evolution de la PRC d'une solution de ANG4-[^{99m} Tc] à 1 nmole incubée en présence de sérum de veau fœtal pendant 1 heure ou 3 heures, à 37°C sous agitation. Le sérum est analysé par CLHP sur colonne C18, gradient acétonitrile / eau / TFA 0,1%. L'éluat est recueilli en sortie de colonne et mesuré au compteur gamma.	207
Figure 73 : Analyse <i>in vitro</i> de la stabilité sanguine de ANG4-[^{99m} Tc]. Incubation de ANG4-[^{99m} Tc] pendant 24 heures à 37°C sous agitation. Mesure CLHP d'une aliquote à 1, 3 et 24 heures.	208
Figure 74 : Stabilité du marquage du peptide ANG2-[¹²⁵ I]. Analyse du sérum de souris 1H post IV. Analyse par CLHP : colonne C18, gradient d'éluion (acétonitrile-TFA 0,1%)-(eau-TFA 0,1%) (90/10) (A) / eau-TFA 0,1% (B) : 0-5 mn 10% de A, 5-20 mn de 10 % à 60% de A, 20-35 mn 60 % de B, débit 0,7 ml/mn.	209
Figure 75: Analyse par CLHP de sérum de souris après administration de 20 MBq de ANG4-[^{99m} Tc]. Prélèvements 1 heure, 2 heures et 4 heures après administration. Analyse sur colonne Bondapak C18, gradient d'éluion acétonitrile/ eau avec 0,1% de TFA, débit 0,7 ml.	210
Figure 76 : Analyse des urines de souris 2 heures après l'injection de 30 MBq de ANG4-[^{99m} Tc] (2 souris). CLHP des urines sur colonne C18, gradient acétonitrile/eau/TFA 0,1%, débit 0,7 ml/mn, détection de la radioactivité par une sonde γ Novelec. Recueil de l'éluat en sortie de colonne et comptage au compteur gamma.	212
Figure 77 : Analyse des urines d'une souris 2 heures et 4 heures après l'injection de 30 MBq de ANG4-[^{99m} Tc]. CLHP des urines sur colonne C18, gradient acétonitrile /eau /TFA 0,1%, débit 0,7 ml/mn, détection de la radioactivité par une sonde γ Novelec. Recueil de l'éluat en sortie de colonne par fraction de 0,7 ml et comptage au compteur gamma. (l'échelle des activités des comptages à H4 est multipliée par quatre).	212

Figure 78 : Cinétique de biodistribution de ANG3-[¹²⁵ I] chez la souris (n=15). Les organes sont prélevés chez la souris 1, 2, 8 et 24 heures après l'administration de la molécule marquée.....	214
Figure 79 : Biosdistribution de ANG1-[¹²⁵ I] marqué à l'iode 125 chez la souris (n=15). Etude de la biodistribution en fonction du temps, prélèvement 1 heure, 4 heures, 6 heures, et 18 heures après l'injection.	215
Figure 80 : Comparaison des biodistributions de ANG1-[¹²⁵ I] et de ANG3-[¹²⁵ I] chez la souris Balb/c. Etude de la biodistribution 1 heure (A), et 4 heures (B).après l'injection des traceurs. Activité exprimée en %DI/g.....	216
Figure 81 : Biodistribution de ANG4-[^{99m} Tc] chez la souris, après administration de 18,5 MBq de peptide. Prélèvement 1 heure (n= 12), 4 heures (n= 16) et 24 heures (n= 3) après l'admnisrationdu traceur.	218
Figure 82 : Image scintigraphie de souris 4 heures après l'injection de ANG1-[¹²⁵ I]. Injection au niveau de la queue de la souris (masquée sur l'image). Il existe une accumulation isotopique au niveau des reins et de la vessie, ainsi qu'au niveau de la thyroïde.	219
Figure 83 : Images scintigraphiques de ANG4-[^{99m} Tc] chez la souris C57Bl/6J porteuse de tumeur B16F0 $\alpha_v\beta_3^+$, 2 heures post-injection. La tumeur est implantée dans la cuisse droite (flèche rouge). On observe une hyperfixation rénale, vésicale et hépatique. Images scintigraphiques chez deux souris.	219
Figure 84 : Images scintigraphiques du ANG4-[^{99m} Tc] chez la souris C57Bl/6J porteuse de tumeur B16F0, $\alpha_v\beta_3^+$ à 30 minutes (A), 1 heure (B) et 2 heures (C) post-injection. La tumeur est indiquée par une flèche. Les reins, un peu plus haut, captent fortement le traceur. Par ailleurs, on note le point d'injection du traceur dans la queue. ...	220

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Influence du temps d'incubation sur la PRC de ATH1-[¹²⁵ I]. Peptide 3,4 nmoles ; NaI : 0,156 nmoles, CLAT 8,8 nmoles. Mesure sur plaque de silice RP ₆₅₄ , solvant acétonitrile/ eau (65/35).	155
Tableau II : Optimisation de la réaction de radioiodation de ATH1 par la méthode au NBS : mesure de la PRC en présence de quantités croissantes de NBS.	156
Tableau III : Optimisation de la réaction de marquage à l'iode de ATH1 par la méthode à la lactoperoxydase : influence de la concentration du couple enzyme/peroxyde d'hydrogène sur la pureté radiochimique.....	156
Tableau IV : Comparaison des paramètres des réactions de marquage à l'iode ou au technétium 99m des dérivés de B2702(84:75). Etude de la durée de réaction, de la stabilité du marquage et de l'activité spécifique.	163
Tableau V : Etude du coefficient de partage de ATH1-[¹²⁵ I] en milieu octanol/eau. Etude des variations de K = Log (P) en fonction du pH de la phase aqueuse.....	164
Tableau VI : Mesure du coefficient de partage octanol/eau de B2702(84-75)-[¹²⁵ I] en fonction du pH de la solution aqueuse.	165
Tableau VII : Mesure du coefficient de partage de ATH4-[^{99m} Tc], en milieu octanol/eau à pH4 et milieu octanol/eau à pH 7,4. Mesure de l'activité au compteur gamma en KBq.	168
Tableau VIII : Propriétés physico-chimiques des molécules marquées. Mesure du cCoefficient de partage P (P= Log ([octanol]/[eau])) à pH 7,4.....	170
Tableau IX : Propriétés physico-chimiques des molécules marquées. Etude de la répartition sanguine des traceurs.	170
Tableau X : Comparaison des biodistributions du peptide iodé monomérique ATH2-[¹²³ I] et du peptide iodé dimérique ATH1-[¹²³ I] chez le lapin (lapin WHHL et Contrôle). Mesure en % DI/g d'organe. Analyse statistique par un test à l'écart réduit pour de petits échantillons au risque α 5%. *** p<0,001.	185
Tableau XI : Biodistributions de ATH2-[¹²³ I], ATH3-[^{99m} Tc], et ATH4-[^{99m} Tc] chez le lapin «New Zealand White ». Les organes sont prélevés 180 minutes post-injection. L'activité est mesurée au compteur gamma. Les résultats sont exprimés en %DI/g d'organe. ATH2-[¹²³ I] n= 3, ATH3-[^{99m} Tc] n = 3, et ATH3-[^{99m} Tc] n=6.....	186
Tableau XII : Influence de la concentration de N-bromosuccinimide sur la pureté radiochimique du marquage à l'iode des peptides ligands de « $\alpha_v\beta_3$ ». Mesure par CCM sur plaque de silice C18 RP ₆₅₄ , solvant acétonitrile/eau (75/25).	192
Tableau XIII : Influence de la concentration du couple lactoperoxydase/peroxyde d'hydrogène sur la pureté radiochimique du marquage à l'iode des peptides « $\alpha_v\beta_3$ ». Mesure de la PRC par CCM sur plaque de silice C18 RP ₆₅₄ , solvant acétonitrile/eau (75/25).	192

Tableau XIV : Influence de la température d'incubation sur la PRC du radiomarquage au technétium 99m de ANG4 . Marquage réalisé par l'intermédiaire d'un synthon tricarbonyle technétié (Isolink [®] , Mallinckrodt).....	195
Tableau XV: Coefficient de partage des peptides ANG en fonction de la formule chimique et de la méthode de radiomarquage.	199
Tableau XVI: Etude de la liaison du peptide ANG1-[¹²⁵ I] aux protéines plasmatiques par précipitation des protéines sériques au TCA10%.....	200
Tableau XVII : Biodistribution sanguine des peptides marqués : étude <i>in vitro</i> . Précipitation des protéines au TCA 10%.....	202
Tableau XVIII : Evolution de la PRC d'une solution de ANG4-[^{99m} Tc]. 1 nmole en RGD-Raft-H est mise en présence de concentrations croissantes d'histidine, à 1 nmole, 10 nmoles et 100 nmoles.	205
Tableau XIX : Comparaison des biodistributions de ANG3-[¹²⁵ I], et ANG1-[¹²⁵ I] chez la souris Balb/c. Etude statistique : comparaison des moyennes de petits échantillons. Lecture sur la table de l'écart-réduit t avec ddl = 7.	217

RESUME

Le développement de la médecine nucléaire passe par la recherche de nouveaux isotopes mais aussi de nouveaux vecteurs spécifiques de fonctions ou de voies métaboliques. L'équipe INSERM E0340 développe de nouveaux radiotraceurs destinés à de nouvelles approches diagnostiques de deux mécanismes physio-pathologiques fréquemment rencontrés dans nos populations : la plaque d'athérome vulnérable et la néoangiogenèse tumorale.

Nous avons mis au point et optimisé le radiomarquage, à l'iode et au technétium 99m, d'une série de peptides afin de permettre l'utilisation de ces traceurs pour des études d'imagerie *in vivo* chez l'animal puis chez l'homme. La radioiodation a été effectuée par substitution électrophile, et le technétium a été fixé par l'intermédiaire d'un petit synthon tricarbonyle (IsoLink). Les paramètres de réaction ont été définis afin que la réaction de marquage présente un haut rendement de marquage, et une forte activité spécifique. Les réactions sont rapides et reproductibles et la mise en forme compatible avec une utilisation *in vivo*. Les différentes propriétés physico-chimiques : liposolubilité, stabilité du marquage, et les propriétés pharmacocinétiques : pourcentage de liaison non spécifique, métabolisation, biodistribution des peptides, ont été mesurés. Les études ont permis de sélectionner le radioligand présentant les meilleurs critères pour une utilisation *in vivo* en imagerie.

The development of nuclear medicine implies the search for new isotopes but also for new vectors specific of functions or metabolic pathways. We investigated new radiopharmaceuticals intended for new diagnostic approaches of two physiopathological mechanisms frequently met in our populations: the atherosclerosis vulnerable plaque and the tumor angiogenesis. We studied and optimized the iodine and 99m-technetium radiolabelling, of a series of peptides in order to allow the *in vivo* use of these tracers for imaging studies in animals and possibly in humans. The radioiodination was carried out by electrophilic substitution, and technetium was linked by a tricarbonyl BFCA (IsoLink). The reaction parameters were defined so that the labelling reaction presents a high radiochemical purity (>95%), and a high specific activity. The reactions are fast and reproducible. Various physicochemical properties: liposolubility, stability of labelling, and pharmacokinetic properties: nonspecific binding, metabolization and organ biodistribution of peptides in animal model, were studied. These results indicate which peptide may be a suitable candidate for targeting trials.