



HAL
open science

NOUVEAUX RADIOTRACEURS PEPTIDIQUES POUR L'IMAGERIE NUCLEAIRE Radiomarquage, évaluations physico-chimiques et pharmacologiques

Mitra Ahmadi

► **To cite this version:**

Mitra Ahmadi. NOUVEAUX RADIOTRACEURS PEPTIDIQUES POUR L'IMAGERIE NUCLEAIRE Radiomarquage, évaluations physico-chimiques et pharmacologiques. Sciences pharmaceutiques. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00332512

HAL Id: tel-00332512

<https://theses.hal.science/tel-00332512>

Submitted on 11 Feb 2010

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 d'Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

Discipline : Signal et Imagerie en Médecine et Biomédecine

MITRA AHMADI

Le 11 février 2008

**NOUVEAUX RADIOTRACEURS PEPTIDIQUES POUR
L'IMAGERIE NUCLEAIRE**

Radiomarquage, évaluations physico-chimiques et
pharmacologiques

Directeur de thèse : Pr. Daniel FAGRET

Composition du jury :

Mr le Professeur Daniel FAGRET

Mr le Docteur Jean-André-Mathieu TAFANI

Mr le Docteur Didier LEBARS

Mme le Docteur Catherine GHEZZI

Mr le Docteur Roberto PASQUALINI

Mme le Docteur Marie-Dominique DESRUET

Mr le Professeur Pascal DUMY

Mme le Docteur Valérie ARDISSON

Rapporteur

Rapporteur

Remerciement

J'exprime mes profonds remerciements à mon directeur de thèse, le Pr. Daniel FAGRET qui m'a accueillie au sein de son équipe et a accepté de diriger ma thèse.

J'adresse également mes plus sincères remerciements

Aux membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail,

Au Dr, Jean-Paul MATTIEU, qui m'a soutenue, accompagnée et conseillée tout au long de mon travail et sans qui celui-ci n'aurait pas abouti,

Au Dr, Catherine GHEZZI, pour ses conseils et ses encouragements tout au long de ces trois ans.

A l'ensemble des personnes qui m'ont aidée à réaliser de ce travail :

Dr, Marie-Dominique DESRUET pour m'avoir aidée au cours de ces années et surtout pour la rédaction de ce manuscrit.

Valérie ARDISSON pour m'avoir aidé à commencer ce travail

Laurent RIOU et Pascal PERRET pour leurs conseils précieux pendant ma thèse et leurs aides considérables au moment de la correction finale.

J'adresse un remerciement tout particulier, avec toute mon affection et ma reconnaissance, à Lucie Sancey, pour tous ses conseils, sa gentillesse et ses aides précieuses jusqu'aux derniers moments de mes travaux de thèse.

Et à tous les membres de l'équipe INSERM U877 pour leur aide, leur accueil et leur gentillesse : Julien DIMASTROMATTEO, Julien VOLLAIRE, Danièle MARTI-BATLLE, Catherine ARNAUD, Guillaume PONS, Dominique GARIN, Marion HENRI, René BONTRON, Marie-Claire TOUFEKTSIAN et Carolin ROMESTAING.

Egalement : A mon cher Iraj et ma petite Faezeh pour leur soutien et leur amour.

Abréviations

CAM	Cell Adhesion Molecule
CAT	Chloramine-T
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CCM	Chromatographie Couche Mince
DOTA	1,4,7,10- tetraazacyclododecane,1,4,7,10-tetraacetic acid
EGF	Endothelial Growth Factor
HLA	High Lymphocyte Affinity
FGF	Fibroblast Growth Factor
IL2	Interleukine 2
LDL:	Low density lipoprotein
MMP	Métalloprotéase
RAFT	Regioselectivity Adressable Functionalized Template
RGD	Arginine-Glycine-Acide Aspartique
SCGF	Smooth Cell Growth Factor
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
VSMC	vascular smooth muscle cells

Sommaire

Sommaire

INTRODUCTION	11
Introduction générale	12
Les radiopharmaceutiques	15
Radiomarquage des biomolécules	17
I- Sélection d'un isotope	17
II-Le type et l'énergie du rayonnement	17
II-1-Le rayonnement α	17
II-2-Le rayonnement β :	17
II-3-Le rayonnement γ :	17
III-La demi-vie.....	18
IV-Le mode de production	18
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	20
I- TECHNETIUM-99M.....	21
I -1- Chimie du technétium.....	21
I -2- Obtention de Tc-99m.....	22
I -3- Les complexes de technétium	23
I- 4- Types généraux de produits radiopharmaceutiques technétiés	24
I- 5- Stabilité radiochimique des molécules marquées au ^{99m}Tc	26
I- 6- Synthèse des complexes technétiés	26
I- 7- Marquage des peptides et des protéines	27
I- 7- 1-Incorporation directe du ^{99m}Tc	27
I- 7- 2-Incorporation indirecte du ^{99m}Tc	28
I- 8- La chimie de coordination du technétium dans le développement des produits radiopharmaceutiques	29
I- 8-1- L'état d'oxydation Tc (V).....	29
I- 8-2- L'état d'oxydation Tc (III)	30
I- 8-3-L'état d'oxydation Tc (I)	31
I- 9-Ligand bifonctionnel	31
I- 10- Ligands bifonctionnels les plus utilisés	33
I- 10-1- MAG3 et chélates bifonctionnels relatifs	33
I- 10-2- Le chélate bifonctionnel HYNIC	34
I- 10- 3- Le complexe tricarbonyl Tc (I) $(\text{Co})_3^{1+}$	36
I-11-Denticité des complexes technétiés par tricarbonyl.....	37
I- 12-Les dérivés d'histidine pour la formation des complexes tridentés.....	38
I-13-Marquage au technetium-99m par cœur tricarbonyl à partir d'un kit commercial (Isolink[®])	39
I- 14- Conclusion.....	40
II- INDIUM-111	42
II- 1- Indium-111 et l'imagerie	42
II-2- Estimation de biodistribution et détermination dosimétrique d'un radiopharmaceutique marqué à l'^{90}Y à partir de celles de l'^{111}In.....	42
II- 3- Les radiopharmaceutiques de l'indium et la transferrine.....	43
II- 4- Méthodes de marquage	45

II- 4-1- Utilisation d'un chélate préformé	45
II-4-2-La méthode de post-marquage de complexe biomolécule -ligand	45
II-5-Ligands utiles pour la formation des complexes stables de l'Indium-111..	46
II-5-1- Les ligands polyaminopolycarboxylate	46
II-5-2-Les dérivés de pyridoxyle éthylène diamine	48
II-5-3-Les dérivés hydroxyaromatiques éthylène diamines	48
II-5-4-Les ligands macrocycliques	49
II-5-5-Les chélates amino-thiol.....	51
II-6-Macrocycle DOTA	51
II-6-1-Chimie de coordination.....	51
II-6-2-Stabilité des complexes DOTA radiomarqués	52
II-6-3-Intérêt de l'utilisation DOTA par rapport au DTPA et ses limites	53
II-7-Radiopharmaceutiques actuels marqués à l'Indium-111.....	53
II-7-1-Indium- Oxine™ (In-111 oxyquinoline)	54
II-7- 2- L'INDIUM 111- DTPA.....	54
II-7-3-OctreoScan®, indium-111 pentétréotide.....	54
II-7-4-Indium 111 Satumomab Pendetide.....	55
III- IODE-125	56
III-1- PROPRIETES PHYSIQUES ET DOMAINES D'APPLICATION	56
III-1-1- Pureté radiochimique et radionucléidique.....	57
III-1-2- Activité spécifique	58
III-2- Méthodes de radioiodation.....	59
III-3- Substitution nucléophile	60
III-3-1- Général	60
III-3-2- Échange d'halogènes dans les composés aliphatiques	60
III-3-3- Échange d'halogène des composés aromatiques	61
III-4- Substitution électrophile	62
III-4-1- Considération générale.....	62
III-4-2- Réactifs d'oxydation	63
III-4-3- Radioiodation électrophile directe (déprotonation).....	65
III-4-4- Technique de démétallation	65
III-5- Radiomarquage de protéines	65
III-5-1- Radioiodation direct des protéines	65
III-5-2- Radioiodation indirecte par l'intermédiaire des conjugués	68
III-6- Les radiopharmaceutiques iodés	70
III-7- Propriétés pharmaceutiques.....	71
III-7-1- Pureté chimique et radiochimique.....	71
III-7-2- Stabilité <i>in vitro</i> et durée de conservation.....	72
III-7-3- Caractéristiques pharmacologiques	72
III-7-4 Considérations pharmaceutiques.....	73
LES CIBLES	75
I- ANGIOGENESE.....	76
I-1- Formation de nouveaux vaisseaux sanguins	76
I-1-1-Équilibre pro-angiogénique / anti-angiogénique.....	76
I-1-2- Étapes de l'angiogénèse.....	79
I-2- Angiogenèse et cancer	80
I-3- Les intégrines	80
I-4- Intégrines $\alpha_v\beta_3$.....	82
I-4-1-Structure, fonction, et distribution de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	82
I-4-2-Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	82
I-4-3- Ligands endogènes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	84
I-4-4-Ligands synthétiques de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$; Motif RGD.....	84
I-5-Concept de multivalence	86

I-5-1- c-[RGDfK] Dimère	86
I-5-2- c-[RGDfK] tétramère.....	87
I-5-3- Considérations pharmacocinétiques pour le développement de dérivés de RGD	87
I-6-Captation rénale des dérivés de RGD :	89
I-7- RGD et traitement anti-angiogénique	89
I-8- Conclusions :	90
I-9- ANGIOGENESE ET LE PEPTIDE HARP	91
II- LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES ET ATHEROSCLEROSE	95
II-1-Physiopathologie de l'athérosclérose	95
II-1-1-Le dysfonctionnement endothélial	97
II-1-2-Rétention du cholestérol dans intima	98
II-1-3-Formation de LDL oxydées	98
II-1-4-Rôle des monocytes- macrophages.....	99
II-1-5-La dimension immuno-inflammatoire de l'athérosclérose	99
II-1-6-La dimension de l'apoptose	100
II-1-7-Rupture de plaque et formation de thrombus	100
II-2-Les molécules d'adhésions et l'athérosclérose	101
II-3-VCAM-1 et athérosclérose	102
II-4-Imagerie de la plaque d'athérome	103
II-4-1- Les approches en imagerie nucléaire des plaques d'athérome vulnérables.....	104
II-4-2- Imagerie de l'accumulation de lipides dans la plaque d'athérome	105
II-4-3-Imagerie des macrophages et MMPs de la plaque	106
II-4-4-Les cibles alternatives pour l'imagerie de la plaque	107
II-4-5- Le thrombus comme une cible pour l'imagerie nucléaire.....	107
II-5-Conclusion	108
III- LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINE	109
III-1- Le splicéosome et son intérêt dans la recherche thérapeutique sur le lupus	109
III-1-1- Particules snRNP.....	110
III-1-2. Les protéines du splicéosome, cibles de la réponse auto-immune.....	111
III-1-3- La région contenant le motif RNP1 de la protéine U1- 70K est ciblée par les anticorps et les cellules T CD4+ dans le lupus	112
III-2-. Une stratégie thérapeutique basée sur un peptide dans le lupus	113
III-3-. Conclusion	114
PARTIE II : MATERIELS, METHODES ET RESULTATS	116
A- MATERIELS	116
I- Radioprotection	116
II- Les études analytiques	116
II-1- Chromatographie Couche Mince	116
II-2- Chromatographie Liquide Haute Performance.....	117
II-3- Chromatographie liquide	117
III- Mesure de la radioactivité	117
IV- Les peptides	118
IV-1- LES MARQUEURS DE $\alpha_v\beta_3$	119
IV-1-1- Les dérivés RGD :	120
a- Cyclo(-RGDfK-) ou cRGD	120
b- RAFT (c[-RGDfK-]) ₄ ou RAFT-RGD.....	120
c- RAFT (c[-RADfK-]) ₄ ou RAFT-RAD	122
IV-1-2- Le peptide HARP111-124.....	123
IV-2- LES MARQUEURS DE LA PLAQUE D'ATHEROME	123

IV-2-1- Le peptide B2702 et ses dix dérivés	124
a- Le peptide B2702 :	124
b- Les dérivés des peptides B2702 :	124
IV-2-2- Les ligands naturels de VLA-4 : les peptides BOT321 et BOT 337	124
IV-2-3- Le peptide EP070946	125
IV-3- LA THERAPIE DU LUPUS ERYTHEMATEUX : LE PEPTIDE P140	125
V- Les réactifs et les produits chimiques :	126
VI- Les animaux	126
B- METHODES	129
I- MARQUAGE DES ANALOGUES RGD, MARQUEURS DE L'ANGIOGENESE	129
I-1. Marquage au Technétium-99m	129
I-1-1- Étude de la réaction de marquage de cRGD- ^{99m} Tc	131
I-1-2- Etude de la réaction de marquage de RAFT-RGD- ^{99m} Tc.....	132
I-1-3- Etude de la réaction de marquage de RAFT-RAD- ^{99m} Tc.....	133
I-1-4- Propriétés physico-chimiques des dérivés RGD marqués au technetium-99m	134
I-1-5- Etude du métabolisme des complexes technétiés	136
I-1-6- Etude du métabolisme <i>in vivo</i>	138
I-2- Marquage à l'indium-111	139
I-2-1- Définition des paramètres de marquage de RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In.....	139
I-2-2- Evaluations physico-chimiques et biologiques de RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In	141
I-2-3- Evaluation du métabolisme <i>in vivo</i>	143
I-2-4- Evaluation pharmacologique du peptide marqué.....	143
I-2-5- Détermination du produit inconnu détecté dans les reins.....	144
II-RADIOMARQUAGE DE PEPTIDE HARP111-124 ; MARQUEUR DE L'ANGIOGENESE.....	145
II-1-Marquage à l'Iode-125.....	145
II-2-Evaluations physico-chimiques et biologiques du HARP111-124	147
II-3-Etude de biodistribution, imagerie et stabilité <i>in vivo</i> chez la souris nude porteuse de tumeurs MDA-MB231	147
III- MARQUEURS DE LA PLAQUE D'ATHEROME : RADIOMARQUAGE DES ANALOGUES B2702, BOT 321, BOT337 ET EP070946 ;.....	147
III-1-Les peptides B2702 :	148
III-2-Les peptides BOT 321 et BOT 337 (dérivé de VLA4) et EP070946	150
IV- RADIOMARQUAGE DU PEPTIDE P140, UN AGENT THERAPEUTIQUE DE LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINE	151
C- RESULTATS	154
I- MARQUAGE DES ANALOGUES RGD, MARQUEURS DE L'ANGIOGENESE	154
I-1-Marquage au technétium-99m.....	154
I-1-1-Condition de la réaction de marquage de cRGD.....	154
I-1-2- Condition de la réaction de marquage de RAFT-RGD	155
I-1-3- Condition de marquage de RAFT-RAD	157
I-1-4-Propriétés physico-chimiques des dérivés RGD marqués au ^{99m} Tc.....	157
I-1-5-Métabolisme <i>in-vitro</i>	159
I-1-6-Métabolisme <i>in vivo</i>	161
I-2- Marquage à l'indium-111	165
I-2-1- Définition des paramètres de marquage de RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In.....	165
I-2-3- Evaluation du métabolisme <i>in vivo</i>	169
I-2-4-Evaluation pharmacologique du peptide marqué.....	171
I-2-5-Determination du produit inconnu détecté dans les reins.....	172
II-EVALUATION DU PEPTIDE HARP111- 124 ; MARQUEUR DE L'ANGIOGENESE	174

II-1-Marquage à l'Iode-125.....	174
II-2-Evaluations physico-chimiques et biologiques du HARP111-124- ¹²⁵ I.....	175
II-3-Etude de biodistribution, imagerie et stabilité <i>in vivo</i>	175
III- MARQUEURS DE LA PLAQUE D'ATHEROME	177
III-1- Radiomarquage de B2702 et de ses dix dérivés peptidiques au technétium-99m	177
III- 2- Les peptides BOT 321, BOT337 et EP070946	186
IV- RADIOMARQUAGE DU PEPTIDE P140, UN AGENT THERAPEUTIQUE POUR LE LUPUS ERYTHEMATEUX	190
IV -1-Préparation du traceur Iodé	190
IV -1-1-Radioiodation de P140 par l'Iodobeads®	190
IV -1-2-Radioiodation de P140 par la chloramine-T en solution.....	191
IV -2-Propriétés physico chimiques et étude <i>in vitro</i> du traceur Iodé	192
IV -3-Etudes <i>In-vivo</i>	193
PARTIE III : DISCUSSION, CONCLUSION	196
DISCUSSION	197
I- LES MARQUEURS DE L'ANGIOGENESE	198
I-1- les ligands de $\alpha_v\beta_3$	198
I-1-1-Optimisation de la réaction de marquage.....	199
I-1-2-Propriétés physico-chimiques des peptides technétiés :	200
I-1-3-Propriétés pharmacologiques.....	200
I-1-4-Etude biologique et efficacité clinique	201
I-2- le peptide HARP	203
I-2-1-Réaction de marquage et propriétés physico-chimiques :	203
I-2-2- pharmacocinétique :	203
II- LES MARQUEURS DE LA PLAQUE D'ATHEROME	204
II-1-1-Optimisation de la réaction de marquage.....	204
II-1-2-Propriétés pharmacologiques :	205
II-2- Les homologues de VLA-4 (BOT321 et BOT337) et le peptide EP070946	205
II-2-1-Propriétés pharmacologiques :	206
II-2-2-Etude biologique et efficacité préclinique.	206
III- LE PEPTIDE P140 ET LA THERAPIE DU LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINÉ.....	206
III-1-Optimisation de la réaction de marquage et caractéristiques physico-chimiques.....	206
III-2-Etude pharmacocinétiques	207
III-3-Etude biologique et efficacité préclinique	208
CONCLUSION GENERALE.....	209
REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES :.....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
ANNEXES	230

Introduction

Introduction générale

Les possibilités offertes par les applications des traceurs et de la radioactivité en recherche biologique et en médecine ont été l'un des facteurs essentiels du progrès médical au cours du XXe siècle. Des isotopes radioactifs ont permis, à Avery en 1943, de montrer que l'ADN était le support de l'hérédité. Dans les années qui ont suivi, ils ont conduit à l'avènement de la biologie moléculaire avec la détermination du code génétique, la caractérisation des réactions chimiques assurant le fonctionnement cellulaire ou encore la compréhension des mécanismes énergétiques. Par ailleurs, des techniques utilisant la radioactivité élargissent les possibilités de diagnostic pour détecter et mieux guérir les maladies : c'est la médecine nucléaire. Au lieu de faire passer les rayonnements à travers l'ensemble du corps comme dans la radiographie, on introduit dans l'organisme une petite quantité de molécules marquées par un radio-isotope émetteur de rayonnement gamma. Ce traceur reconnaîtra certaines cibles d'intérêt qui seront détectées par une γ -camera. Par remplacement d'un isotope émetteur gamma par un isotope émetteur bêta, un usage thérapeutique sera possible.

Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques de la faculté de médecine de Grenoble dirigé par le Professeur 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 radiopharmaceutiques marqués au technétium-99m, à l'indium-111 ou à l'iode 125; ce travail consiste notamment à étudier les méthodes de marquage et la stabilité de la liaison du traceur à son vecteur, et à observer le devenir du radiopharmaceutique *in vitro* et *in vivo*. Les nouveaux vecteurs étudiés sont : des traceurs de la néoangiogenèse tumorale marqués au technetium-99m, à l'indium-111 et à l'iode-125, des traceurs de la plaque d'athérome vulnérable marqués au technetium-99m et un traceur du lupus érythémateux marqué à l'iode-125.

- Lorsque les cellules tumorales sont inoculées dans un organe avasculaire, elles prolifèrent jusqu'à une taille d'environ 1 mm³, puis stagnent et deviennent 'dormantes'. Lorsqu'elles commencent à se vasculariser, elles prolifèrent donnant

naissance à une tumeur massive et à des 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 présente d'une part un intérêt diagnostique en aidant au suivi clinique et thérapeutique des cancers 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 une inhibition de la prolifération et de la migration cellulaire, l'induction de l'apoptose et la radiothérapie métabolique (Dechantsreiter MA. 1999, Giannis A. 1997, Haubner R. 2001, Van Hagen PM. 2000).

- Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause mondiale de mortalité. 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.

- Le lupus érythémateux disséminé est une maladie auto-immune caractérisée par un trouble sévère de l'immunité avec une perte de la tolérance et un défaut de contrôle des lymphocytes. Le but de ce travail est l'évaluation biologique, la biodistribution et l'imagerie d'un traceur marqué à l'iode. Ce traceur induit la sécrétion de cytokines régulatrices par les cellules issues du sang de patients lupiques et possède une activité immuno régulatrice.

Chacun de ces vecteurs est un petit peptide de quelques kiloDaltons. Le choix d'un peptide comme marqueur potentiel en imagerie médicale repose sur plusieurs avantages : le peptide doit être une molécule de structure simple et facile à synthétiser, 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 doit être peu immunogène et posséder une grande affinité pour son récepteur (Signore A. 2001, Van Hagen PM. 2000).

Ce manuscrit a été représenté en 3 grandes parties :

- Dans une première partie, nous réaliserons un bref descriptif sur les radiopharmaceutiques et les isotopes radioactifs, ensuite nous aborderons les méthodes existantes de marquage au technétium-99m, à l'indium-111 et à l'iode-125 et enfin nous donnerons un aperçu du rôle des vecteurs étudiés et de leur cibles.
- Dans la deuxième partie, matériels, méthodes et résultats, nous préciserons les expériences de marquage, les études de stabilité *in vitro* et *in vivo*, puis l'évaluation biologique des peptides par l'étude de la cinétique sanguine et de la biodistribution de chaque molécule radiomarquée.
- Nous concluons enfin ce travail en faisant ressortir les principaux résultats de ces recherches ainsi que les perspectives futures.

Les radiopharmaceutiques

Les radiopharmaceutiques utilisés en médecine nucléaire sont des médicaments contenant des radionucléides, employés à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. Ces radionucléides peuvent être utilisés soit sous une forme chimique très simple, soit liés à des vecteurs spécifiques d'un organe, d'une fonction physiologique ou d'une pathologie : molécules organiques, analogues de molécules biologiques, anticorps monoclonaux, particules (colloïdes,...), cellules sanguines, etc. Ils se présentent soit sous forme de spécialités pharmaceutiques contenant des radionucléides, livrées prêtes à l'emploi, soit sous forme de préparations radiopharmaceutiques réalisées à partir de trousseaux, précurseurs et générateurs.

Leur spécificité en tant que médicament repose sur plusieurs propriétés :

- ils sont principalement utilisés à des fins diagnostiques mais également à des fins thérapeutiques,
- ils sont souvent administrés en petites quantités,
- la durée d'utilisation du médicament peut être très courte (quelques minutes à quelques jours) en raison de la période physique du radionucléide,
- ils se présentent sous la forme de sources non scellées, destinées à être administrées par voie veineuse ou orale, avec des activités variables selon l'utilisation, l'âge et le poids du patient.

Les actes diagnostiques (ou explorations scintigraphiques) utilisent des émetteurs de rayonnements γ dont l'énergie d'émission est habituellement comprise entre 70 et 511 keV. Leur pouvoir de pénétration élevé permet d'explorer en profondeur l'organisme. Par comptage externe de la radioactivité fixée au niveau d'un organe, il est possible de réaliser des images numérisées, des courbes représentant le transit du médicament radiopharmaceutique dans cet organe, permettant ainsi d'étudier sa morphologie et surtout sa fonctionnalité. La plupart des organes peuvent faire l'objet d'une exploration scintigraphique (squelette, cœur, poumons, cerveau, thyroïde, reins...) ainsi que certaines pathologies (infections, tumeurs...).

Les actes thérapeutiques utilisent des radionucléides de haute énergie (de l'ordre du MeV), les émetteurs β^- , avec pour but l'irradiation spécifique de certains tissus, entraînant le blocage des processus de division cellulaire puis la mort cellulaire. Les

principales pathologies traitées sont les affections thyroïdiennes, les arthrites rhumatoïdes, les douleurs osseuses métastatiques et le cancer.

Les radionucléides les plus fréquemment utilisés sont :

- Le technétium 99m (^{99m}Tc), facilement disponible grâce au générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, qui peut être administré sous forme de pertechnétate de sodium ou fixé sur différents vecteurs pour des actes diagnostiques.
- Les radio-isotopes de l'iode : l'iode 123 et l'iode 125, utilisé pour des actes diagnostiques et l'iode 131, utilisé pour des actes diagnostiques et thérapeutiques.
- D'autres radionucléides, tels que par exemple le thallium 201 pour l'étude de la perfusion myocardique, le chrome 51 pour le marquage des hématies ou l'exploration rénale, l'indium 111 pour l'exploration hématologique, le gallium 67 dans la détection scintigraphique des foyers infectieux, le xénon 133 et le krypton 81m dans l'exploration de la ventilation pulmonaire.

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 et la méthode indirecte utilisant un synthon bifonctionnel capable de fixer l'isotope à une extrémité et la molécule biologiquement active à l'autre.

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

- Simple, avec le moins d'étapes possibles (une ou deux étapes).
- Rapide avec une durée en rapport avec sa demi-vie 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.
- 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.

Radiomarquage des biomolécules

I- Sélection d'un isotope

Les critères de sélection d'un isotope pour une utilisation optimale en médecine nucléaire sont essentiellement dépendants des propriétés nucléaires du radionucléide : le type et l'énergie du rayonnement, la demi-vie, et le mode de production.

II-Le type et l'énergie du rayonnement

Le choix du radionucléide inclus dans un radiopharmaceutique est fonction de son utilisation. Si le but est diagnostique, le radionucléide devra être émetteur des rayonnements pénétrants et peu ionisants pour limiter les risques dosimétriques tout en étant parfaitement détectable par voie externe. Par contre si le but est thérapeutique, c'est le caractère ionisant des rayonnements émis par le radionucléide qui guidera le choix. En effet c'est de la nature et de l'intensité de ce rayonnement qui dépendra la destruction de la cellule cible. Les différents types de rayonnements sont :

II-1-Le rayonnement α est un rayonnement très ionisant avec une énergie délivrée très importante, de l'ordre 6 à 7 Mev sur une courte distance, 50 à 90 μm . Par contre, il est peu pénétrant et est arrêté par une feuille de papier. Son utilisation en médecine nucléaire est très limitée. Un exemple est l'utilisation d'astate-211 dans la thérapie (Zalutsky MR. 2007).

II-2-Le rayonnement β : deux types de rayonnement existent, selon que la particule émise est un électron (β^-) ou un positron (β^+). Le β^- avec une énergie de 2Mev et une distance parcourue de quelque μm à 10 mm est souvent utilisé en thérapie. Les émetteurs β^- les plus utilisés sont l'yttrium-90, le lutétium-177 et le rhénium 186/188. L'émission β^+ est utilisée en imagerie TEP diagnostique. Ces rayonnements interagissent avec les électrons du milieu et donnent deux photons γ de 511 Kev.

II-3-Le rayonnement γ : les rayonnements γ sont constitués par des ondes électromagnétiques d'énergie très variable. Ils sont très pénétrants et peuvent

traverser des épaisseurs importantes de matière. A cause de ce caractère, les émissions γ peuvent être détectées par la caméra et sont donc utilisées en médecine nucléaire diagnostique. L'émission optimale pour les caméras actuelles se situe autour de 150 Kev (de 70 à 500 Kev).

III-La demi-vie

La demi-vie d'un isotope (le temps au bout duquel la radioactivité a diminué de moitié) doit être en relation avec la biodistribution de la molécule biologique (vecteur) à laquelle elle est associée et donc à la demi-vie biologique du radioligand. La demi-vie physique du radionucléide doit être suffisamment longue pour lui permettre d'atteindre sa cible, et suffisamment courte afin de limiter l'irradiation de l'organisme. En outre, si la fixation du radiotraceur sur la cible est spécifique, on préfère un isotope avec un demi-vie plus longue (par exemple : l'indium-111 à la place du technétium-99m).

De plus, la demi-vie détermine la possibilité d'utilisation d'un radionucléide à distance du lieu de sa production. Plus la valeur de demi-vie est courte, plus le rendement de production doit être élevé pour compenser la perte de radioactivité due à la décroissance.

IV-Le mode de production

La sélection d'un radionucléide résulte d'un compromis entre ses caractéristiques nucléaires mais aussi sa disponibilité et son prix de revient qui découle de sa polyvalence d'utilisation.

Les isotopes couramment utilisés en médecine nucléaire sont produits à partir de cyclotrons (tel que ^{123}I), de réacteurs nucléaires (^{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.

En conclusion, et pour une utilisation en imagerie :

- 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 6-8 heures et 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 être pur 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 de molécules marquées avec un émetteur α est en cours de développement.

Partie I :
Revue Bibliographique

I- Technétium-99m

La capacité d'incorporer des radionucléides facilement disponibles avec des caractéristiques nucléaires optimales aux molécules de traceur a été la première considération du développement des radiopharmaceutiques à visée diagnostique. À cet égard, le technétium-99m est devenu le radionucléide le plus utilisé pour la médecine nucléaire diagnostique et est employé pour la majorité des scintigraphies réalisées tous les ans dans les hôpitaux (Banerjee SR. 2005). Cette utilisation préférentielle des radiopharmaceutiques technétiés est due aux propriétés nucléaires idéales de l'isotope, aussi bien qu'à la disponibilité du générateur pour sa production. Le ^{99m}Tc émet un rayonnement γ de 140 keV qui est optimal pour l'imagerie avec les gamma caméras actuelles. L'absence de rayonnement β permet l'injection d'activité de plus de 1100 MBq (~30 mCi) compatible avec une faible dosimétrie au patient (Schwochau K, 1994). La demi vie de 6,023 heures est suffisamment longue pour la préparation pharmaceutique et l'accumulation *in vivo* dans le tissu cible, mais pourtant assez courte pour réduire au minimum la dose de rayonnement au patient. Par ailleurs, la disponibilité de l'isomère ^{99}Tc considéré comme stable permet le développement de la chimie de coordination du technétium (Bandoli G. 2001). Cependant, un inconvénient de la chimie du technétium est que le métal, à la différence de l'iode-123 ou du fluor-18, ne peut pas directement substituer un atome d'hydrogène d'une biomolécule, de même qu'il ne peut remplacer d'autres constituants des biomolécules, tels que le carbone, l'azote ou l'oxygène. En conséquence, la conception des agents d'imagerie exige en général le développement considérable de la chimie de coordination du radiométal.

I -1- Chimie du technétium

Le technétium, élément 43 du tableau périodique, est placé dans le groupe VIIB, dans la deuxième série des métaux de transition. Il possède sept électrons « s » et « d » sur la couche de valence $\{[\text{Kr}] 4d^5 5s^2\}$. En solution aqueuse, le degré d'oxydation peut varier de -I à VII mais seuls les états d'oxydation VII, IV et III sont stables en présence d'eau. Les autres degrés d'oxydation ne sont stabilisés que par la présence de ligands autres que H_2O .

La seule forme chimique commerciale du technétium est l'ion pertechnétate, TcO_4^- (à l'échelle de traces ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) et au niveau pondéral (^{99}Tc)) ; toute la chimie de ce métal de transition artificiel s'organiserà donc à partir de cet ion (degré d'oxydation : +VII).

I -2- Obtention de Tc-99m

Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ est produit par un générateur de molybdène ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$) permettant l'obtention de technétium quotidiennement et pour un coût limité. Il est issu de la décroissance radioactive de ^{99}Mo (figure1), lui-même obtenu par fission de l'uranium-235 ou par réaction nucléaire du ^{98}Mo (n,γ).

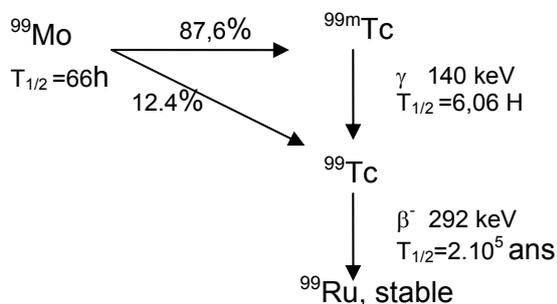


Figure 1 : Schéma de décroissance du Molybdène 99.

En pratique, un générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (figure 2) est constitué par une colonne d'alumine sur laquelle est adsorbé très fortement le molybdate polymérisé [$(^{99}\text{Mo}_7\text{O}_{24})^{6-}$]. Après la désintégration, le pertechnétate (TcO_4^-) formé se désolidarise du polymère et peut être facilement élué de la colonne par une solution aqueuse stérile de chlorure de sodium (0.9%) alors que les polymères de l'ion molybdate sont retenus sur la colonne. Ce système stérile est protégé par du plomb pour la radioprotection (Comet. M et Vidal. M, 1998)

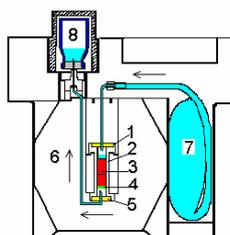


Figure 2: Le générateur molybdène 99 –technétium 99m

- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| 1. capsule métallique | 5. Capsule métallique |
| 2. colonne de verre | 6. Blindage de plomb |
| 3. alumine | 7. Soluté physiologique |
| 4. filtre | 8. flacon d'éluion |

I -3- Les complexes de technétium

Définition : Un complexe est une espèce chimique formée par l'association d'un atome ou d'un ion central métallique (technétium) avec un ou plusieurs ligands. Il possède des propriétés bien définies souvent très différentes de celles des entités qui le constituent.

Les ligands peuvent être des atomes, des ions ou des molécules. Ils sont directement liés au centre métallique et donc situés dans la sphère de coordination du métal. Ce complexe peut également être considéré comme la combinaison d'un acide (centre métallique) qui constitue l'atome accepteur et d'une ou plusieurs bases (ligands) qui sont les atomes donneurs.

Charge du complexe : Le complexe peut être neutre, anionique ou cationique. Dans les deux derniers cas, des contre ions situés hors de la sphère de coordination assurent l'électroneutralité de l'ensemble. La charge des complexes dépend bien évidemment de leurs différents pKa, de la charge du cœur et éventuellement du pH imposé à la solution dans le cas des complexes susceptibles de conduire à des équilibres acide- base.

Nombre de coordination : Le nombre de coordination représente le nombre d'atomes directement liés au centre métallique. Ce nombre peut théoriquement varier de 1 à 12 mais la plupart sont en 2, 4, 5 et 6.

Denticité : Les termes unidenté, bidenté, tridenté, tétradenté,... sont employés pour indiquer le nombre de groupes donneurs d'un ligand liés au métal. Un ligand qui forme une liaison avec l'atome central est dit unidenté, bidenté lorsqu'il donne 2 liaisons. Il peut ainsi former jusqu'à 6 liaisons ; il est alors hexadenté. Au moins deux liaisons doivent être employées par le ligand pour former un « chélate ».

Degré d'oxydation : En solution aqueuse, le degré d'oxydation du technétium peut varier de VII à I. Les ligands durs (petits, peu polarisables, petite charge négative), qui stabilisent les formes acides dures du métal, ont des degrés d'oxydations élevés. A l'inverse, les ligands mous (grands et polarisables) complexent préférentiellement les degrés d'oxydation inférieurs.

I- 4- Types généraux de produits radiopharmaceutiques technétiés

Des produits radiopharmaceutiques technétiés peuvent être choisis selon le devenir biologique du complexe :

- (i) un complexe métallique très stable, qui n'est pas lié à une biomolécule spécifique et possède les propriétés biologiques « technétium essentiel », et
- (ii) les complexes métalliques liés à une biomolécule spécifique « technétium non essentiel ».

Conceptuellement, pour « Tc-essentiel », l'atome de Tc complète le vecteur. Le technétium donne un caractère physico-chimique particulier à la molécule, qui augmente ou dicte efficacement la localisation ou le destin biologique du composé. Un exemple typique et largement appliqué pour certains composés radiopharmaceutiques est le rôle du coeur de Tc^{1+} dans les complexes de type hexakis 2-méthoxy-2-méthyl-isonitrile $[Tc(CNR)_6]^{1+}$ (Prats E. 1999), où le métal rend le complexe final mono cationique et ses préférences de coordination permettent à plusieurs ligands isonitriles de se lier, formant une sphère de coordination externe fortement lipophile. La combinaison d'une charge cationique et une lipophilie permet à cette molécule d'être captée par le myocarde et d'être utilisée comme agent de la perfusion myocardique en pratique clinique. De même, on peut mesurer le débit sanguin cérébral par Tc-HMPAO (Ceretek, Amersham) (Leonard JP. 1986), qui est une espèce lipophile et suffisamment compacte capable de passer la barrière hématoencéphalique. Il est à noter que pour développer un agent technétium-essentiel, (comme tous les autres radiopharmaceutiques), on doit isoler le complexe final afin d'évaluer chaque nouvelle modification de ligand.

Dans le cas de Tc-non essentiel, l'atome de Tc est ajouté au vecteur. Ces complexes peuvent être décrits comme des composés dont l'affinité particulière pour une cible biologique ne dépend pas principalement de l'inclusion de l'atome de technétium. Par exemple, des composés biologiquement actifs tels que les peptides chimiotactiques peuvent être préparés en tant que « technétium - non essentiels » car ils se lient à une cible avec ou sans l'inclusion du métal (Hoepping A. 1999). D'autres exemples sont les analogues du tropane, tels que TRODAT, qui possède un phényltropane responsable d'une liaison aux protéines spécifiques des transporteurs de monoamine. Il existe un risque significatif de préparer et d'analyser un grand nombre de ligands sans évaluer l'influence du métal sur l'interaction entre la biomolécule et

sa cible. En outre, il y a des barrières *in vivo* difficiles à franchir. Les barrières physiques, telles que la barrière hématoencéphalique, peuvent empêcher des complexes de technétium d'atteindre leurs protéines spécifiques telles que le transporteur de la dopamine, indépendamment de leur affinité qui peut être grande, ce qui de ce fait limite leur utilité (Hoepping A.1999).

A l'origine, la plupart des composés de la deuxième classe des produits radiopharmaceutiques (Tc-non essentiel) étaient marqués avec des isotopes de l'iode et rarement avec des métaux de transition tels que le ^{99m}Tc ou le ^{188}Re . En raison de la disponibilité et de l'utilisation courante du Tc-99m, des biomolécules iodées devraient être substituées par les composés marqués au ^{99m}Tc pour le diagnostique ou au ^{188}Re pour la thérapie. Néanmoins, le complexe technétié est beaucoup plus grand qu'un atome simple comme l'iode. L'interférence entre l'activité biologique et les propriétés physico-chimiques de la biomolécule augmente de manière significative avec la taille du complexe marqué. Le complexe métallique devrait donc être le plus petit possible et ses propriétés physico-chimiques (comme l'hydrophilie) devraient adopter celles des biomolécules.

Indépendamment de ces conditions chimiques, un certain nombre d'autres considérations devraient être prises en compte pour employer les produits radiopharmaceutiques en clinique. Ainsi :

- (i) La préparation doit être effectuée en solution saline NaCl 0.9%, dans l'eau ou dans un tampon aqueux compatible avec une injection chez l'homme ;
- (ii) La pureté finale doit être supérieure à 95% et aucune purification ne doit être nécessaire (les concentrations en biomolécules sont extrêmement basses pendant la préparation);
- (iii) La durée de marquage (en fonction de la demi-vie du radionucléide) ne devrait pas être trop longue (< 60 minutes dans le cas de ^{99m}Tc).

Fonctionnellement, les produits radiopharmaceutiques peuvent être classés en deux grandes catégories : (i) les produits dont la distribution biologique est strictement déterminée par la perfusion sanguine, la filtration glomérulaires, la phagocytose, l'élimination par hépatocyte et l'absorption dans l'os (souvent technétium essentiel) ; et (ii) ceux dont la distribution est déterminée par des interactions spécifiques avec des protéines (type enzyme-substrat ou ligand-récepteur) (Banerjee SR 2005)

I- 5- Stabilité radiochimique des molécules marquées au ^{99m}Tc

Dans le cas des radiopharmaceutiques technétiés, il faut s'assurer que le métal de technétium est coordonné au vecteur de manière stable et sans gêner l'interaction avec sa cible. Comme discuté ci-dessous, la stabilité *in vivo* des complexes de technétium est un problème pour les radiopharmaciens et les médecins nucléaire, car la dissociation du radiométal du vecteur entraîne la diminution de la qualité d'image, une exposition inutile du patient aux radiations et une interprétation des images sujette à caution.

L'utilisation de radiotraceurs pour la préparation de complexes utilisés pour la mesure de l'expression d'un récepteur, d'un antigène, et ou d'une enzyme, exige que le complexe reste intact pendant la durée de l'observation ou du traitement.

I- 6- Synthèse des complexes technétiés

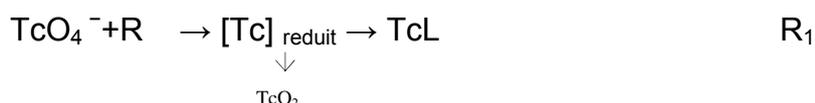
La synthèse des complexes technétiés implique habituellement trois composants : pertechnétate (TcO_4^-), un réducteur (R) et un ligand (L).

L'une des caractéristiques du technétium est sa chimie redox riche et diverse. Puisqu'il n'y a pas de possibilité d'attacher l'anion $^{99m}\text{TcO}_4^-$ aux biomolécules, le degré d'oxydation du ^{99m}Tc doit être inférieur à 7. L'état d'oxydation du ^{99m}Tc réduit dépend de l'agent réducteur, du chélateur, et des conditions de réaction. La chimie riche et diverse rend difficile la détermination exacte de l'état d'oxydation. En même temps, elle fournit également des occasions de structures modifiées et des propriétés des complexes de ^{99m}Tc par le choix des chélateurs, en utilisant des atomes donneurs, aussi bien que les groupes fonctionnels non donneurs.

Les réducteurs : Les agents réducteurs communs sont des sels métalliques tels que le Sn (II), le Fe (II), le Cu (I) ainsi que les agents réducteurs non métalliques tels que le dithionite, le borohydrure de sodium, l'acide sulfonique formamidine (thiourea dioxide) et l'hydrazine. Tous peuvent donner 1 ou 2 électrons. Dans certains cas, le ligand peut également être réducteur comme les phosphines seules ou conjuguées avec d'autres ligands. Dans beaucoup de cas la réduction (comme dans le cas de Sn(II) ou phosphine) peut être caractérisée par une réaction d'élimination de l'oxygène.

Lors de la formation d'un complexe de Tc-99m, le pertechnétate est probablement le premier réduit en espèces métastables (R1) qui sont alors stabilisées par le ligand. Si le ligand ne forme pas un complexe suffisamment fort avec le ^{99m}Tc ou si la réaction de complexation est lente comparée au taux de réduction, il existe le risque de dégrader la forme réduite du ^{99m}Tc à une forme thermodynamiquement stable et relativement non-réactive, le TcO_2 (technétium réduit et hydrolysé).

Si le ligand d'intérêt ne réagit pas assez rapidement avec les espèces réduites du ^{99m}Tc , il est parfois possible de former un complexe intermédiaire avec un ligand faible (L'). Ce ligand est alors déplacé dans une réaction d'échange par le ligand de choix L (R2). Le ligand L' est désigné généralement sous le nom d'un ligand de transfert. Les exemples de ligands de transfert incluent des hydrates de carbone tels que le glucohéptonate et le tartrate et les donateurs simples de l'oxygène tels que l'éthylène glycol.



R: réducteur, **L:** ligand

I- 7- Marquage des peptides et des protéines

I- 7- 1-Incorporation directe du ^{99m}Tc



X : oxygène

Le radiomarquage direct apparaît comme étant une méthode idéale pour l'élaboration d'un radiopharmaceutique sous forme de trousse ; il assure une stérilité et des conditions apyrogènes du produit radiomarqué en mettant en œuvre un protocole rapide et simple pouvant être utilisé dans les services de médecine nucléaire, surtout dans le domaine de l'immunoscintigraphie.

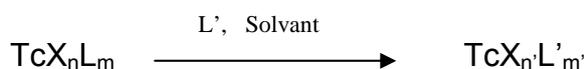
Cette méthode de complexation implique les groupements chélatants libres des chaînes latérales des acides aminés présents au sein de la protéine. La détermination de la nature du site de la liaison du métal à la macromolécule est

difficile à cerner à cause de l'existence d'une grande variété de protéines et de leur complexité structurale. –SH et les autres groupes basiques résiduels de la protéine comme –NH₂ jouent un rôle déterminant dans la complexation directe.

Le solvant retenu est H₂O pour les ligands hydrophiles et alcool/H₂O pour les ligands plus lipophiles. Les réducteurs généralement utilisés sont l'étain stanneux sous forme chlorure en milieu acide et sous forme de tartrate et pyrophosphate en milieu basique.

I- 7- 2-Incorporation indirecte du ^{99m}Tc

En appliquant la méthode directe, seule les substrats comportant des groupements thiols libres, souvent générés par réduction des ponts disulfures, conduisent à des complexes technétiés relativement stables. Afin d'élargir le domaine d'application du marquage de molécules d'intérêt biologique par le technétium 99m, une deuxième voie est développée qui consiste à radiomarquer par l'intermédiaire d'un ligand bifonctionnel.



L'utilisation du ligand bifonctionnel offre une stratégie pour lier le cation radioactif métallique aux macromolécules. Le choix de ligands bifonctionnels efficaces exige le choix d'une stratégie pour assembler le complexe métal-ligand bifonctionnel-biomolécule. Le ligand bifonctionnel possède deux sites : l'un pour lier le radionucléide métallique sans dissociation *in vivo*, et l'autre pour assurer la liaison à la biomolécule en gardant une intégrité maximale. Ainsi, la partie qui chélate le technétium doit posséder la plus grande stabilité cinétique possible en conditions biologiques, alors que l'autre partie du chélate bifonctionnel permet un attachement covalent à la molécule biologique. En outre, les chélateurs bifonctionnels pour les protéines doivent être capables de conjugaison dans des conditions douces et aqueuses proche du pH physiologique.

Le développement des radiopharmaceutiques et l'évaluation de leurs propriétés et efficacité potentielle exigent une appréciation de la chimie fondamentale de coordination du technétium.

I- 8- La chimie de coordination du technétium dans le développement des produits radiopharmaceutiques

Il existe des composés correspondant à tous les états d'oxydation du technétium depuis le degré -I au degré +VII (Blower PJ. 1999). Les états d'oxydation les plus stables et facilement accessibles (V,III et I) sont souvent caractérisés par les structures chimiques des cœurs, qui peuvent accepter différents ligands pour le développement des radiopharmaceutiques.

I- 8-1- L'état d'oxydation Tc (V)

Le degré d'oxydation V est l'un des plus importants de la chimie de coordination du technétium. Les cœurs les plus représentatifs de cet état d'oxydation sont l'oxo technétium TcO^{3+} , le dioxotechnetium TcO_2^+ et le nitruro technétium TcN^{2+} .

- Le cœur TcO^{3+} 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 pentacoordonné. Ce cœur est stabilisé par les ligands donneurs de thiolate et également par des ligands d'alkoxide.

Le radiopharmaceutique le plus connu avec ce cœur technétié est l'examétazine (HMPAO ou PnAO) Ceretec[®] utilisé pour la scintigraphie cérébrale ou le marquage des polynucléaires neutrophiles.

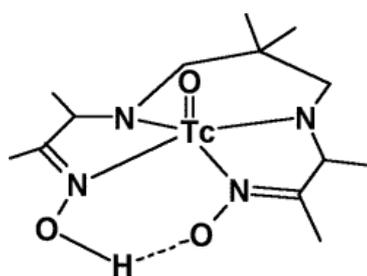


Figure 3 : Structure du complexe HMPAO-^{99m}Tc à cœur de technétium $[TcO]^{3+}$

Tandis que le cœur TcO^{3+} est stable et accessible par la réduction du TcO_4^- , la formation inévitable des isomères avec le ligand de type $N_xS_{(4-x)}$, avec changement dans leurs propriétés pharmacocinétiques, a gêné l'application de tels réactifs et a mené à la considération d'autres ligands.

Dans le développement des produits radiopharmaceutiques cible-spécifiques, un autre inconvénient important dans l'utilisation des complexes $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}]^{3+}$ est la concentration élevée en ligand nécessaire pour la stabilisation de l'état d'oxydation au degré (+V) du $^{99\text{m}}\text{Tc}$, résultant en une activité spécifique moins élevée.

- Le cœur $[\text{TcO}_2]^+$ se forme essentiellement en milieu basique. Les ligands sont soit des ligands -CN, phosphines, pyridine, soit des ligands bidentés (amine) ou tétradentés (cyclam) (figure 4).

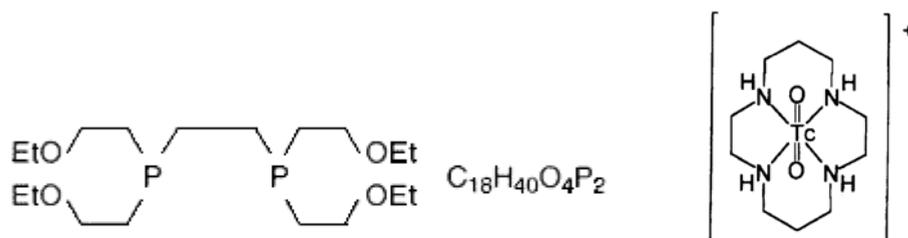


Figure 4 : Ligands à cœur $[\text{TcO}_2]^+$. A gauche le ligand phosphine Tetrofosmin [6,9-bis (2-ethoxyethyl)-3,12-dioxa-6,9-diphosphatetradecane (Myoview®), à droite un ligand amine tétradenté (cyclam).

- 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 la difficulté de préparation en milieu stérile et de leur faible stabilité en milieu aqueux. Parmi les cœurs nitruro technétium, on peut citer le $\text{NOET-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ qui est un traceur de la perfusion myocardique et l' $\text{HYNIC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ qui est utilisé comme synthon bifonctionnel. Aucun de ces deux traceurs n'est utilisé en routine clinique.

I- 8-2- L'état d'oxydation Tc (III)

Le technétium au degré d'oxydation III peut être stabilisé par les ligands arsines, phosphines, acétylacétonate, thiourée et anions aminocarboxylates (EDTA, DTPA, ...) dans des composés hexacoordonnés. Il existe également quelques composés heptacoordonnés comme le TcCl_3 (diméthyleglycoximate)₃.

I- 8-3-L'état d'oxydation Tc (I)

Les degrés d'oxydation bas des complexes organométalliques de Tc ont suscité peu d'attention jusqu'à l'étude de Trop et al. (1980) qui décrit un complexe très stable et hydrosoluble $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{MIBI})_6]^+$ utilisé comme agent de perfusion myocardique. Dans l'objectif de développer de nouveaux précurseurs organométalliques pour des applications radiopharmaceutiques, Alberto et al ont développé une méthode facile à l'intermédiaire $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ du permétalate MO_4^- , sous la pression atmosphérique de la monoxyde de carbone (CO) et d'exploiter un agent réducteur tel que NaBH_4 ou le borano-carbonate (Alberto R. 1998,99, Egli A. 1999, Waibei R. 1999). Ces complexes sont hydrosolubles et les molécules d'eau subissent l'échange de ligand. Puisque le Tc (I) en présence des ligands carbonyliques possède la configuration électronique de spin d^6 , les complexes basés sur le cœur $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^{1+}$ sont cinétiquement inertes et présentent donc un intérêt particulier pour le développement de nouveaux radiopharmaceutiques.

Les premières études avec l'intermédiaire $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ ont démontré un marquage efficace des protéines par l'histidine, qui présente une coordination bidentée (Pak JK. 2003). Des peptides préparés avec de l'histidine en position N-terminale ont déjà été décrits pour se lier au $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ avec un bon rendement (Waibei R. 1999). Plus tard, une recherche sur l'influence de la denticité des ligands sur la stabilité des complexes de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et sur leur comportement *in vivo* ont suggéré que les chélateurs bidentés sont moins stables avec les molécules biologiques telles que l'histidine ou la cystéine par rapport aux ligands tridentés (Schibli R. 2000). En outre, il a été démontré que les ligands aqueux de $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ sont facilement substitués par des ligands tridentés contenant l'amine comme les ligands donneurs N-heterocyclo aromatiques et/ou carboxyliques pour produire des complexes basés sur le cœur $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^{1+}$ (Pak JK. 2003).

I- 9-Ligands bifonctionnels (LBF)

Le ligand bifonctionnel (figure5) comporte une fonction réactive permettant de coupler le métal à un vecteur biologique possédant des propriétés de reconnaissance d'une cible biologique donnée. Une partie importante de ce ligand est réservée à la conjugaison de ce complexe à des biomolécules (peptides, protéines, anticorps, oligonucléotides, sucres) permettant au métal (conjugué à

l'autre partie du complexe), de s'accumuler spécifiquement et significativement au niveau d'une cible biologique (protéine, cellule, tissu).

La modification des propriétés pharmacocinétiques des radiopharmaceutiques peut être faite par modification chimique du chélate ou utilisation d'un modificateur pharmacocinétique (MPC). Par exemple, l'addition d'une chaîne métabolisable peut faciliter l'élimination de l'isotope.

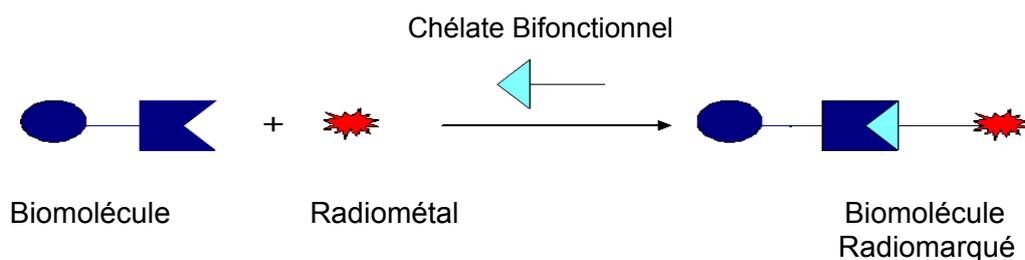


Figure 5: Schéma général d'un chélate bifonctionnel

Dans l'approche ligand bifonctionnel, le technétium doit être le plus loin possible du motif spécifique de la cible biologique pour réduire au minimum l'influence du chélate de technétium dans la liaison du vecteur à sa cible.

Un ligand bifonctionnel idéal doit remplir plusieurs conditions:

- Il doit former un chélate avec une stabilité thermo-dynamique et une inertie cinétique élevées dans des conditions physiologiques. En effet, la décomposition du chélate produit l'ion libre métallique, qui peut être toxique.
- Il doit former un chélate avec un nombre minimum d'isomères. En effet, la formation des isomères peut avoir un impact significatif sur les propriétés biologiques du produit radiopharmaceutique.
- Il doit être hydrophile pour améliorer la clairance sanguine et l'excrétion rénale du chélate.
- Enfin, le ligand bifonctionnel doit pouvoir résister à la radiolyse.

La manière la plus commune d'augmenter la stabilité thermo-dynamique et l'inertie cinétique d'un complexe est d'employer un chélateur de polydentate. La condition de denticité d'un ligand bifonctionnel dépend en grande partie de la préférence de taille et de géométrie de coordination de l'ion métallique.

Le choix de LBF est déterminé par l'état de nature et d'oxydation du radiométal.

I- 10- Ligands bifonctionnels les plus utilisés

I- 10-1- MAG3 et chélates bifonctionnels relatifs

Le complexe de ^{99m}Tc (V) O du mercaptoacetyltriglycine (MAG_3H_5), $[\text{TcO}(\text{MAG}_3\text{H})]^-$ (figure 6) a été développé par Fritzberg (1986) comme agent anionique pour l'imagerie des reins. Ce ligand est modifié en ester du S-acétyle MAG3-ethyl contenant un substituant de P-isothiocyanatobenzyl, ou comme ester du S-acétyle MAG3-hydroxysuccinimidyl pour la conjugaison aux biomolécules (Ram S. 1994).

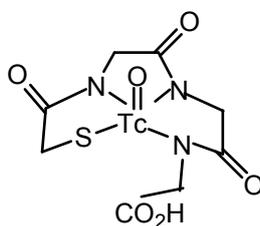


Figure 6 : Schéma de structure de $[\text{TcO}(\text{MAG}_3\text{H})]^-$ (Mertiatide)

MAG_3H_5 est un membre de la famille générale des chélates N_xS_{4-x} (les chélatants N_xS_{4-x} présentent l'avantage d'une plus petite taille et d'une plus grande stabilité), qui est utilisé pour la coordination au cœur $[\text{Tc}(\text{V})\text{O}]^{3+}$ (figure 6). L'autre exemple est le diméthyle glycine-serine-cystéine (RP128), un ligand bifonctionnel qui permet la liaison au Tc et aux peptides (Caveliers V 2001). En outre, le ^{99m}Tc -depreotide est développé pour la détection scintigraphique des tumeurs riches en récepteurs à la somatostatine (Pearson DA. & Lister-james J. 1996). Le développement de plusieurs exemples de cette large famille de chélates était rendu difficile par la formation d'isomères multiples qui diffèrent dans leurs propriétés pharmacocinétiques. En fait, la coordination de ligand MAG3 ne possède aucun centre d'assymétrie (le centre d'assymétrie dirige vers une seule forme géométrique).

Le développement de MAG_3H_5 et de ligands relatifs de $\text{N}_x\text{S}_{(4-x)}$ comme des chélateurs bifonctionnels, continue à être une méthodologie intéressante. La chimie du cœur stable TcO^{3+} est bien développée, et un kit pour la génération in situ de $^{99m}\text{TcO}^{3+}$ est disponible commercialement. Cependant, en dépit d'années de recherches intensives, un certain nombre de problèmes fondamentaux persistent. La formulation chimique du kit est complexe, produisant un mélange de composés de Sn/Tc avec des ligands basés sur des espèces polyhydroxyliques telles que le

mannitol, le glucoheptonate et le tricine. Il est significatif que des molécules composées du cœur TcO^{3+} et de tels ligands aient besoin d'être isolées et structurellement caractérisées. Une complication supplémentaire est la présence des isomères géométriques et/ou optiques des complexes possédant des propriétés pharmacocinétiques différentes. Finalement, même quand la formation de MAG_3 et de chélates similaires propose des réactifs chimiquement bien définis, ceux-ci peuvent être relativement instables *in vivo* (Rusckowski M. 2001).

I- 10-2- Le chélate bifonctionnel HYNIC

Une autre approche de radiomarquage au technétium est fournie par l'HYNIC (Abrams MJ 1990, Schwartz DA 1991). L' HYNIC (figure 7) possède une extrémité acide qui se lie aux groupes nucléophiles (tels que les groupements amines des résidus lysine) des protéines, des polypeptides ou des glycoprotéine ainsi qu'une extrémité hydrazine qui permet la complexation au technétium pour donner un cœur diazotechnétium.

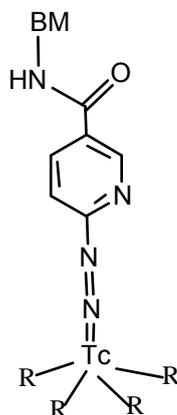


Figure 7 : Structure du complexe ^{99m}Tc -HYNIC- biomolécule (Liu 2004)

Depuis qu'on a rapporté pour la première fois l'utilisation du cœur de $Tc/HYNIC$ pour marquer une IgG polyclonal au ^{99m}Tc par Abrams et al.(1990), cette technologie a été développée pour marquer au ^{99m}Tc des peptides chimiotactiques (Su Z. 2002, Liu S. 2002), des liposomes (Dams E. 1998), des antagonistes au récepteur GPIIb/IIIa (Liu S,1998), des analogues de la somatostatine (Decristoforo C. 2000) et un antagoniste du récepteur à la vitronectine pour l'imagerie tumorale, et a également appliquée à la synthèse générale des peptides développés pour l'imagerie scintigraphique.

Comme précédemment noté, les complexes ^{99m}Tc de HYNIC sont chimiquement stables mais ne sont généralement pas aussi bien définis que la famille du Tc(V)O^{3+} et sont mal caractérisés lorsqu'ils sont utilisés pour le développement d'un traceur.

Puisque l'HYNIC peut seulement occuper un ou deux sites de coordination, un coligand tel que le tricine est nécessaire pour accomplir la sphère de coordination du technétium. L'avantage d'employer l'HYNIC comme ligand bifonctionnel est son efficacité élevée de marquage et le choix des coligands tels que le tricine et le glucoheptonate, qui permet la modification facile de l'hydrophilie et de la pharmacocinétique des biomolécules marquées au ^{99m}Tc . Cependant, l'utilisation de tricine ou du glucoheptonate comme coligands souffre de deux inconvénients principaux :

- 1) Instabilité des complexes binaires de ligand,
- 2) Présence de multiples espèces pour les complexes binaires de ligand en solution, due à différentes modalités de liaison de l'HYNIC et des co-ligands de tricine ou de glucoheptonate.

Récemment, Liu et al (Liu S. 2004) ont employé un système ternaire de ligand pour le marquage au ^{99m}Tc d'une variété de petites biomolécules. Dans cette méthode, trois ligands différents forment avec le ^{99m}Tc les complexes ternaires, [^{99m}Tc – HYNIC- tricine- phosphine (ou des analogues de pyridine)], avec un rendement élevé et une haute activité spécifique. Ces complexes sont extrêmement stables.

En principe cette méthode (utilisation de 2 coligands) peut être appliquée pour toutes les petites biomolécules, exceptées celles qui contiennent un ou plusieurs ponts disulfures. Ces ponts sont souvent essentiels à la conformation cyclique rigide de la biomolécule et au maintien de la haute affinité pour le récepteur. L'utilisation d'une grande quantité de phosphine conjuguée au chauffage à haute température peut détruire les liaisons disulfures et causer des effets indésirables sur les propriétés biologiques de la biomolécule. Le remplacement de la phosphine par un analogue de la pyridine évitera certainement l'utilisation du coligand de phosphine. Cependant, une grande quantité (>10 mg/ mL) du coligand de pyridine doit être employée afin d'obtenir une pureté radiochimique élevée pour le ligand ternaire marqué au ^{99m}Tc . Par conséquent, il est nécessaire de continuer à améliorer le système de chélation, qui n'exige pas l'utilisation d'une grande quantité de coligand de phosphine ou de pyridine.

Plus récemment, Liu et al ont décrit une série des chélateurs HYNIC contenant de la phosphine et du nicotinyll (Purohit S. 2003, 2004). Dans ces chélateurs, la concentration efficace de phosphine ou de pyridine à proximité du technétium est considérablement augmentée. Ceci rend plus facile la formation d'un chélate de ^{99m}Tc macrocyclique.

Des dérivés de HYNIC contenant de la phosphine et du nicotinyll sont potentiellement des ligands bifonctionnels pour le marquage au ^{99m}Tc de petites biomolécules. Cependant, le mode exact de liaison reste peu clair. Des études structurales portant sur les complexes macrocycliques correspondant aideront certainement à comprendre la chimie de coordination associée aux chélateurs de l'HYNIC dans leurs complexes macrocycliques ^{99m}Tc .

I- 10- 3- Le complexe tricarbonyl Tc (I) (Co) $_3^{1+}$

Tandis que le Tc (V) O^{3+} et les divers cœur Tc- organohydrazines sont les sous-unités les plus étudiées pour le développement de radiopharmaceutiques, d'autres géométries de cœur permettent l'introduction d'une nouvelle variété de chélateurs, qui peut influencer la biodistribution, la pureté et la stabilité de la préparation. À cet égard, la nature organométallique du cœur Tc-tricarbonyl est particulièrement intéressante.

Alberto, R (1998, 1999) a développé une voie de synthèse facile dont un intermédiaire est $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, le sel de permetalate, MO_4^- (M=Tc, Re) sous CO avec un agent réducteur tel que NaBH_4 (la réaction n'est pas totalement reproductible sur le radio-traceur ^{188}Re) ; Le cœur Tc (I)- tricarbonyl offre un certain nombre d'avantages pour la conception des nouveaux produits radiopharmaceutiques :

- (i) les complexes sont hydrosolubles et subissent facilement l'échange de ligand,
- (ii) le cœur $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^{1+}$ est chimiquement stable,
- (iii) la nature organométallique du cœur permet la formation de liaisons covalentes,
- (iv) le cœur est lipophile.

Les ligands donneurs adaptés, pour la formation des peptides marqués au ^{99m}Tc

Différents ligands donneurs peuvent être utilisés pour la formation des complexes. Les ligands idéaux doivent contenir une ou plusieurs amines, préférentiellement aromatique N-hétérocycle comme les imidazoles, pyridine et pyrazoles, les amides, amines, et l'acide carboxylique (Liu S. 2004).

Les thioethers, thiolates et N-heterocycles sont de bons ligands pour la liaison au complexe carbonyle de ^{99m}Tc . Ces fonctionnalités correspondent aux chaînes latérales de la méthionine, de la cystéine et de l'histidine et présentent donc un intérêt particulier pour le marquage des peptides. Pour savoir quel acide aminé dans une séquence peptidique permettra la liaison au complexe tricarbonyl, Egli et al (1999) ont étudié les divers acides aminés en différentes concentrations.

La principale conclusion de cette étude est que l'histidine forme des complexes à la concentration de 1 $\mu\text{mol/L}$. La plupart des autres acides aminés ont dû être 1000 fois plus concentrés pour obtenir le complexe correspondant marqué au ^{99m}Tc . La cystéine peut se lier au complexe tricarbonyl à une concentration 10 fois supérieure à celle de l'histidine. Cependant, la forme oxydée de la cystéine, la cystine, qui est la forme la plus commune dans les protéines, n'est pas un bon ligand par rapport à d'autres acides aminés et n'est pas donc un site potentiel pour le marquage.

La méthionine se lie au tricarbonyl, légèrement mieux que les acides aminés avec des chaînes latérales aliphatiques. La différence dans le rendement de marquage entre cystéine et Méthionine suggère que la formation du complexe dépend fortement de la nature des acides aminés environnant, au moins en solution aqueuse.

Ce travail de Egli et al indique que des quantités stochiométriques d'histidine peuvent être appliquées avec la totalité du technétium dans un éluat de générateur. De cette façon, des activités spécifiques de 6 TBq/ μmol (160 Ci/ μmol) ont été atteintes.

I-11-Denticité des complexes technétiés par tricarbonyl

Waibei et al. (1999) ont démontré la capacité du cœur Tc-tricarbonyl à lier des résidus d'histidine dans les protéines et les peptides. L'histidine permet la chélation bidentée et est retrouvée dans un grand nombre de biopolymères naturels. Elle peut également être facilement incorporée aux peptides synthétiques pour faciliter le marquage avec le cœur Tc-tricarbonyl. Cependant, l'addition de l'histidine en bout de chaîne peptidique (en position C- ou N- terminale), permet à l'oxygène du

carboxylate ou à l' α -amine de participer à la coordination bidentée avec le delta N du cycle d'imidazole.

Cependant, dans un peptide, pour un cœur métallique qui est beaucoup plus stable avec la géométrie tridentée, l'histidine offre seulement la coordination bidentée. Schibli et al (Schibli R. 2000) ont étudié l'influence de la denticité sur le devenir biologique d'une série de complexes de ^{99m}Tc -tricarbonyl bidentés et tridentés. Leurs résultats ont indiqué que les complexes ^{99m}Tc -tricarbonyl des ligands bidentés étaient beaucoup plus captés par le foie et les reins par rapport aux complexes tridentés. Ces différences peuvent être liées à la susceptibilité du troisième site non chélaté (H_2O) pour l'échange avec des biomolécules plus réactives *in vivo* permettant au ^{99m}Tc d'être maintenu dans le tissu.

I- 12-Les dérivés d'histidine pour la formation des complexes tridentés

Afin de créer un analogue de l'histidine, l'équipe de Alberto (Pak JK. 2003) ont dérivé l'histidine en présentant un groupe acétyle sur l'amine du cycle imidazole. L'attachement de l'histidine aux peptides par l'intermédiaire du groupe acétyle libérerait le groupe α -amine et le groupe carboxylique pour participer à la chélation tridentée avec le delta N du cycle d'imidazole. Cette approche fournit, théoriquement, une complexation plus stable du cœur Tc-tricarbonyl tridenté (Pak JK. 2003). Cependant, si cette approche fournit un ligand tripodal plus approprié pour la complexation, elle est cependant légèrement limitée en ce qui concerne la synthèse de peptide.

L'utilisation de l'acide aminé du peptide comme chélatant permet de faire le marquage à n'importe quelle position, en se servant d'un acide aminé additionnel ou d'un acide aminé existant qui ne soit pas impliqué dans les propriétés biologiques. En conséquence, on a récemment commencé à développer une famille de chélateurs bifonctionnels pour le cœur Tc $(\text{CO})_3^{1+}$ basée sur les acides aminés ou les analogues synthétiques d'acide aminé, dérivés par le pyridyl, l'imidazol, le thiolate et/ou le carboxylate pour la conjugaison aux petits peptides (Banerjee SR. 2005).

Les petits peptides comme ligands de récepteurs offrent plusieurs avantages par rapport aux anticorps ou à d'autres protéines, une plus grande polyvalence par rapport aux réactifs nécessaires dans une gamme de processus biologiques fondamentaux et des affinités sensiblement plus grandes pour leurs récepteurs ; de

plus, les petits peptides sont facilement préparés et modifiés, sont moins immunogènes et présentent une clairance sanguine rapide.

Récemment, le kit commercial Isolink[®] a été mis au point par la société Mallinckrodt. Ce kit, en présence de pertechnétate, produit un petit complexe technétié, à base de $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, qui est capable de lier un grand nombre de ligands donneurs d'électrons. Dans cette approche, le complexe technétié est très stable et n'est pas facilement oxydable par l'oxygène.

I- 13- Marquage au technetium-99m par cœur tricarbonyl à partir d'un kit commercial (Isolink[®])

Comme précédemment évoqué, le TcO_4^- à l'état d'oxydation VII doit être réduit à l'état I. D'après Alberto et al (2001) le complexe $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ peut être préparé en une seule étape en présence de CO et d'un réducteur soluble et fort mais qui ne se coordine pas avec le technétium réduit. Mais la préparation à partir de monoxyde de carbone gazeux n'est pas possible dans le cadre de l'utilisation d'un kit radiopharmaceutique à visée commerciale. Ainsi le défi était de trouver une source solide d'oxyde de carbone stable à l'air qui puisse en même temps être utilisée comme agent réducteur. Le boranocarbonate ($\text{K}_2\text{BH}_3\text{CO}_2$) a été employé pour réduire le Tc (VII) au Tc (I) et pour produire du CO. (figure8)

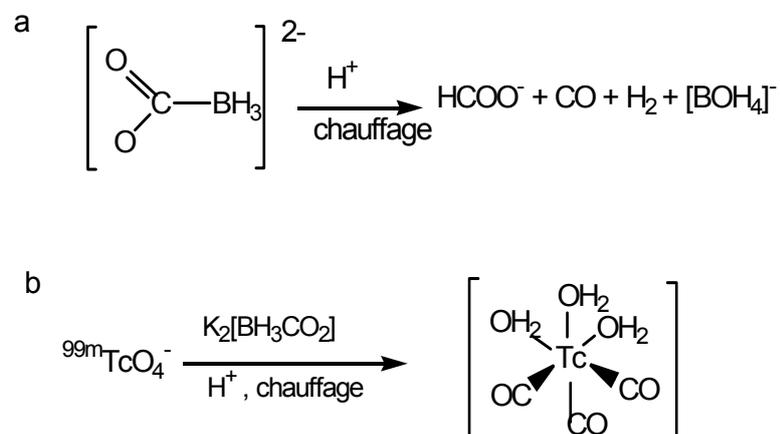


Figure 8: Production de CO en présence de boranocarbonate (a) et production de $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (b) (Alberto R. 2001)

En fait le kit Isolink[®] contient du Na (K) boranocarbonate ($\text{Na}_2(\text{K}_2)\text{BH}_3\text{CO}_2$) comme agent réducteur et producteur de CO, du sodium tetraborate (borax) comme tampon

et du Na-tartrate comme agent complexant qui complexe toutes les espèces de technétium en état d'oxydation intermédiaire.

La solution aqueuse de boranocarbonate est basique (pH>11) et très stable, mais l'addition d'un tampon borate « borax , Na- tetraborate», pH 9.4-10.4 at 25°C, permet d'observer une décomposition à une température de 75-90°C et à pH10.

A l'état d'oxydation I, en milieux 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 précurseur tricarbonyle est stable dans l'eau à pH basique mais il échange rapidement ses molécules d'eau avec une grande variété de ligands donneurs qui sont plus forts que l'eau. La coordination peut être tridenté si les trois sites de l'eau sont échangés. Dans ce cas le complexe sera très stable (figure 9).

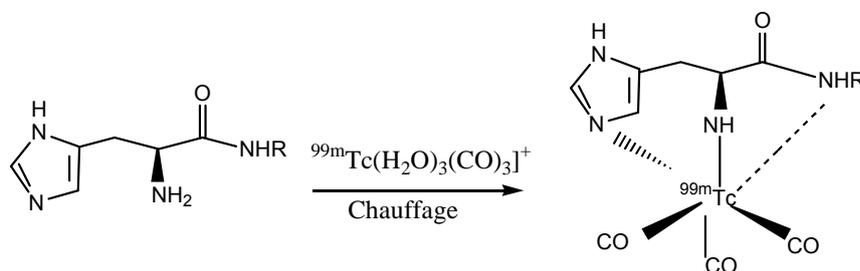


Figure 9 : Réaction de l'histidine avec le complexe $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (Alberto R. 1998)

En dépit de tous les avantages du marquage au ^{99m}Tc par le complexe tricarbonyle, la cinétique de formation est lente, et il est souvent nécessaire de travailler autour de 100°C lors de la complexation du ligand avec $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. Cette réaction n'est pas donc utilisable pour les molécules sensibles à la chaleur.

I- 14- Conclusion

La chimie de coordination du technétium est caractérisée par une gamme d'états d'oxydation accessibles, -I à +VII, aux géométries différentes du cœur, exploitables pour le développement des radiopharmaceutiques. Les plus étudiés jusqu'ici sont le cœur du $[\text{Tc}(\text{V})\text{O}]^{3+}$ et les cœurs Tc-organohydrazino. Le chélate bifonctionnel MAG_3 et les complexes reliés sont représentatifs du cœur $[\text{Tc}(\text{V})\text{O}]^{3+}$ tandis que HYNIC est basé sur la classe Tc-organohydrazine.

La chimie du cœur $[\text{Tc}(\text{V})\text{O}]^{3+}$, offre quelques avantages comme chimie du cœur oxo technétium avec différents chélateurs multidenté appropriés. Ces produit ont été exploités dans le développement des cœurs pour l'imagerie, comme $[\text{TcO}(\text{MAG}_3\text{H}_2)$

et comme agents pour l'imagerie cérébrale de la famille [TcO (TRODAT)]. Cependant, en dépit de ces succès et de la nature bien définie des réactifs basés sur la technologie MAG_3 , cette approche est souvent gênée par l'instabilité des complexes pendant l'imagerie et la présence d'isomères multiples et/ou des variations de la charge du complexe due à la présence de plusieurs sites de protonation.

La voie de HYNIC a été aussi appliquée avec succès dans l'imagerie et semble être une technique souple pour marquer des biomolécules. Cependant, en dépit de la nature stable du cœur Tc-organohydrazino, les complexes sont mal caractérisés au niveau du traceur formé. En outre, la synthèse du conjugué HYNIC-peptide est nécessaire. Cette synthèse ainsi que la chimie de coordination/coligand sont complexes.

Le cœur organométallique de tricarbonyl, $[Tc(CO)_3]^{1+}$, où le Tc est dans l'état d'oxydation +I a été développé pour la préparation des complexes avec une activité spécifique élevée. L'utilisation de ce cœur a été réalisée dans le développement des ligands en imagerie.

Le cœur tricarbonyl possède un spin d^6 et un centre du Tc(I) qui est cinétiquement inerte et offre plus de flexibilité de choix de ligands en terme de taille, de charge et de lipophilicité sans influencer la stabilité thermodynamique. Les trois ligands aqueux facilitent la formation des complexes stables tridentés. Divers ligands contenant de l'azote tels que l'histidine, l'histamine, l'imidazol, l'acide iminodiacétique, le triamine de diéthylène, réagissent avec le précurseur pour former des complexes stables pour l'obtention de radiopharmaceutiques spécifiques d'une cible biologique. Le complexe technétié par l'intermédiaire tricarbonyle est petit et hydrophile, il modifie peu les propriétés physicochimiques et biologiques de la molécule bioactive.

Sa grande stabilité et sa petite taille par rapport aux autres complexes en font un bon candidat pour le marquage de petites molécules.

II- Indium-111

L'indium a été découvert en 1863 par F.Reich et H.T.Richter, grâce à deux raies détectées par spectroscopie ; son nom dérive du latin "indicum" ou indigo à cause de la couleur de ces raies spectrales. L'Indium de numéro atomique 49 est placé dans le groupe IIIA du tableau périodique ; sa configuration électronique est $[\text{Kr}] 4d^{10} 5s^2 5p^1$. La forme ionique la plus répandue en solution aqueuse est In^{3+} . Cependant, à pH supérieur à 4, l'Indium³⁺ s'hydrolyse facilement et produit des formes insolubles. Plusieurs ligands contenant des atomes donneurs d'électrons tels que l'azote, l'oxygène et le soufre lient l'indium (III) avec une forte stabilité.

II- 1- Indium-111 et l'imagerie

L'¹¹¹In ($T_{1/2}=62$ h) est un produit de cyclotron : il se décompose par capture électronique (CE) avec émission de photons gamma de 173 et 247 KeV (89% et 94% respectivement), énergies bien adaptées aux seuils de détection des gamma caméras.

Plusieurs agents d'imagerie marqués à l'¹¹¹In ont été développés à partir de 1970 et sont encore employés aujourd'hui. L'¹¹¹In-DTPA qui avait été utilisé pour l'imagerie rénale et cérébrale est actuellement employé pour l'imagerie du fluide cérébro-spinal (Reichert DE. 1999). Le marquage des globules blancs à l'¹¹¹In (¹¹¹In-oxine) développé en 1970 est toujours utilisé pour l'imagerie de l'infection des tissus mous. La majorité de nouveaux radiopharmaceutiques marqués à l'¹¹¹In sont actuellement des biomolécules telles que des protéines et des peptides. Leurs indications sont la détection de cancers et le ciblage des antigènes et des récepteurs surexprimés dans certaines tumeurs.

II- 2- Estimation de biodistribution et détermination dosimétrique d'un radiopharmaceutique marqué à l'⁹⁰Y à partir de celles de l'¹¹¹In

Les peptides cible-spécifiques marqués à l'yttrium 90 (émetteur β , $T_{1/2}=2,7$ jours) sont employés en tant que radiopharmaceutiques à usage thérapeutique pour le traitement des tumeurs cancéreuses. Du fait de son émission β -pur, l'yttrium-90 est létal pour les cellules, mais il ne peut être détecté par scintigraphie. L'indium-111

présente, comme l'yttrium 90 (group III du tableau périodique, configuration électronique $Kr] 4d^1 5s^2$), une charge ionique de « 3+ », et les demi vies de ces radionucléides sont presque identiques (Heeg MJ. 1999). De ce fait, on peut remplacer, dans un complexe, l'yttrium 90 par de l'indium 111 afin d'estimer la biodistribution et la dosimétrie aux organes de molécules- ^{90}Y avant leur utilisation thérapeutique *in vivo* (Kwekkeboom DJ. 2000, Janssen ML. 2002, Harris TD. 2003, Mark W. 2003).

Malgré toutes les similarités de l' ^{90}Y et de l' ^{111}In , des publications montrent que les propriétés physiques des peptides-chélate-indium-111 peuvent ne pas être exactement identiques à celles des peptides-chélate-yttrium-90. L'étude d'un anticorps lié à DOTA marqué par ^{111}In et ^{90}Y réalisée par Feng et al, a ainsi montré que la captation rénale de ^{90}Y -DOTA-AC était beaucoup plus grande que celle de ^{111}In -DOTA-AC (Feng X. 1998).

II- 3- Les radiopharmaceutiques de l'indium et la transferrine

La transferrine est une glycoprotéine monomérique dont la fonction est la séquestration et le transport du fer. Elle transporte le fer, autrement insoluble, dans les cellules par l'intermédiaire d'un récepteur qui est ensuite endocytosé. Les deux extrémités de la transferrine (généralement désignés sous le nom de N- et de C-) fournissent deux accepteurs distincts pour un ion ferrique. La liaison de Fe^{3+} à chaque extrémité se fait par un groupe carboxylique, qui fournit deux ligands pour la coordination hexagonale de l'ion métallique. En plus du fer, la transferrine se lie à d'autres métaux, parfois avec un rendement élevé.

Harris WR. (2002) a confirmé que plusieurs radio-isotopes ($^{111}\text{In}^{3+}$, $^{67}\text{Ga}^{3+}$ et $^{201}\text{Tl}^{3+}$) peuvent se lier fortement à la transferrine. Les études des nouveaux radiopharmaceutiques marqués à l'Indium ont donc été orientées vers la préparation d'espèces possédant une stabilité de plus en plus grande vis-à-vis des réactions de décomplexation dues à la transferrine, qui reste la molécule la plus souvent incriminée dans ce processus. Une comparaison entre les constantes de complexation de l'Indium-transferrine et de l'Indium-ligand constitue une approche rationnelle dans l'optique d'un développement de tels composés. Reichert DE. (1999) a déterminé les constantes de complexation ainsi que les valeurs de pM de

nombreux cations métalliques (3+) avec la transferrine et des ligands polydentés (tableau1).

Le pM est lié à la concentration en métal libre ; la définition la plus couramment acceptée est la suivante :

$$pM = -\log | M(H_2O)_6 |^{3+}$$

Cette grandeur permet de comparer directement la force de différents ligands vis-à-vis des métaux, en s'affranchissant du nombre de groupes donneurs présents sur le ligand ainsi que de leur pK_a. Cette valeur est déterminée à un pH donné (souvent 7,4) et pour des concentrations totales de 1µM en métal et 10µM en ligand. Plus la valeur pM est élevée, plus le ligand est fort.

Plusieurs possibilités sont offertes au chimiste de coordination, notamment dans la synthèse de nouveaux chélatants de l'indium. A ce titre, il est tout à fait judicieux de s'intéresser aux ligands multidentés qui présentent au moins deux avantages : tout d'abord, ils forment des complexes d'une plus grande stabilité thermodynamique que celle observée avec les analogues mono, bi, voir tridentés, et d'autre part ils sont beaucoup moins sensibles aux effets de dilution qui reste un facteur très important à prendre en compte en médecine nucléaire, du fait de la très faible concentration en radiopharmaceutique utilisé (de l'ordre du nanomolaire).

	[ML/[L]][M]	pM
Transferrine	18.3	18.3
EDTA	24.9	22.1
DTPA	29.0	24.9
PLED	26.5	19
HBPLED	29.0	19.7
DMPLED	21.5	19.7
HBED	28	20.0
THMBED	30.7	21.2
t-butyl-HBED	31.3	18.3
SHBED	29.4	19.2
NOTA	26.2	21.6
DOTA	23.9	17.8
TETA	21.9	16.2
TACN-HB	33.3	16.6

Tableau 1: Valeurs des constantes de stabilité des complexes de l'Indium-111 (Reichert DE. 1999).

La nature et le nombre de donneur constituant un ligand ne sont pas les seuls facteurs conditionnant la constante de stabilité ; l'arrangement spatial de ces

donneurs est aussi un facteur déterminant. Par exemple, dans le cas de la synthèse d'un ligand hexadenté plusieurs arrangements ou topologies sont permis : macrocyclique, macrocyclique avec des bras pendants (linéaires ou ramifiés) ou tripodales. Les variations des valeurs de constante de complexation sont induites par ces différences de topologie.

II- 4- Méthodes de marquage

L'incorporation directe de radionucléide est un processus de marquage difficile à contrôler notamment pour le marquage des petits peptides. Le détail de sa chimie est inconnu, la localisation de l'isotope variable, et peut mener à des changements structurels de la biomolécule. Par contre, l'utilisation d'un ligand bifonctionnel capable à une extrémité de lier le peptide et à l'autre extrémité de fixer l'isotope permet de contrôler la réaction, d'avoir un rendement de radiomarquage élevé et de former des complexes relativement stables et sans endommager la biomolécule.

La distinction entre les méthodes de chélation peut être faite selon l'ordre des étapes utilisées pour synthèse d'un peptide radioactif.

II- 4-1- Utilisation d'un chélate préformé

Cette méthode est basée sur le radiomarquage d'un ligand bifonctionnel suivi de sa conjugaison par une liaison covalente à un peptide. Dans cette approche la chimie du processus est bien définie et facilement contrôlée puisque les étapes de marquage et de conjugaison sont séparées. Cependant, la méthode est longue, et non appropriée à l'usage d'isotopes de courte durée de vie utilisée en imagerie. A cause de ces problèmes, la méthode du chélate préformé est rarement employée pour la synthèse des peptides radioactifs.

II-4-2-La méthode de post-marquage de complexe biomolécule -ligand

La méthode de post-marquage de complexe biomolécule –ligand, approche la plus courante dans la synthèse des produits radiopharmaceutiques, exige la synthèse d'un conjugué ligand -peptide suivie d'une étape de marquage. Dans cette méthode le ligand peut être lié aux extrémités N ou C- terminale, à une chaîne latérale d'un peptide ou même à un carbone de la chaîne peptidique. La méthode post-marquage est caractérisée par une chimie bien définie et une simplicité relative.

II-5-Ligands utiles pour la formation des complexes stables de l'Indium-111

Un grand nombre de ligands bifonctionnels ont été étudiés pour le marquage à l'indium-111. Dans la conception des complexes métalliques radiopharmaceutiques, un facteur important est la stabilité. Elle n'indique pas nécessairement que le complexe est stable *in vivo* ; cependant, elle est employée souvent comme premier critère pour élaborer des produits radiopharmaceutiques.

II-5-1- Les ligands polyaminopolycarboxylate

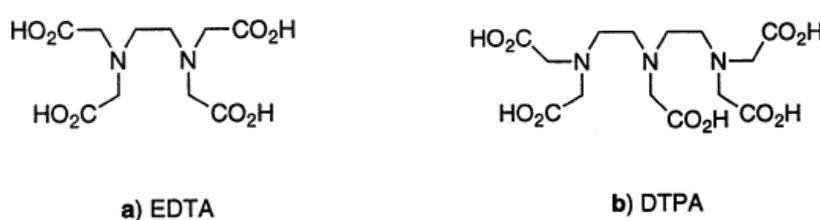


Figure 10 : les ligands polyaminopolycarboxylates

Des ligands classiques du type polyaminopolycarboxylates, EDTA et DTPA (figure 10), forment des complexes stables avec $^{111}\text{In}^{3+}$, avec une configuration octaédrique.

Le DTPA (N-diéthylène triamino pentaacétique acide), un groupe chélatant fort, a été utilisé comme chélate de l'indium mais aussi d'autres radionucléides trivalents (comme ^{90}Y). Il peut être lié à de grandes protéines comme l'albumine et les anticorps, aussi bien qu'à de petits peptides, comme des analogues de la somatostatine.

Les chélates ^{111}In -DTPA forment des complexes octacoordinés, en utilisant chacun des trois azotes et quatre carboxyles, le dernier carboxyle formant une liaison amide avec l'extrémité NH_2 terminal d'un peptide (la huitième position autour du radionucléide est alors occupée par l'oxygène de la fonction amide) (figure 11) (Fichna J. 2003).

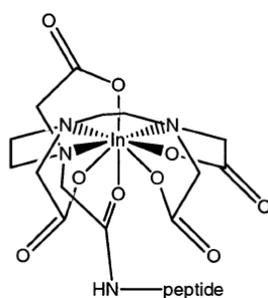


Figure 11 : La structure possible de In^{3+} -DTPA- Peptide

Des dérivés du DTPA sont développés en mettant des substituants sur les carbones liant les azotes, car ceci gêne stériquement la possibilité d'ouverture du cycle chélatant et augmente ainsi la stabilité des complexes.

La première classe des conjugués modifiés du DTPA a été construite par la fixation d'un groupe *p*-isothiocyanatobenzyle sur le groupe éthylène (figure 12a, b). La seconde classe des conjugués modifiés du DTPA a été développée par remplacement d'un des groupes d'éthylène par un groupe cyclohexyle (figure 12c). De telles modifications augmentent la rigidité du DTPA et la stabilité *in vivo* des produits radiopharmaceutiques obtenus (Safavy A. 2002).

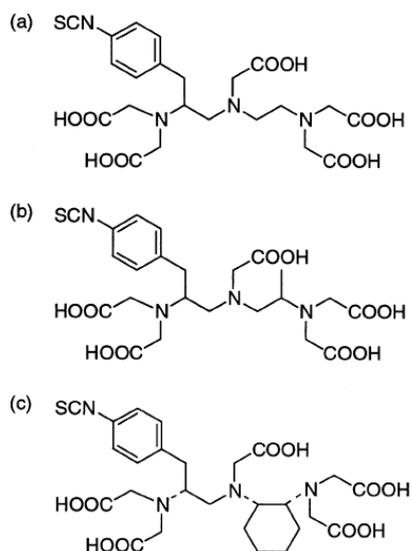


Figure 12: Structure des dérivés de DTPA ;

(a) 2-(*p*-isothiocyanatobenzyl) triaminopentaacétiqueacide

(b) 2-(*p*-isothiocyanatobenzyl)-6-méthyl-diéthylène-triaminopentaacétiqueacide (1B4H DTPA)

(c) 2-(*p*-isothiocyanatobenzyl)-cyclohexyl-diéthylène-triaminopentaacétiqueacide (CHX-DTPA).

butylique HBED) (figure 14d) augmente significativement la captation des chélates de ces ligands avec l' ^{111}In dans le foie chez les rats (Reichert DE. 1999).

EHPG et son dérivé plus lipophile TMPHPG (figure 15) sont aussi des dérivés des ligands hydroxyaromatiques mais les groupes carboxyliques sont placés sur la chaîne hydrocarbonée plutôt que sur l'azote.

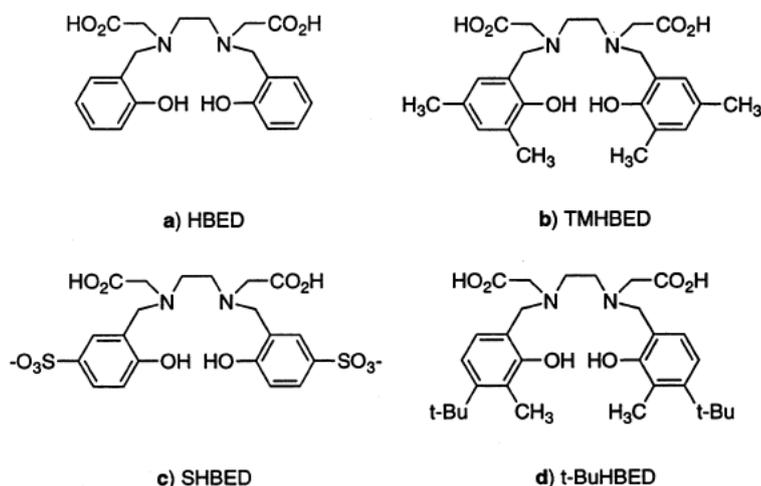


Figure 14 : Les ligands hydroxybenzyléthylène diamide pour la complexation d'Indium-111

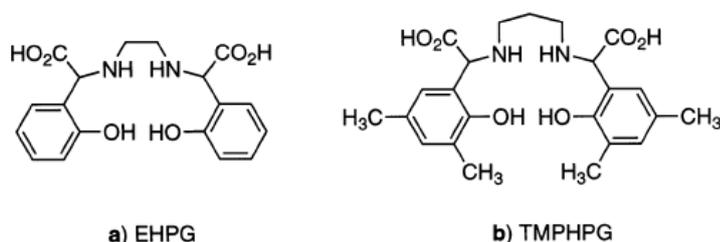


Figure 15 : Les ligands hydroxybenzyléthylène diamide avec des groupements carboxylique situés sur la chaîne hydrocarbonée à la place des amines.

II-5-4-Les ligands macrocycliques

Une autre classe de ligands complexant l' $^{111}\text{In}^{3+}$, qui forment des complexes très stables diversement chargés, est constituée par les chélates macrocycliques contenant les atomes donneurs d'azote et d'oxygène ou d'azote et de soufre. Parmi ceux-ci, on en distingue trois : NOTA, DOTA, et TETA (figure16).

Clarke et Martell ont déterminé les constantes de stabilité des complexes des trois ligands avec l' In^{3+} comme étant dans l'ordre décroissant: NOTA > DOTA > TETA (Clarke ET. 1991,1992).

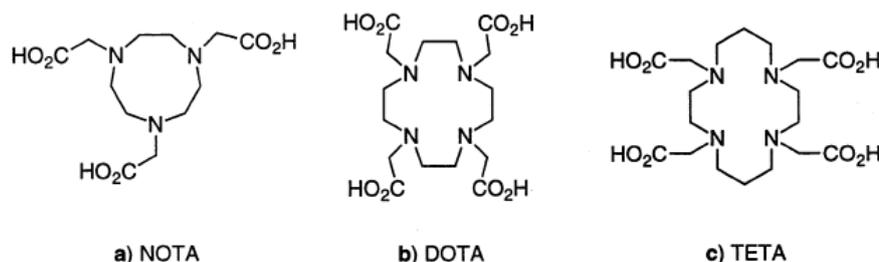


Figure 16 : Les ligands macrocycliques formant des complexes stables avec $^{111}\text{In}^{3+}$.

La forte stabilité des complexes de dérivés du triazacyclononane (TACN) marqués à l' In^{3+} (figure 17a) a mené à la synthèse et à l'évaluation d'un certain nombre d'autres analogues.

MA et al, ont synthétisé un dérivé thiol de TACN (figure 17b). Les constantes de stabilité des complexes de TACN-TM marqué à l' In^{3+} sont considérablement plus élevées que celles des dérivés de NOTA, démontrant une grande affinité de l' In^{3+} pour les ligands contenant les groupements thiols (MA R.1995).

Jones-Wilson et al ont évalué un certain nombre de dérivés différents de TACN (figure 17c-f) possédant des groupes hydroxybenzyl ou hydroxypyridyl sur les azotes. Les complexes de ces nouveaux ligands avec l'indium-111 ont une stabilité plus grande que les complexes précédents : la structure plus rigide des ligands de TACN peuvent y contribuer. *In vivo*, les complexes de hydroxypyridyl-TACN- In^{3+} sont beaucoup moins stables que les dérivés contenant le group de hydroxybenzyl.

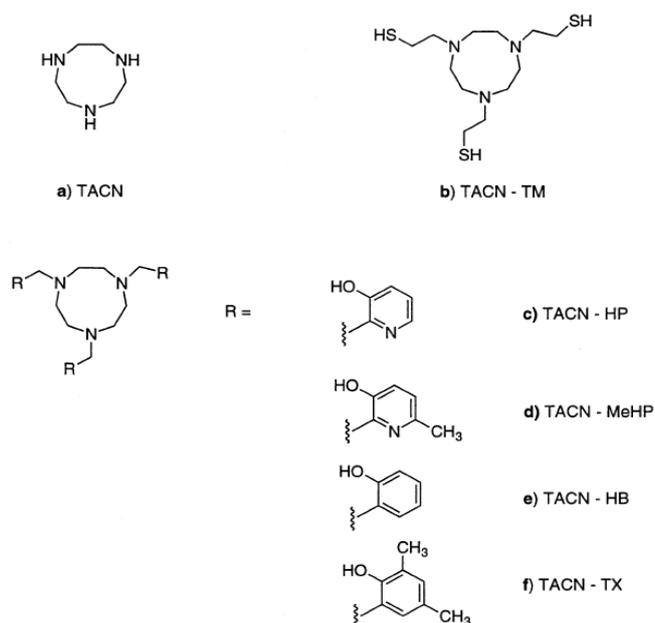


Figure 17 : Triazacyclononane et ses dérivés utilisés comme ligand de l'Indium $^{3+}$

II-5-5-Les chélates amino-thiol

Pour développer des chélates plus stables, Kung et al ont évalué les ligands N_2S_2 tétra coordinant (figure 18) pour l' $^{111}\text{In}^{3+}$ (III) et le ^{67}Ga (III) en tant qu'agents potentiels de l'imagerie myocardique (kung HF. 1990). Cotsyfakis et al (ont rapporté les résultats de synthèses et de biodistributions chez la souris pour une série de dix complexes N_xS_2 de charge positive (figure 18). Le composé b (fig18-b) a montré une bonne captation myocardique.



Compound	X	R	Compound	R''
a	CH_2CH_2	CH_3	f	diethylamine
b	CH_2CH_2	C_2H_5	g	pyrrolidine
c	$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$	CH_3	h	3-Methylpyrrolidine
d	$\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$	CH_3	i	3,3'-Dimethylpyrrolidine
e	$\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$	C_2H_5	j	3-Phenylpyrrolidine

Figure 18 : Les ligands amino-thiol complexant l'indium-111

En outre, on a trouvé que des complexes dicarboxylate dithiol diamine forment des complexes stables avec l'indium (Reichert DE. 1999).

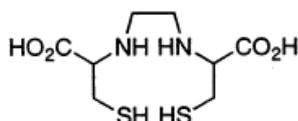


Figure 19 : Le ligand dicarboxylate dithiol diamine

II-6-Macrocycle DOTA

II-6-1-Chimie de coordination

Le DOTA (1, 4, 7,10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7,10-tétraacétique acide) (figure20-a) est un macrocycle couramment utilisé pour complexer des ions métalliques en

solution. La structure octacoordinée utilisant les quatre azotes et les quatre chaînes latérales carboxylique a été rapportée pour le DOTA et tous ses dérivés (Breeman WP. 1998, Lau EY. 2006). Quand un groupe de carboxyle est employé pour la conjugaison au peptide, l'oxygène du carbonyle (le carbonyle est attaché au groupe NH_2 d'un acide aminé d'un peptide) occupe la huitième position autour du radionucléide. DOTA et ses dérivés ont été conjugués avec succès à un certain nombre d'analogues de la somatostatine, et les produits radiopharmaceutiques obtenus ont de bons paramètres pharmacologiques (Otte A. 1997, Keire DA. 2001). Le DOTA est approprié pour chélater le ^{67}Ga , l' ^{90}Y , et l' ^{111}In . DeJong et al. (1997) ont démontré que les conjugués ^{90}Y -DOTA ont de très bonnes propriétés pharmacocinétiques *in vivo*. Cependant, dans ces radiopharmaceutiques, le chélate modifie le peptide d'origine, ce qui rend sa liaison à son récepteur plus difficile.

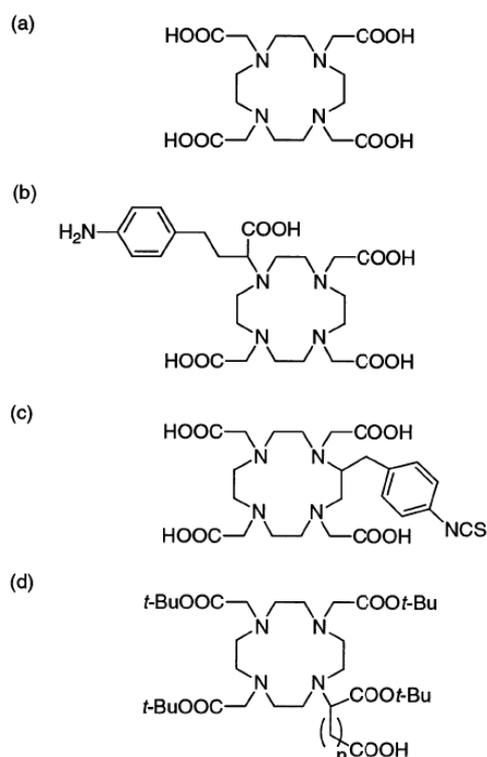


Figure 20 : Le chélate bifonctionnel DOTA (a) et quelques dérivés (b-d)

II-6-2-Stabilité des complexes DOTA radiomarqués

Le DOTA et ses dérivés présentent un intérêt particulier pour le radiomarquage des peptides et des biomolécules par les lanthanides et les éléments du groupe 13. Le macrocycle est bien organisé de sorte qu'il chélate le métal avec une grande stabilité thermodynamique. Les valeurs de pK_a pour les groupes carboxyles du DOTA sont situées entre 2 et 5. De ces faibles valeurs résultent une forte stabilité, une moindre

compétition avec les protons de la solution au moment de la complexation et un minimum de décomplexation en milieu acide, milieu nécessaire à l'ionisation et à la complexation de l'indium 111. Les groupes d'acétate attachés aux atomes d'azote donneurs ont un faible poids moléculaire. Par conséquent, la contribution du chélateur au poids moléculaire global du radiopharmaceutique est réduite au minimum (Liu S. 2004).

En outre, la haute hydrophilicité des bras acétate du DOTA favorise la clairance sanguine du peptide-DOTA non marqué par rapport au radiopharmaceutique et diminue ainsi la concurrence entre ces deux espèces chimiques au niveau du récepteur (Liu S. 2004).

II-6-3-Intérêt de l'utilisation DOTA par rapport au DTPA et ses limites

L'efficacité du radiomarquage est un critère utilisé pour décrire la capacité d'un chélateur à réaliser un marquage avec un rendement élevé et une haute pureté radiochimique (>90%). Un avantage important à utiliser des analogues du DTPA comme ligand bifonctionnel de l'indium-111 est leur efficacité de complexation extrêmement grande (complexation rapide avec une grande pureté radiochimique) dans des conditions modérées, (Liu S. & Edwaed DS. 2001, keire DA. 1999) mais la faible stabilité *in vivo* de ces complexes, entraîne une dissociation du radionucléide de son chélate. Dans le cas d'une utilisation du DTPA avec de l'yttrium-90 ou lutetium-177, il existe un risque important d'irradiation des organes non cibles tels que la moelle osseuse (Stimmel JB. & Kull FC. 1998). Par contre les analogues du DOTA pour la chélation de l'Indium-111 ont une grande stabilité *in vivo*, cependant la cinétique de radiomarquage par le DOTA est habituellement lente et nécessite une température de réaction relativement élevée, alors que les complexes avec le DTPA se forment à température ambiante (Liu S. 2004). Si les petits peptides peuvent résister à des températures relativement élevées (inférieures à 100°C) les anticorps monoclonaux, à ces températures, perdent une grande partie de leur immunoréactivité. Bien que le DOTA forme des chélates métalliques très stables en solution, leur cinétique de formation lente reste un obstacle important qui limite l'utilisation courante de ce chélateur dans les produits radiopharmaceutiques.

II-7-Radiopharmaceutiques actuels marqués à l'Indium-111

II-7-1-Indium- Oxine™ (In-111 oxyquinoline)

L'Indium-Oxine (figure 21) est un produit radiopharmaceutique à usage diagnostique destiné au radiomarquage des leucocytes autologues (les globules blancs). Ces leucocytes marqués avec de l'Indium-Oxine sont utilisés pour détecter les processus inflammatoires vers lesquels les leucocytes migrent. Après injection, l'imagerie est habituellement réalisée à 4 heures.

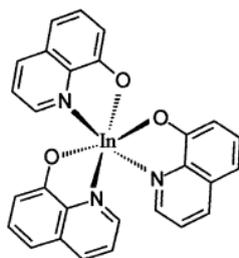


Figure 21: Schéma de l'indium-oxine™

II-7- 2- L'Indium 111- DTPA

L'indium pentetate (figure 22-a) administré par injection intrathécalle, est utilisé pour déterminer la cinétique ou la fuite du liquide céphalorachidien. Un écart à la normale peut refléter un processus pathologique.

L'In-pentetate s'élimine par voie rénale, jusqu'à 65% 24 heures après administration et 85% après 72 heures.

II-7-3-OctreoScan® , indium-111 pentétréotide

L'OctreoScan® (Covidien), Indium-111-pentétréotide (figure 22b) est un agent scintigraphique utilisé pour la localisation des tumeurs primaires ou métastatiques neuroendocrines surexprimant des récepteurs à la somatostatine.

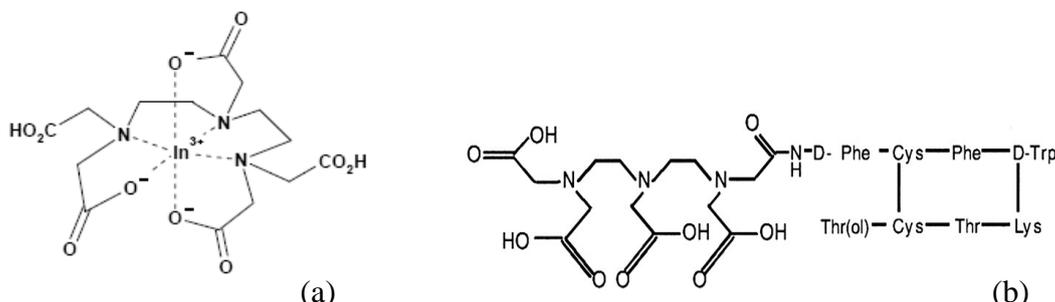


Figure 22 : Indium- DTPA (a) et OctreoScan® (indium In-111 pentétréotide) (b)

II-7-4-Indium 111 Satumomab Pendetide

C'est un anticorps monoclonal caractéristique d'une glycoprotéine (TAG-72) présente dans 95% des cancers colorectaux et 90% des cancers de l'ovaire.

Après administration intraveineuse, ce radiopharmaceutique se localise rapidement dans les adénocarcinomes colorectaux et les carcinomes ovariens épithéliaux. La voie principale d'élimination est rénale.

III- Iode-125

III-1- Propriétés physiques et domaines d'application

Tandis qu'environ 30 radio-isotopes artificiels d'iode ont été identifiés, seulement un isotope stable, l'iode-127, est retrouvé naturellement. Les trois radio-isotopes (^{123}I , ^{125}I et ^{131}I) ont été largement utilisés pour marquer de petites et grosses biomolécules. Les caractéristiques de plusieurs radio-isotopes de l'iode (Tableau 2) ont permis leurs utilisations dans la recherche biochimique et pharmaceutique, la radioimmunoanalyse et la médecine nucléaire.

En pratique, l'iode-125 ($t_{1/2}=59,9$ jours, émission γ E=35 keV) est employé pour des expériences *in vitro* (par exemple, pour des études préliminaires dans le développement d'un traceur destiné à l'imagerie), alors que l'iode-123 ($t_{1/2}=13,2$ heures, émission γ E=159 keV) est utilisé pour l'imagerie en médecine nucléaire, dans le diagnostic par scintigraphie ou Tomographie par Emission Monophotonique (TEMP). Enfin, l'iode-131 ($t_{1/2}=8$ jours, émission γ E=364 keV (83%) et émission β^- E=606 keV (90%)) est d'avantage employé en thérapie.

Trois autres isotopes émetteurs de positons (^{120}I , ^{122}I et ^{124}I) ont été récemment ajoutés à la liste de radio-iodes utiles. L' ^{120}I ($t_{1/2}=1,4$ heures), un isotope de demi-vie relativement courte, semble avoir un grand potentiel pour l'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons). L' ^{124}I ($t_{1/2}=4,18$ jours) est utilisé en TEP pour l'évaluation dosimétrique quantitative des produits radiopharmaceutiques thérapeutiques marqués à l'iode-131 et pour mesurer les traceurs diagnostiques marqués à l'iode-123 de pharmacocinétique lente. La demi-vie de l' ^{122}I est de très courte durée (3,6 min) et il a par conséquent des applications très limitées.

Radionucléide	$t_{1/2}$	Mode de décomposition (%)	E β (max) en keV	Rayonnement γ , keV (%)	Applications
^{120}I	1,4 h	β^+ (56), EC (44)	4000	601 (58,0) 1523 (11,2)	TEP
^{122}I	3,6 min	β^+ (77), CE (23)	3120	564 (18,0)	TEP
^{123}I	13,2 h	CE (100)		159 (83,0)	TEMP
^{124}I	4,18 j	β^+ (22), CE (78)	2140	603 (61,0)	TEP

				723 (10,0) 1691 (10,4)	Thérapie control
^{125}I	59,9 j	CE (100)	électrons Auger	35,5 (6,7)	RIA, électron Auger thérapie
^{131}I	8,02 j	β^- (100)	606	284 (6,1) 364 (81,2) 637 (7,3)	Thérapie

Tableau 2: Propriétés nucléaires et domaines d'application de quelques radioiodes (CE : capture électronique) (Coenen HH. 2006).

III-1-1- Pureté radiochimique et radionucléidique

L'introduction d'un atome d'iode dans une molécule est généralement réalisée par la substitution nucléophile ou électrophile sur un atome de carbone. Dans le commerce, les radioisotopes de l'iode sont fournis sous forme d'iodures. Les iodures de sodium Na^{125}I sont disponibles en solution dans du $\text{NaOH } 10^{-2} \text{ M}$ ou dans un tampon phosphate, alors que les iodures de sodium Na^{131}I et Na^{123}I sont uniquement disponibles dans une solution de $\text{NaOH } 10^{-2} \text{ M}$ pour le marquage des molécules.

La pureté radiochimique est définie comme étant la fraction des radio-isotopes présente sous leur forme chimique spécifiée. Selon le processus appliqué, pendant le stockage, le radio-iodide peut être contaminé par différentes espèces chimiques de l'iode radioactif. La plupart du temps, ce sont les formes oxydées qui apparaissent (I_2 , IO_2^- , IO_3^- et IO_4^-) à cause du potentiel d'oxydation des iodures et des processus radiolytiques. Puisque la pureté radiochimique de l'iode entrave les rendements radiochimiques des méthodes de marquages nucléophiles et électrophiles, elle doit être contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM) ou chromatographie liquide de haute performance (CLHP).

La pureté radionucléidique est définie comme étant la fraction du radionucléide spécifié présente dans la radioactivité totale. Par exemple, il est nécessaire d'utiliser une pureté radio-nucléidique élevée pour un produit radiomarké à l'Iode-123 :

- (i) pour éviter une dose inutile de rayonnement lors d'une scintigraphie,
- (ii) pour réduire au minimum la dégradation de la qualité des images et
- (iii) pour limiter les erreurs sur les mesures du processus biologique.

III-1-2- Activité spécifique

L'activité spécifique (A_s) doit être évaluée pour contrôler la masse du produit radiopharmaceutique qui sera fournie ou employée réellement. Elle est définie comme la radioactivité par masse d'un composé marqué. Conventionnellement, on nomme toutefois «activité molaire» (radioactivité par mole) «l'activité spécifique». L'activité spécifique maximale pour un radionucléide est atteinte lorsqu'il n'y a aucune dilution par d'autres isotopes du même élément.

En théorie, l'activité spécifique maximale d'un radionucléide (Tableau 3) est fonction de la demi-vie du nucléide et est calculée en utilisant l'équation fondamentale de la décroissance radioactive suivante :

$$A = (\ln 2 / t_{1/2}) \times N = (0,6931 / t_{1/2}) \times N$$

$$A = \lambda \times N$$

Ici, A est l'activité (Bq), $t_{1/2}$ est la demi-vie (seconde) et N est le nombre d'atomes du radionucléide. N est converti en nombre équivalent de moles divisé par la constante d'Avogadro ($N^\circ = 6,023 \cdot 10^{23}$ atomes / mol). Ainsi, l'activité spécifique maximale théorique liée à une mole est donnée par :

$$A_{s \max} = A / (N/N^\circ) = (0,6931 \times 6,02 \cdot 10^{23}) / t_{1/2} [\text{Bq} / \text{mol}]$$

$$\text{ou } A_{s \max} = 4,1725 \cdot 10^8 / t_{1/2} [\text{GBq} / \mu\text{mol}]$$

$$\text{ou } A_{s \max} = 1,1277 \cdot 10^7 / t_{1/2} [\text{Ci} / \mu\text{mol}]$$

	^{120}I	^{122}I	^{123}I	^{124}I	^{125}I	^{131}I
Demi-vie	1,4 h	3,63 min	13,2 h	4,18 j	59,9 j	8,04 j
$A_{s \max}$						
Bq / μmol	$8,25 \cdot 10^{16}$	$1,92 \cdot 10^{21}$	$8,77 \cdot 10^{18}$	$1,15 \cdot 10^{18}$	$8,14 \cdot 10^{16}$	$5,99 \cdot 10^{17}$
Ci / μmol	$2,23 \cdot 10^3$	$51,8 \cdot 10^3$	237,0	31,2	2,2	16,2

Tableau 3 : Activité spécifique maximale des radionucléides d'iode d'intérêt biologique (Coenen HH. 2006)

L'activité spécifique des radionucléides de l'iode, en conditions pures et sans porteur, est forte. Par exemple, 3,7 GBq de ^{123}I (100 mCi) et 37 MBq de ^{125}I (1 mCi) sont équivalents à 0,42 et 0,46 nmol. En pratique, bien qu'il soit possible d'approcher "l'état sans porteur" (quand le radionucléide n'est contaminé par aucun autre nucléide radioactif ou stable du même élément), il est difficile d'exclure complètement la forme stable du nucléide dans la plupart des cas. Ainsi la terminologie aucun-entraîneur-

supplémentaire (no-carrier-added, n.c.a) devrait être appliquée à un radionucléide ou à un composé radioactif auquel aucun porteur du même élément ou composé n'a été intentionnellement ajouté à la préparation, pour avoir $A_s \text{ max}$ réalisable en conditions pratiques.

III-2- Méthodes de radioiodation

Il est évident que la substitution d'un atome (hydrogène, halogène, etc.) ou d'un groupe polyatomique (méthyle, trifluoro-méthyle, etc...) par un atome d'iode dans un composé pharmacologiquement actif pourrait modifier son comportement biologique. Pour cette raison, et en raison de la période courte des radio-isotopes de l'iode, le développement de nouveaux traceurs radio-iodés est un défi pour la conception et la synthèse.

Généralement, les méthodes classiques d'iodation employées dans la chimie de synthèse organique peuvent être employées pour la radiochimie. Cependant, ces méthodes doivent être adaptées en tenant compte de plusieurs paramètres tels que la demi-vie du radionucléide et les concentrations très faible utilisées. Les réactions principales de radiomarquage à l'iode appartiennent aux substitutions nucléophiles ou électrophiles. La radioiodation directe (remplacement d'atome d'hydrogène par un atome de radioiode) représente une exception pour la substitution électrophile sur les composés aréniques.

Les autres réactions ont besoin de l'introduction d'un «bon» groupe partant dans la molécule qui pourrait être facilement remplacé par un atome d'iode. Le choix du site de radio-marquage est déterminé par des considérations chimiques, biologiques et structurales, tandis qu'une attention particulière doit être prêtée à la stabilité du lien carbone-iode. Après ce choix, une réaction de marquage régiosélective devra être employée pour présenter l'atome d'iode sur la position désirée. Pour la préparation d'un produit radiopharmaceutique, un mélange des isomères iodés doit être évité afin d'empêcher toute procédure complexe de séparation et de purification. D'ailleurs, le coût élevé des isotopes de l'iode nécessite l'obtention d'un marquage spécifique avec un haut rendement.

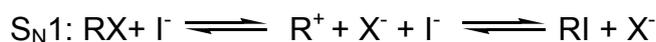
III-3- Substitution nucléophile

III-3-1- Général

Dans des réactions de substitution nucléophile (S_N) le réactif attaquant (dans ce cas-ci le nucléophile est un anion d'iode) apporte une paire d'électrons au substrat (l'électrophile) afin de former une nouvelle liaison et le groupe partant (le nucléofuge) est écarté avec une paire d'électrons. Plusieurs mécanismes distincts sont possibles selon le substrat (aliphatique ou aromatique), le groupe partant et les conditions de réaction (le solvant, la température, etc...). La radioiodation par substitution nucléophile est souvent exécutée avec les composés aliphatiques et aromatiques selon la nature du groupe partant.

III-3-2- Échange d'halogènes dans les composés aliphatiques

Dans les composés aliphatiques, les réactions se produisent au niveau d'un atome de carbone saturé et correspondent aux mécanismes S_N1 et S_N2 les plus communs. Les deux mécanismes de réaction sont illustrés par les réactions suivantes :



où X ($\neq H$) est le groupe nucléofuge. La différence principale entre les deux types de réaction est que le lien du groupe partant est rompu avant (S_N1) ou après (S_N2) la formation de la liaison nucléophile.

Généralement, les sulfonâtes sont de meilleurs nucléofuges que les halides. Les sulfonâtes les plus utilisés pour l'iodation sont les triflates (CF_3SO_3R), les mesylates (CH_3SO_3R), les tosylates ($P-CH_3C_6H_4SO_3R$), les brosylates ($P-Br-C_6H_4SO_3R$) et les nosylates ($P-NO_2C_6H_4SO_3R$). Mais en pratique, un halogène est souvent choisi en tant que groupe partant (l'ordre de nucléofugalité de l'halogène avec l'iode radioactif est : $I > Br > Cl$). Seul l'échange inter halogène sera pris en compte dans ce chapitre.

Pour la réaction S_N2 , la charge dans l'état de transition est dispersée sur le produit de départ ($X^{\delta-} \dots R \dots I^{\delta-}$). L'état de transition est plus soluble dans les solvants aprotiques polaires que dans les solvants protiques. Ainsi, le changement d'un solvant protique tel que le méthanol pour un solvant aprotique polaire tel que le diméthyle sulfoxyde augmente le taux de substitution.

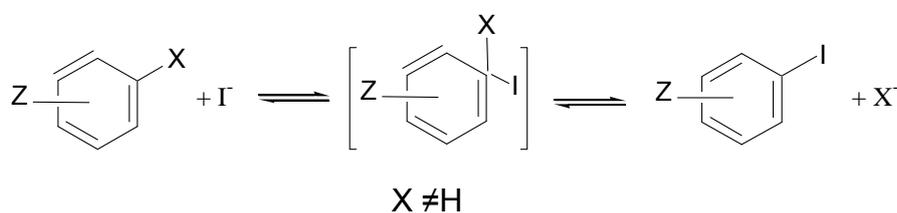
En outre, la réaction est limitée par les solvants polaires. Cependant, une augmentation de la polarité des solvants aprotiques diminue le taux de substitution.

Par contre, pour des réactions S_N1 , le taux de substitution augmente avec l'augmentation de la polarité du solvant (alors que le taux de la substitution S_N2 diminue), en conséquence, il est possible que la même réaction procède par un mécanisme S_N1 dans un solvant et par un mécanisme S_N2 dans un autre.

La manière la plus simple d'incorporer un atome d'iode radioactif dans une petite molécule organique est de substituer un atome stable d'iode déjà incorporé dans la molécule par un atome d'iode radioactif (échange isotopique). Cependant, la plupart des atomes d'iode dans le produit final, après un tel marquage, seront des atomes d'iode-127 et des composés à radioactivité spécifique très élevée ne pourront pas être préparés par une réaction d'échange isotopique. Néanmoins, la radioactivité spécifique modeste réalisable par cette méthode permet d'obtenir des produits radiopharmaceutiques utilisables pour un certain nombre d'investigations en médecine nucléaire (par exemple : le MIB6-I123).

III-3-3- Échange d'halogène des composés aromatiques

La substitution nucléophile s'effectue lentement sur un carbone aromatique. Pour réaliser cette réaction nucléophile sur un substrat aromatique, la réaction doit être activée par des groupes attracteurs d'électrons, de préférence M^- (M : Métal) ou I^- , en position ortho- ou para- par rapport au groupe partant, ou catalysée par exemple par un sel métallique (tel que le sel de Cu^+). Le mécanisme général de la réaction est présenté ci-dessous :



Échange isotopique.

Pour beaucoup de composés aromatiques, l'échange avec le radioiodure de sodium sous reflux produit un marquage avec un rendement et une activité spécifique pas très élevés.

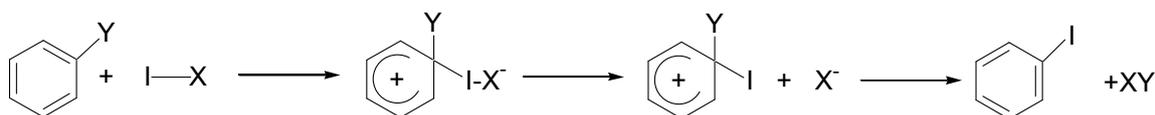
III-4- Substitution électrophile

III-4-1- Considération générale

La radioiodation électrophile est le processus selon lequel un iode de charge positive (I^+) attaque un système de forte densité électronique tel qu'un cycle aromatique ou une double liaison. En conséquence, une liaison covalente carbone-iode est formée par perte de la charge positive du groupe partant. Le groupe partant (l'électrofuge) doit nécessairement partir sans sa paire d'électrons. Les groupes partants les plus importants sont les acides de Lewis. Dans le système aliphatique, le proton (le groupe partant le plus courant) peut être un groupe partant, mais sa réactivité va dépendre de l'acidité. Puisque les ions métalliques peuvent facilement porter des charges positives, les groupes organométalliques sont particulièrement susceptibles d'être utilisés lors d'une substitution électrophile.

La grande majorité des réactions électrophiles de radioiodation concerne la substitution aromatique.

En raison de l'énergie élevée de formation, l'iode ne peut pas exister dans l'état d'oxydation +1. L'espèce attaquante est plutôt un dipôle ($^{\delta-}X-I^{\delta+}$) comportant un atome d'iode chargé positivement, où X est un groupe donneur d'électrons ou une molécule de solvant.



Pour le développement des traceurs iodés, il est important que les composés aromatiques et vinyliques d'iode possèdent une grande stabilité chimique mais également une grande stabilité *in vivo*. Pour les iodures de vinyl la force du lien C-I est au moins aussi haute que celle des iodures aryliques et des méthodes de marquage identiques peuvent être appliquées pour la synthèse des deux types des composés iodés.

Les traceurs aliphatiques iodés sont presque exclusivement marqués par substitution nucléophile et pas électrophile. Ainsi, presque toutes les méthodes de marquage électrophiles développées jusqu'ici se sont concentrées sur des radioiodoarènes. L'iode radioactif moléculaire (Radio-I₂) n'est pas un réactif marquant approprié parce

qu'il est fortement volatil, plutôt non-réactif et naturellement un réactif porteur supplémentaire.

III-4-2- Réactifs d'oxydation

- Mono- halogénure de l'iode

Pour la génération de ces espèces, une solution de radioiodures de sodium est traitée avec une solution de ICl, menant à un échange de radioiode oxydé / iode, ou radioiode oxydé / halogènes, F₂ ou Cl₂. La haute densité électronique du chlorure et du fluorure mène à une liaison covalente forte du chlore- ou du fluor- d'iode dans l'interhalogène formé. Ainsi la charge partielle positive sur l'atome de radioiode le rend très électrophile (activité spécifique faible).

- N-chloramides

Une autre manière de réaliser la radioiodation électrophile est l'utilisation des sels de sodium de l'acide N-chlorosulphonique amide, tels que la chloramine-T (CAT, acid N-chloro-p-toluenesulphonic), la chloramine-B (CAB, acid N-chlorobenzènesulphonic), ou la Dichloramine-T (DCT, acid N, N-dichloro-p-toluenesulphonic).

En solution aqueuse, ces composés libèrent lentement l'acide hypochloreux (HOCl) qui oxyde l'iodure pour former un ion d'iodonium (H₂OI⁺). Toutefois dans un milieu fortement acide, des espèces d'interhalogènes sont probablement formées par les sels de sodium, tandis que dans un milieu neutre ou en conditions légèrement basiques, les radioiodoanalogues correspondants du N-haloamides sont retrouvés.

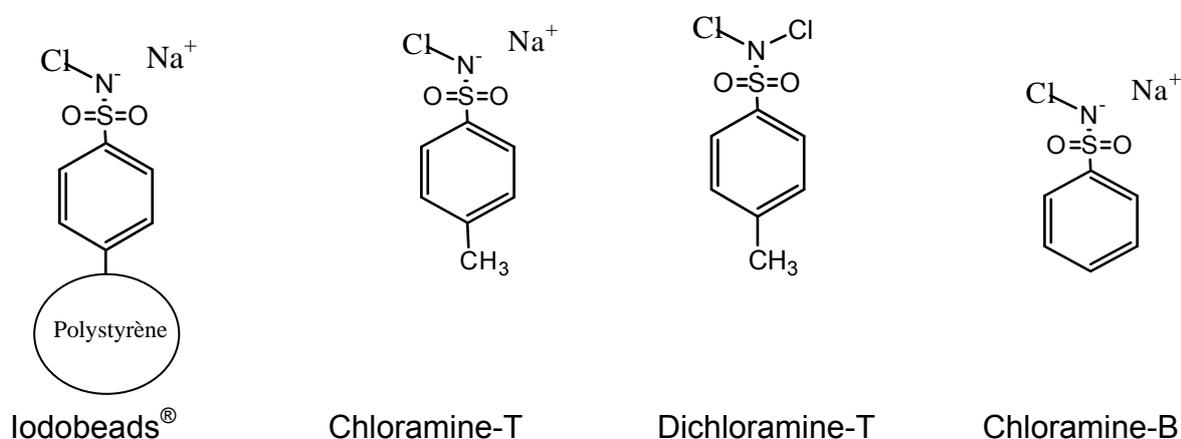


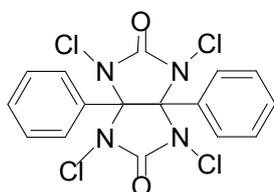
Figure 23 : Exemples des oxydants N-chloramide

Les conditions d'oxydation relativement fortes et la possibilité de réaction de chloration mènent souvent à la formation de sous-produit. On recommande de travailler à basses températures et de garder la concentration en réactif aussi basse que possible.

Afin de limiter ces inconvénients, la Chloramine-T (CAT) fixée sur un polymère, nommé *Iodobeads*[®], peut être utilisée. En ajoutant ces billes à la réaction, la libération des espèces oxydées est retardée et sa concentration est maintenue très basse. De plus, le temps de contact entre le précurseur et l'agent d'oxydation est plus court. Les conditions pour la radioiodation avec le CAT et l'*Iodobeads*[®] sont semblables mais la séparation du dernier oxydant est possible par filtration de l'échantillon, évitant de ce fait l'utilisation d'un agent réducteur. Puisque les monochloro-sulphonamides en tant que composés ioniques sont insolubles dans la plupart des solvants organiques, leur utilisation est limitée aux milieux de réaction aqueux. L'utilisation de Dichloramine-T (DCT) permet de travailler dans les solvants organiques.

- Iodogen[®]

Iodogen[®] est le nom déposé du 1,3,4,6-tétrachloro-3 α ,6 α -diphénylglycouril, un composé contenant quatre atomes de chlore. À l'origine, Iodogen[®] était développé pour la radioiodation des protéines, des peptides et des membranes cellulaires. La pureté radiochimique obtenue avec ce composé est comparable à celle obtenue avec la chloramine-T (CAT). Puisque l'Iodogen[®] est insoluble en solution aqueuse, il doit être préalablement déposé sous forme solide sur les parois du tube de réaction. À cette fin, une solution d'Iodogen[®] dans un solvant organique volatil tel que le chloroforme est transférée dans le flacon de réaction ; le solvant est ensuite évaporé sous un courant de gaz inerte. La solution contenant le précurseur et le radioiode sont ajoutés, puis la réaction est réalisée durant quelques minutes. La réaction est arrêtée par simple élimination de la solution aqueuse.

Iodogen[®]

- Peracides

L'avantage de prendre des peracides comme oxydants est qu'aucun sous-produit chloré ne peut être formé et que la formation des sous-produits de l'oxydation est fortement réduite. Ainsi les peracides se prêtent particulièrement aux radioiodations des substrats sensibles.

- Autres oxydants

Indépendamment des méthodes décrites ci-dessus, il existe quelques autres réactifs moins employés pour l'oxydation *in situ* avec marquage électrophile : N-Halosuccinimides, iodate, ions métalliques, enzymes et méthodes électrochimiques.

III-4-3- Radioiodation électrophile directe (déprotonation)

Cette méthode est généralement limitée aux arènes qui sont riches en électrons et actives pour la substitution électrophile. En général, la radioiodation électrophile directe est simple et augmente la pureté radiochimique. Le seul problème avec cette méthode est la formation d'un mélange d'isomères qui sont difficiles à séparer.

III-4-4- Technique de démétallation

Dans ce cas, des composés organométalliques, souvent difficiles à synthétiser, sont nécessaires comme précurseurs de la radioiodation électrophile. Les organométalliques les plus appropriés sont des dérivés de trialkylstanyl, de trialkylsilyl ou d'acide boronique. L'avantage de cette méthode se situe dans la possibilité d'iodation des arènes en condition très modérée et régiosélective.

III-5- Radiomarquage de protéines

III-5-1- Radioiodation direct des protéines

Les méthodes pour la radioiodation des protéines doivent être faciles, douces, rapides et donner des puretés radiochimiques élevées. En outre, la protéine radioiodée obtenue doit avoir une activité spécifique élevée et être peu sensible aux déshalogénations. Le marquage est souvent réalisé avec des espèces électrophiles

de radioiode préparées directement *in situ* et les groupes fonctionnels de la protéine. Un tel marquage direct est la méthode d'iodation la plus favorable si la protéine est stable dans les conditions nécessaires à l'oxydation. Puisque ce n'est souvent pas le cas, on a proposé des méthodes alternatives, à savoir :

- Construction d'un groupe accepteur d'iode sur la protéine
- Conjugaison d'une petite molécule radioiodée avec la protéine.

Dans les protéines, les groupes fonctionnels situés sur le cycle phénolique des résidus de tyrosine (fortement activés) et à un moindre degré ceux situés sur le cycle benzénique des résidus de phénylalanine, l'imidazol des résidus d'histidine, le cycle d'indole des résidus du tryptophane et les groupes de sulfhydryle des résidus de cystéine sont réactifs pour l'iode électrophile. Par marquage direct, la radioiodation est exécutée en utilisant les méthodes électrophiles avec des réactifs oxydants doux et les conditions déjà exposées. Les réactions électrophiles exigent la production d'espèces électrophiles par l'oxydation des ions d'iode. L'oxydant :

- doit être compatible avec les solutions aqueuses,
- ne doit pas dénaturer la protéine et
- doit permettre une purification facile de la protéine radioactive.

La séparation peut être facilitée en assemblant le peptide avant l'iodation sur un support solide, en utilisant par exemple le protocole de couplage fluorenylmethoxycarbonylamine (Coenen HH. 2006).

Sous différentes conditions de réaction (par exemple en pH acide), on a observé que des parties de thyrosyl, d'histidyl et de cystenyl peuvent réagir avec l'iode et ce, à divers pourcentages. Cependant, d'après l'état général de la réaction (pH=7,4 et CAT comme oxydant) un grand pourcentage d'iode sera présent sur les résidus phénoliques des tyrosines suivant l'équation :

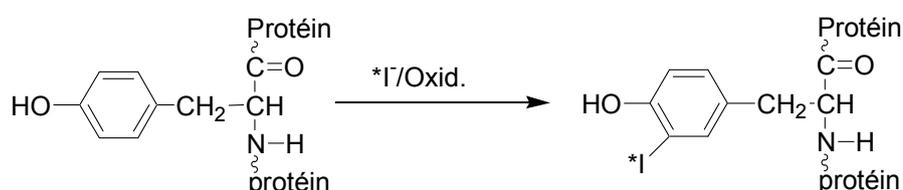


Figure 24 : Schéma de radioiodation d'une protéine sur le groupement tyrosine à l'aide d'un oxydant.

Certains des réactifs d'oxydation mentionnés ci-dessous ont été employés pour former des espèces électrophiles de l'iode en présence des protéines :

- **Monochlorure d'iode**

Historiquement, le premier agent pour marquer des protéines, le monochlorure d'iode, a été préparé avec une basse activité spécifique par échange isotopique avec du NaI radioactif. Ce marquage est rapide et les réactions secondaires indésirables sont limitées. En outre, ICI est particulièrement stable en milieu aqueux, ce qui permet un contrôle strict de la réaction de substitution électrophile.

- **Chloramine-T**

N-chlorotoluène sulphonamide de sodium (CAT), un agent d'oxydation doux à température ambiante dans des conditions neutres ou basiques, a été intensivement employé pour le radiomarquage spécifique et élevé des peptides et des protéines. Toutefois, les protéines à marquer sont en contact intense avec le CAT, ce qui mène probablement à la chloration, à la polymérisation, à la formation de macro-agrégats et à l'oxydation de la méthionine. Cet inconvénient est réduit au minimum en employant la plus basse concentration possible de CAT. Afin de réduire la réaction d'oxydation, les Iodobeads[®] ont été développées, où la CAT est attachée à un support solide dérivé de polystyrène.

- **Iodogen[®]**

Le 1,3,4,6-Tétrachloro-3 α ,6 α -diphénylglycouril est un autre composé chloré d'oxydation doux qui ne nécessite pas d'agent réducteur et permet l'obtention de rendements de marquage élevés. Puisque l'Iodogen[®] est insoluble en milieu aqueux, son contact avec la molécule à marquer est limité et les réactions secondaires comme la dégradation des protéines sont réduites au minimum. De plus, puisque l'Iodogen[®] est facilement séparable de la protéine radioactive, ce produit s'est avéré très attrayant pour le marquage des macromolécules telles que les peptides et les anticorps monoclonaux. Une procédure de marquage à I¹³¹ d'anticorps monoclonaux a été développée, en présence d'une quantité minimum d'Iodogen[®]. Cette méthode permet l'obtention d'un marquage à haute pureté radiochimique, tout en conservant l'intégrité de l'anticorps et leurs immunoréactions (Visser GW. 2001).

- **Enzymes oxydantes**

En tant que méthode très douce, la radioiodation enzymatique des protéines et des peptides a été réalisée avec de la peroxydase et du peroxyde d'hydrogène. En présence d'une faible quantité de peroxyde d'hydrogène (ajoutée à la solution contenant le peptide), l'enzyme lactopéroxydase catalyse l'oxydation de l'iode à "l'iode actif", HOI. La cinétique de radioiodation est dépendante du pH, généralement un pH de 5 à 6 est employé. Les protéines ne sont pas exposées à une forte oxydation, par conséquent, les propriétés immunologiques et biologiques des biomolécules sont préservées. Pendant la radioiodation, la lactopéroxydase est également iodée, ce qui mène à une perte d'iode et ce qui rend la purification de la protéine marquée à partir de l'enzyme marquée plus difficile. Ce problème est réglé en utilisant la peroxydase liée à une matrice insoluble telle que l'agarose qui peut être facilement enlevée du mélange de la réaction.

III-5-2- Radioiodation indirecte par l'intermédiaire des conjugués

L'incorporation directe de l'iode radioactif pour marquer une macromolécule peut être vouée à l'échec :

- si la molécule ne possède pas de groupes fonctionnels qui peuvent être iodés,
- si ces groupes sont présents mais restent inaccessibles,
- si la molécule est sensible aux réactifs oxydants utilisés.

Par ailleurs, la radioiodation par méthode directe présente un risque élevé d'endommager l'immunoréactivité des anticorps. Diverses techniques ont donc été développées pour surmonter ce problème de marquage. Une alternative de marquage direct consiste en la conjugaison de la macromolécule avec un groupe précédemment radioiodé. Dans cette approche, la protéine à marquer est mise en présence d'une molécule iodée qui a été préalablement activée pour la conjugaison et pour former une liaison avec la protéine d'intérêt. Une autre technique consiste à préparer un acide aminé iodé qui sera incorporé lors de la synthèse du peptide. Les groupes fonctionnels principaux sur les protéines qui peuvent être employés lors de réactions de conjugaison sont des amines, des sulfhydryls et des sucres oxydés. Beaucoup de revues décrivent la chimie de la modification des protéines par la conjugaison de petites molécules (Brinkley M. 1992).

- **Conjugués amine-réactifs**

Le groupe fonctionnel le plus couramment utilisé pour la conjugaison des molécules iodées aux protéines est le groupe amine, généralement le groupe ϵ -amino des résidus de lysine.

- Esters actifs

Les groupes amine des protéines se lient à des esters actifs. Pour des composés iodés, le premier ester actif et le plus souvent utilisé est le réactif de Bolton-Hunter : N-succinimidyl-3-(4-hydroxyphényl) propionate radio-iodé (Bolton & Hunter 1973).

Le principe de marquage (Figure 25) est simple et implique deux étapes :

1. La préparation du réactif de Bolton-Hunter avec de l'iode radioactif et l'utilisation de CAT comme oxydant,
2. Le couplage avec un groupe libre amine de la protéine (une lysine par exemple)

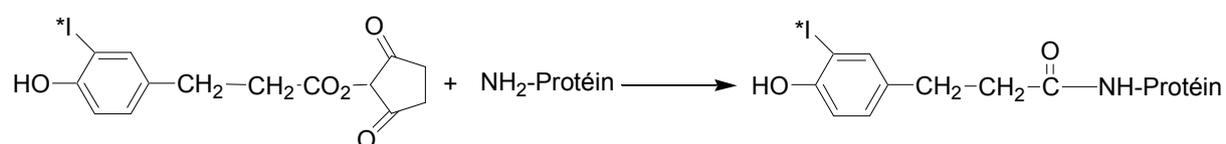


Figure 25 : Radioiodation par la méthode Bolton-Hunter.

Cependant, le réactif de Bolton-Hunter peut être altéré lors de désiodations enzymatiques *in vivo* par des désiodases. Malgré cela et la radiotoxicité plus importante de l'iode-124, une méthode améliorée de Bolton-Hunter a été utilisée pour la préparation de l'anticorps de VEGF radioiodé (Glacer M. 2003).

Afin de réaliser un marquage stable, des esters d'acide benzoïque et d'acide carboxylique phénylalkyl 3- et 4- radioiodés ont été développés pour la conjugaison (Chen J 1996)). Parmi les groupes prosthétiques radioiodés semblables, un dérivé de la pyridine, le N-succinimidyl-5-[¹³¹I]-iodo-3-pyridine carboxylate qui fournit également des conjugués, est très stable et résiste à la désiodation *in vivo*, et doit également être mentionné.

- Esters d'imidate

Les esters d'imidate réagissent avec des amines de protéine pour former des liaisons amides. Un ester d'imidate du phénol, sous le nom de réactif de Wood, est employé comme conjugué de protéine pour la radioiodation.

- Aldéhydes et Halides activés

Les amines de protéine réagissent avec des aldéhydes afin de former des imines, qui peuvent être réduites, plus tard, en amines secondaires. En outre, ces groupements d'amines de protéine peuvent réagir avec les α -carbonyl halides afin de former des liaisons amines.

- **Isothiocyanates**

Les amines de protéine réagissent avec les isothiocyanates afin de former des liaisons thiourées. Le 3-Iodo-phényl isothiocyanate a été employé pour l'iodation des anticorps monoclonaux.

• **Conjugués réactifs de sulfhydryle**

L'autre groupe fonctionnel utilisé sur une protéine pour la formation des conjugués est le groupe thiol des résidus cystéine. Les protéines qui ne contiennent pas de thiols natifs peuvent être conjuguées avec des composés sulfhydriques. Les thiols sont des nucléophiles, comme les amines, et réagissent avec la plupart des groupes fonctionnels utilisés pour la conjugaison des amines.

• **Conjugués de carbohydrate-réactif**

Certaines glycoprotéines, comme les anticorps monoclonaux, ont leurs groupes d'hydrate de carbone attachés loin des liaisons biologiquement actives, rendant ces groupes attractifs pour la conjugaison des espèces radiochimiques. Ainsi, une oxydation des parties d'oligosaccharide peut être utile pour former les aldéhydes, qui réagiront avec des amines, l'hydrazine ou l'hydroxylamine iodée.

III-6- Les radiopharmaceutiques iodés

L'incorporation d'un halogène radioactif, et particulièrement d'un atome volumineux d'iode, peut changer considérablement la pharmacologie de la molécule originale ; ceci est dû à :

- (i) un changement de conformation,
- (ii) un changement de la densité électronique et
- (iii) l'augmentation de la lipophilie.

- **Lipophilie**

L'halogène radioactif incorporé joue un rôle fondamental dans la distribution d'un radiotraceur, sur ses liaisons aux protéines plasmatiques et sur ses liaisons non-spécifiques tissulaires. L'augmentation de la lipophilie peut alors empêcher l'obtention d'une image précise et spécifique.

III-7- Propriétés pharmaceutiques

La toxicité des radiopharmaceutiques iodés, comme tous les autres produits pharmaceutiques à usage humain, doit être testée afin de garantir la qualité du produit. Par conséquent, pour chaque nouveau produit radiopharmaceutique, les critères de qualité de base doivent être rassemblés.

III-7-1- Pureté chimique et radiochimique

La pureté chimique est définie comme la fraction du composé dans le produit radiopharmaceutique formulé qui se trouve sous la forme moléculaire désirée. La pureté radiochimique peut être définie en tant que "fraction du radionucléide spécifique qui est présent sous la forme chimique désirée et en position moléculaire spécifié". L'impureté radiochimique peut venir :

- d'une réaction incomplète,
- d'une réaction secondaire,
- d'une réaction avec les impuretés ou les solvants,
- du déplacement incomplet des groupes protecteurs,
- d'une séparation défectueuse ou incomplète de la préparation,
- de modifications chimiques lors du stockage (par des radiolyses).

Presque toutes les méthodes de marquage commencent à partir des solutions aqueuses d'iode radioactif. Si des agents antioxydants sont ajoutés à ces solutions pour empêcher l'oxydation des iodures, l'attention doit être portée sur le fait qu'ils ne doivent pas interférer lors la réaction de marquage. Lors de réactions d'échange nucléophile, toute présence d'ions bromure ou chlorure doit être évitée. En cas de substitution électrophile, les traces d'impuretés organiques fortement activées peuvent également consommer une grande partie des radioiodures et former des produits latéraux marqués.

III-7-2- Stabilité *in vitro* et durée de conservation

Lors du marquage et du stockage, les principaux facteurs responsables de la dégradation des traceurs radioiodés sont :

- la décomposition due aux radiations (particulièrement en haute activité spécifique ou en concentration élevée). Le dépôt d'énergie est responsable de l'excitation et de l'ionisation de la molécule.
- la déiodation à cause d'une oxydation, de la lumière, de la chaleur, du solvant ou du pH,
- les dommages chimiques dues aux radiations, aux réactifs et aux impuretés dans les solutions radiopharmaceutiques.

Dans la pratique, quand des traceurs marqués à l' ^{125}I ou à l' ^{131}I , plus onéreux, sont stockés pendant longtemps, un contrôle par CLHP et une purification régulière sont exigés. De plus, quand un traceur marqué à l'Iode-123 est employé pour le diagnostic *in vivo* (une demi-vie ou plus après le marquage), les effets radiolytiques doivent être pris en considération.

III-7-3- Caractéristiques pharmacologiques

Après administration (injection) d'un produit radiopharmaceutique chez un sujet vivant (humain ou animal), deux phases différentes peuvent être distinguées :

- une phase pharmacocinétique comprenant les phases d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (clairance) ;
- une phase pharmacodynamique décrivant l'interaction du produit radiopharmaceutique avec sa cible spécifique (récepteur, transporteur, enzyme, etc...).

La qualité d'un traceur pour l'imagerie fonctionnelle sera la plupart du temps liée à l'équilibre du partage du traceur dans ces deux phases.

La distribution d'un produit radiopharmaceutique est exprimée par son volume de distribution et indique le volume virtuel de sang, elle est calculée à partir de la concentration (restante) dans le sang et à partir de toutes les doses d'activités administrées. C'est un nombre théorique qui suppose que le produit radiopharmaceutique est en concentration adaptée dans le tissu et dans la circulation sanguine. Ainsi plus le volume de distribution est grand, plus la

concentration tissulaire est grande. Les facteurs principaux qui jouent un rôle dans la distribution des produits radiopharmaceutiques et donc pour leur volume de distribution sont :

- leur capacité à traverser les membranes cellulaires (lipophilie, ionisation, etc...),
- leur liaison aux protéines plasmatiques (seulement la fraction libre ou non liée est disponible pour traverser la membrane),
- leur liaison aux cellules du sang (érythrocytes, lymphocytes, plaquettes),
- le filtre pulmonaire (le poumon est le premier organe rencontré par le produit radiopharmaceutique après injection intraveineuse et les cellules du parenchyme pulmonaire sont connues pour retenir les molécules de base, agissant en tant que « réservoir »),
- la liaison stéréospécifique du produit radiopharmaceutique aux protéines spécifiques de cellules telles que les récepteurs, les transporteurs ou les enzymes et,
- leur liaison non spécifique aux composants de membrane de cellules, telle qu'une liaison dépendant essentiellement de la lipophilie du produit radiopharmaceutique.

La grande majorité des radiopharmaceutiques traversent la membrane lipidique par diffusion passive (gradient de concentration électrochimique) mais en plus la lipophile joue un rôle fondamental dans leurs caractéristiques de distribution (volume de distribution). La forme neutre du produit radiopharmaceutique est beaucoup plus liposoluble que sa forme ionisée et la constante d'ionisation joue également un rôle important dans sa caractéristique de distribution.

III-7-4 Considérations pharmaceutiques

Lors de la production d'un pharmaceutique radioiodé destiné à la TEMP, les critères de stérilité, d'apyrogénicité, d'isotonicité et de neutralité du pH doivent être confirmés en utilisant le procédé approprié et répondant aux exigences de la pharmacopée nationale et/ou européenne.

Tous les produits radiopharmaceutiques utilisables chez l'homme et destinés aux expériences à long terme chez les animaux doivent être stériles et apyrogènes. Des solutions radiomarquées stériles peuvent facilement être préparées par filtration du

produit radiopharmaceutique sur une membrane-filtre de basse porosité (0,22 μm) et par des procédures aseptiques sous hotte à flux laminaire.

Les pyrogènes ou l'endotoxine sont des polysaccharides solubles ou des protéines produites par des microorganismes. Ils ne peuvent pas être éliminés par filtration. Après administration intraveineuse, les pyrogènes produisent des symptômes de fièvre, de douleur commune, de transpiration et des maux de tête. La seule manière d'empêcher la contamination par des pyrogènes est d'exécuter toutes les procédures chimiques méticuleusement, selon les caractéristiques de pharmacopée à partir de matières premières stériles.

Les cibles

Comme noté précédemment, l'imagerie nucléaire permet d'obtention d'informations de manière non invasive sur l'ensemble des organes. Dans les services de médecine nucléaire le développement de cette technique, 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 U877 « Radiopharmaceutiques Biocliniques », recherche des vecteurs susceptibles de visualiser par des méthodes non invasives des cibles biologiques qui sont surexprimées lors de processus pathologiques. Parmi ses thématiques, elle développe trois axes de recherches : l'imagerie de l'angiogenèse tumorale, l'imagerie de la plaque d'athérome vulnérable et en collaboration avec l'équipe de « Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR 6021, CNRS strasbourg », l'imagerie de lupus érythémateux disséminé.

Des peptides utilisés dans la maladie athéromateuse sont des ligands de VCAM-1 (Leur cible est la glycoprotéine « Vascular Cell Adhesion Molecule 1 ») : B2702 ; un petit peptide dérivé de la molécule biologique HLA et ses dix dérivés, BOT 321 et BOT337 ; des petites peptides appartenant à la protéine VLA-4, et Ep 070946.

Les ligands utilisés pour visualiser de l'angiogenèse qui ciblent l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ présente à la surface des cellules endothéliales activées, sont : les analogues RGD, des peptides cycliques possédant la séquence d'acides aminés RGD et le peptide HARP 111-124 : une facteur de croissance induisant affinité pour l'héparine qui fait interaction directe avec une récepteur transmembranaires avec l'activité tyrosine kinase).

Le peptide utilisé pour l'imagerie et la biodistribution de lupus érythémateux disséminé est le peptide dérivé de la protéine splicéosomale U1-70K : P131-151 (phosphorylé en position 140) qui retarde l'apparition de cette maladie.

L'objectif du programme de recherche réalisé par l'ensemble des équipes du laboratoire INSERM U877 est dans un premier temps d'optimiser le marquage des peptides à l'iode-125, au technétium-99m ou à l'indium-111, d'étudier les propriétés physico-chimiques de ces traceurs et d'analyser la stabilité du marquage par 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.

I- Angiogenèse

L'angiogenèse se définit comme un processus complexe, à étapes multiples, qui mène à la formation de nouveaux capillaires sanguins par l'excroissance ou le bourgeonnement des vaisseaux préexistants (Zaher 2007, Risau 1997). Ce processus peut intervenir au cours d'événements physiologiques et pathologiques ; il est essentiel lors du développement embryonnaire et des premiers stades post-nataux, ainsi que lors de la cicatrisation (Folkman J. 1992). Dans ces conditions, l'angiogenèse est fortement régulée : ce processus se déroule sur de courtes périodes (jours) puis s'arrête complètement. Cependant, dans de nombreuses pathologies, l'angiogenèse apparaît non réglée et persistante. Dans l'arthrite, de nouveaux capillaires sanguins envahissent l'articulation et détruisent le cartilage. Les malades atteints de diabète peuvent développer, au niveau de la rétine, de nouveaux capillaires sanguins qui envahissent le vitreux, se rompent et causent la cécité. La croissance tumorale et la formation de métastases sont également dépendantes de l'angiogenèse (Folkman J. 1992, 1995). Les tumeurs stimulent sans interruption la croissance de nouveaux capillaires sanguins pour se développer. De plus, les néovaisseaux incorporés dans la tumeur fournissent un passage aux cellules tumorales, permettant ainsi la création de métastases distales, localisées par exemple dans le foie, les poumons ou les os.

I-1- Formation de nouveaux vaisseaux sanguins

I-1-1-Équilibre pro-angiogénique / anti-angiogénique

En condition physiologique chez l'adulte, le réseau sanguin est stable. Cette stabilité est permise par un équilibre dynamique, et elle est soumise à un mécanisme complexe de régulation très fine faisant intervenir trois acteurs différents (Mousa S. 1998) : les facteurs pro-angiogéniques, les facteurs anti-angiogéniques et la matrice extracellulaire.

- **Les facteurs pro-angiogéniques** (Presta M. 2005)

Les facteurs pro-angiogéniques les plus importants sont :

- Le FGF (Fibroblast Growth Factor) ou Facteurs de Croissance des Fibroblastes : Trois parmi la vingtaine de facteurs connus sont présents dans les tissus adultes : FGF-1 (a-FGF, a : acide), FGF-2 (b-FGF, b : basique) et FGF-7,
- Le PDGF (Platelet-Derivated endothelial cell Growth Factor) : les Facteurs de Croissance des cellules endothéliales dérivés des Plaquettes sont fortement exprimés chez les patients atteints de cancers,
- Le TGF (Transforming Growth Factor) : les Facteurs de Croissance Transformants dont les deux membres, TGF- α et TGF- β sont présents dans de nombreux tissus dont les cellules endothéliales,
- l'angiogénine, enzyme possédant une activité ribonucléolytique nécessaire à la prolifération des cellules endothéliales,
- Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) : le Facteur de Nécrose Tumorale- α , une cytokine dont l'activité pro-angiogénique est indirecte puisqu'elle recrute les macrophages qui, eux, sécrètent ensuite du b-FGF,
- Les angiopoïétines qui régulent l'agencement des cellules non-endothéliales de la paroi des vaisseaux (muscles lisses, péricytes et cellules mésenchymateuses),
- Et surtout le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Rini 2005, Salven 1998) ou Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire, très représenté dans les tissus fortement vascularisés et lors du développement embryonnaire ou du développement tumoral. Seul facteur de croissance véritablement spécifique des cellules endothéliales, le VEGF constitue la cible la plus prometteuse d'un point de vue thérapie anticancéreuse. En effet, les cellules tumorales sécrètent de fortes quantités de VEGF pour stimuler la croissance des cellules endothéliales, ce qui permet de générer de nouveaux vaisseaux sanguins irriguant la tumeur.

- **Les facteurs anti-angiogéniques**

Actuellement, il existe huit familles de protéines et glycoprotéines anti-angiogéniques connues. Ces facteurs ont été découverts notamment grâce à l'étude des tissus non vascularisés tel que le cartilage. Ces facteurs sont :

- Les thrombospondines, TSP1 à TSP5, sécrétées par les plaquettes, impliquées dans la migration et la prolifération cellulaires et qui diminuent l'adhésion des cellules endothéliales,

- Le Facteur Plaquettaire 4 (PF-4) sécrété pendant l'agrégation plaquettaire (coagulation). C'est un précurseur, par coupure protéolytique, d'un fragment anti-prolifératif des cellules endothéliales,
- Les Inhibiteurs Tissulaires des Métalloprotéases (TIMP1 à 3), présents dans le cartilage, qui inhibent les métalloprotéases et la prolifération des cellules endothéliales,
- L'angiostatine, issue de la protéolyse du plasminogène, inhibe la prolifération des cellules endothéliales et la croissance des métastases,
- L'endostatine, capable de faire régresser des tumeurs *in vivo* en inhibant spécifiquement la prolifération endothéliale,
- L'interleukine 12 (IL-12), qui, grâce à une activité anti-angiogénique indirecte, est également capable de faire régresser une tumeur et d'empêcher des métastases de s'installer,
- Le fragment 16kDa de la prolactine (16K PRL), anti-angiogénique grâce à son action inhibitrice spécifique des effets du b-FGF et du VEGF,
- Les Interférons (INF α à γ) déjà utilisés en thérapie anti-tumorale pour leur activité anti-prolifératrice, différenciatrice et stimulatrice du système immunitaire, sont également capables d'inhiber la migration et la prolifération des cellules endothéliales.

- **La matrice extracellulaire**

Le troisième acteur de cet équilibre dynamique est la matrice extracellulaire. Essentiellement constituée de collagène, de protéoglycane et de glycoprotéines, elle contient également de nombreuses autres protéines en plus faible quantité. Les protéines qui la constituent sont autant de signaux latents, d'action opposée, permettant la survie cellulaire ou l'apoptose, l'adhésion ou au contraire la migration cellulaire, l'invasion tissulaire et / ou la prolifération cellulaire. Par exemple, les protéoglycanes présentent une activité pro-angiogénique indirecte puisqu'ils potentialisent l'action du b-FGF.

L'absence de facteurs pro-angiogéniques dans un tissu adulte normal, qui caractérise également l'état de quiescence vasculaire, pourrait résulter de la prédominance des inhibiteurs de l'angiogenèse. À l'inverse, la commutation vers l'angiogenèse (ou "switch angiogénique") qui correspond à l'acquisition du phénotype

angiogénique résulterait de l'apparition locale et de la prédominance d'inducteurs angiogéniques (Bouck N. 1996, Hanahan D. 1996)

I-1-2- Étapes de l'angiogenèse

La formation d'un nouveau capillaire sanguin se fait selon les étapes suivantes (figure 26) :

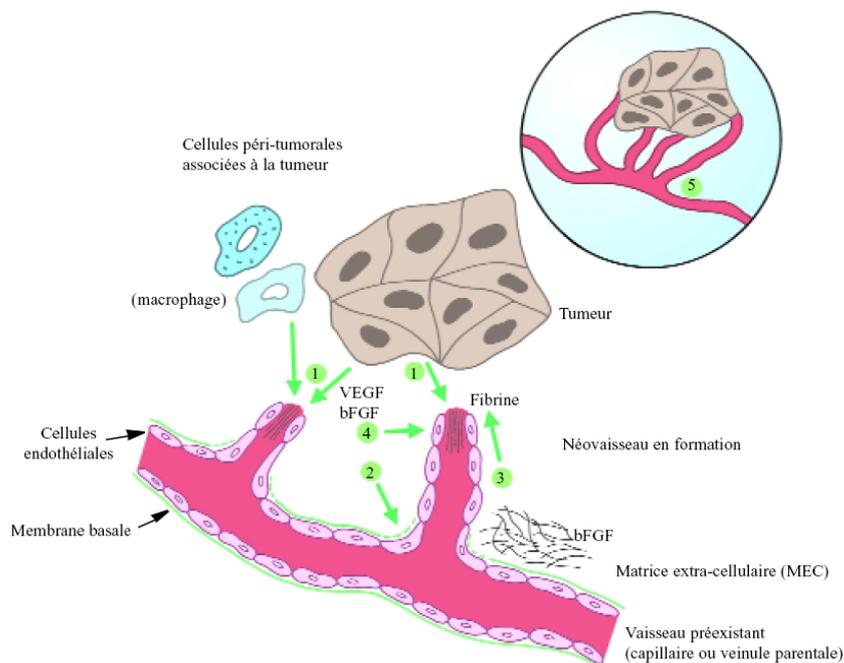


Figure 26 : Représentation schématique des principales étapes de l'angiogenèse (exemple de l'angiogenèse tumorale) (Chabannes E. 2002).

1- Le facteur déclenchant est la libération d'un message chimique par un tissu en situation de carence soit d'oxygène (hypoxie) soit de nutriments. Le VEGF et le FGF sont les facteurs de croissance les plus impliqués dans cette première phase.

2- Au niveau d'un vaisseau sanguin, ces messages induisent d'abord la dégradation localisée de la couche basale et de la matrice extracellulaire afin de dégager la place nécessaire à l'établissement du nouveau vaisseau sanguin.

3- Puis, la libération des facteurs de croissance provoque la migration des cellules endothéliales en direction du gradient de facteur de croissance, conduisant à l'invasion de la matrice extracellulaire par les cellules endothéliales.

4- La prolifération des cellules endothéliales fournit autant de cellules que nécessaire pour former le néo-vaisseau.

5- Après remodelage tissulaire, les cellules endothéliales forment une structure tubulaire.

6- Enfin, la couche basale et la matrice extracellulaire sont reconstituées autour du nouveau vaisseau sanguin.

Lorsque le nouveau vaisseau devient fonctionnel, la situation de carence cesse et l'émission de facteur de croissance s'arrête. Les cellules endothéliales retournent alors à un phénotype quiescent jusqu'à la sollicitation suivante.

I-2- Angiogenèse et cancer

Depuis les travaux de Folkman en 1971, il est établi que l'angiogenèse est indispensable à la croissance des tumeurs solides et à la dissémination tumorale métastatique. Au sein d'un tissu, la taille d'une tumeur non vascularisée ne dépasse pas 2 à 3 mm et en l'absence de vaisseaux, ses besoins en nutriments et en oxygène ainsi que l'élimination de ses déchets ne sont assurés que par diffusion. La capacité d'échange liée à la diffusion est limitée et peut seulement assurer les besoins nutritifs d'une tumeur de petite taille. Pour y remédier, les cellules tumorales sécrètent, sous l'influence d'un facteur induit par l'hypoxie (HIF), des facteurs de croissance afin de détourner à son avantage l'angiogenèse latente (figure 26). Selon le mécanisme détaillé précédemment, la masse tumorale crée un réseau sanguin destiné uniquement à l'alimenter. Une fois ce nouveau réseau vasculaire mis en place, les cellules tumorales continuent de se développer et de se multiplier sans limite au détriment de l'organisme. Cette croissance augmente encore les besoins en oxygène et en nutriments, ce qui nécessite une angiogenèse continue.

Certaines tumeurs humaines peuvent persister pendant des mois voire des années sous la forme d'un carcinome in situ sans néovascularisation. De telles lésions sont habituellement asymptomatiques et cliniquement indétectables jusqu'à ce qu'un groupe de cellules tumorales acquière un phénotype angiogénique aboutissant au développement d'une néovascularisation, à la croissance tumorale et à l'apparition des symptômes.

I-3- Les intégrines

Les intégrines sont des protéines transmembranaires hétérodimériques composées de deux chaînes protéiques distinctes, une chaîne α et une chaîne β (Hynes RO.

2002, Rugg C. 2003). Elles reconnaissent principalement les ligands extracellulaires de la matrice. À ce jour, 18 chaînes α et 8 chaînes β constituant 24 paires hétérodimériques ont été trouvées chez l'homme (Shimaoka M. 2003). Cette diversité d'intégrines permet aux cellules d'accroître leurs possibilités de réponse face aux stimuli macromoléculaires rencontrés dans un organisme. Chaque hétérodimère d'intégrines est caractérisé par un ensemble de fonctions spécifiques.

La sous-unité α , contenant environ 1100 résidus, est caractérisée par la présence, dans le domaine extracellulaire à proximité de l'extrémité N-terminale, de 3 à 4 régions, contenant entre 12 et 15 résidus capables de s'associer à des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) (Haubner R. 1997). Celle-ci est souvent ramifiée au voisinage de la partie transmembranaire par l'établissement d'un pont disulfure. La sous-unité β , plus petite, contient typiquement environ 800 résidus (à l'exception de la chaîne β_4 qui comporte 1750 résidus). Elle présente, à proximité du domaine transmembranaire, 4 domaines hautement conservés et riches en cystéine. La partie N-terminale, exposée vers le milieu extracellulaire, est repliée et forme une large boucle. Les deux chaînes α et β contiennent de courtes parties transmembranaires constituées essentiellement de résidus hydrophobes. Les régions intracellulaires contiennent les extrémités C-terminales des deux chaînes et sont, contrairement aux récepteurs des facteurs de croissance, dépourvues d'activité enzymatique intrinsèque.

Les intégrines jouent un rôle important dans le rattachement des cellules à leur environnement et en particulier au réseau de protéines de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibronectine, vitronectine...) (Jin H. 2004). Leurs rôles principaux lors de l'angiogenèse sont la survie cellulaire, la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

Les chaînes α et β d'intégrines forment ensemble le site de liaison de ligands extracellulaires. La plupart des intégrines peuvent s'associer à plusieurs ligands, avec des affinités variables et en reconnaissant des motifs de liaison structurellement très divers. Certaines sont capables de reconnaître des protéines de la matrice ou des récepteurs d'adhérence cellulaire, comme l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ présente au niveau des cellules endothéliales, qui lie la fibronectine. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a de nombreux ligands, tous caractérisés par un motif de liaison relativement simple, la séquence

peptidique arginine- glycine- acide aspartique. Ce motif, de conformation spécifique, se retrouve sur de nombreuses protéines extracellulaires ainsi que sur certains récepteurs d'adhérence. Le motif "RGD" est également reconnu par d'autres intégrines telles que $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_v\beta_6$. Ce sont des résidus adjacents qui déterminent la spécificité et l'affinité des liaisons aux intégrines.

I-4- Intégrines $\alpha_v\beta_3$

I-4-1-Structure, fonction, et distribution de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Intégrine parmi les plus répandues, $\alpha_v\beta_3$, est exprimée par presque toutes les cellules provenant du mésenchyme et par une variété de cellules constituant les vaisseaux sanguins telles que les cellules endothéliales et les fibroblastes, ainsi que par les macrophages, et les plaquettes. Cette intégrine joue un rôle important dans de nombreux événements biologiques tels que l'angiogenèse, la migration des SMCs vasculaire, et l'adhérence des ostéoclastes à la matrice osseuse. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ reconnaît plusieurs protéines de la matrice extracellulaires dont la vitronectine, la fibronectine, l'ostéopontine et le fibrinogène.

Il est maintenant bien établi que le processus d'angiogenèse requiert la migration et l'adhésion des cellules endothéliales sur la matrice extracellulaire pour la formation des nouveaux vaisseaux. Ces deux phénomènes sollicitent l'intervention de molécules d'adhésion spécialisées, parmi lesquelles l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle important. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est toutefois surexprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux néo-angiogéniques et a également été mise en évidence sur de nombreuses lignées tumorales humaines. Elle est une cible très attrayante pour le développement d'agents anti-angiogéniques et anti-métastatiques (Liu S. 2005, Chen X. 2006).

I-4-2-Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

En 2001, Xiong et al. ont décrit la structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ grâce à l'étude cristallographique par rayons X (Xiong JP. 2001)(Figure 27),

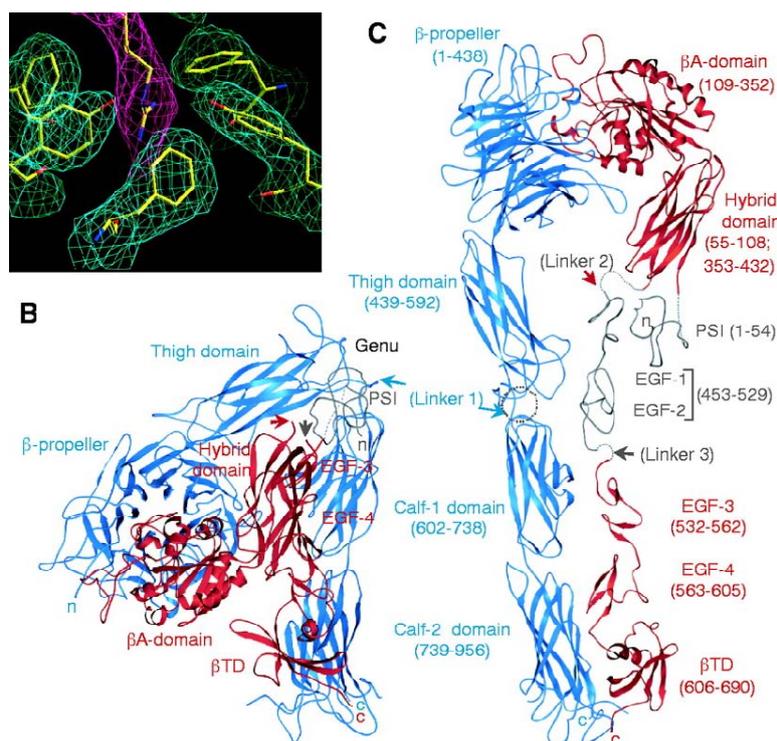


Figure 27 : Représentation en ruban de la partie extracellulaire cristallisée de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (sous-unité α_v en bleu, sous-unité β_3 en rouge). B/ Structure cristalline du récepteur, C/ Modèle du récepteur déployé (Xiong J. P2001).

La plupart des ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ interagissent avec celle-ci par une séquence peptidique RGD. Bien que le modèle d'activation de l'intégrine ne soit pas encore certain, il pourrait s'agir d'un mécanisme en deux étapes : le premier stade à faible affinité pour le ligand serait activé par des événements intracellulaires et conduirait à un stade de haute affinité. Ce dernier est caractérisé par un changement de conformation observé par cristallographie. L'interaction intégrine / ligand est stabilisée par la présence de cations (Xiong JP. 2002). Il est admis que la sous-unité α_v lie l'acide aminé arginine (R, ou Arg) de la séquence peptidique RGD reconnue, au niveau de la région hélice- β alors que l'acide aminé aspartique (D ou Asp) se lie à la sous-unité β_3 au niveau de domaine βA (Wittekindt C. 2004, Shimaoka M. 2003). La glycine (G ou Gly) n'interagit pas de manière spécifique avec les différents domaines mais agit comme un espaceur. L'ensemble du site de reconnaissance est très confiné puisque les contacts s'effectuent dans une zone de 350\AA^2 ($1\text{\AA} = 0.1\text{ nm}$) environ. Les liaisons RGD / intégrine sont essentiellement de nature électrostatique dues aux charges positives de l'arginine et négatives de l'acide aspartique, et pour une moindre partie de nature hydrophobe (Takagi J. 2004).

I-4-3- Ligands endogènes de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$

La séquence -RGD- (-Arg-Gly-Asp-) est un motif commun présent sur la plupart des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la vitronectine, l'ostéopontine, la thrombospondine, le facteur Von Willebrandt, ainsi que sur le fibrinogène (protéine sanguine soluble) (Kokubo T. 2007). De nombreuses intégrines (environ la moitié des hétérodimères) reconnaissent et interagissent avec leurs substrats protéiques via la séquence -RGD-. C'est particulièrement le cas des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, récepteur plaquettaire du fibrinogène, $\alpha_5\beta_1$, récepteur endothélial de la fibronectine, et $\alpha_V\beta_3$, récepteur endothélial de la vitronectine.

Toutefois, s'ils ont en commun le motif -RGD-, ces substrats ont néanmoins des affinités différentes pour les différentes intégrines. La spécificité d'une intégrine pour un substrat est attribuée à la conformation du motif -RGD- dans la protéine, ainsi qu'aux séquences des résidus adjacents.

Ces observations sont à la base du développement des ligands peptidiques synthétiques « -RGD- », spécifiques de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.

I-4-4-Ligands synthétiques de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$; Motif RGD

En 1984, Piershbacher et al ont découvert les séquences peptidiques RGD, nécessaires à l'attachement des cellules à la fibronectine. Cette étude a montré que les peptides synthétiques contenant le motif RGD inhibent l'attachement des cellules rénales de rats à la fibronectine. De plus, le changement d'un acide aminé du triplet RGD au niveau des protéines matricielles entraîne le détachement des cellules de la fibronectine, ainsi que de la vitronectine (Hayman EG. 1985).

L'inhibition de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ avec des peptides cycliques RGD, tel que le EMD 121974, a entraîné une induction de l'apoptose d'endothéliale (Brook PC. 1994), une inhibition de l'angiogenèse (Giannis A. 1997) et une augmentation de la perméabilité endothéliale (Qiao RL. 1995). L'inhibition de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ a également été associée à la diminution de la croissance tumorale dans les xénogreffes de cancer du sein. Cette inhibition réduit également la proportion de métastases (Burke PA. 2001).

Cependant, il y a plusieurs défis pour les essais cliniques anti-angiogéniques :

- (a) le choix des patients qui bénéficieront du traitement anti-angiogénique,
- (b) la surveillance de l'efficacité thérapeutique du traitement, et

(c) l'optimisation de la dose et du programme de traitement anti-angiogénique dans les cas de cancers (Liu S. 2006).

Il serait donc nécessaire de développer un agent d'imagerie qui pourrait être utilisé pour mesurer de manière non invasive le niveau d'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avant et pendant la thérapie.

Récemment, beaucoup de dérivés RGD radioactifs ont été évalués pour leur potentiel. Le progrès principal a été accompli sur leur utilisation dans l'imagerie des tumeurs par TEMP ou TEP, notamment dans les modèles précliniques animaux puis plus récemment chez l'homme (Haubner R. 2005).

- **Les dérivés linéaires de RGD :**

L'un des principaux objectifs de la synthèse d'analogues de type RGD est l'amélioration de l'affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Théoriquement, des dérivés de RGD (contenant un ou plusieurs groupes de RGD) peuvent être linéaires ou cycliques. Sivolapenko et al. (1998) ont synthétisé un décapeptide $\alpha P2$ (RGD-SCRGDSY) linéaire marqué au ^{99m}Tc contenant deux motifs RGD. Injecté à des patients porteurs de mélanomes métastatiques, ce peptide a permis la détection des tumeurs par imagerie SPECT. Cet exemple est rare car les peptides linéaires de type RGD sont plus rapidement dégradés par les protéases du sérum que les peptides cycliques. Par exemple, le dérivé linéaire de RGD (KPQVTRGDFTEG-NH₂), synthétisé et radiomarké au ^{18}F par Sutcliffe-Goulden (Sutcliffe-Goulden JL. 2002), a montré chez la souris Balb/c porteuse d'une tumeur colorectale, une captation tumorale très faible. Les peptides linéaires présentent donc généralement une faible affinité ($\text{IC}_{50} > 100 \text{ nM}$), un manque de spécificité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par rapport à l'intégrine GPIIb/IIIa et sont rapidement dégradés dans le sang; ceci limite leur utilisation pour l'imagerie tumorale (Liu S. 2005, 2006).

- **Les dérivés cycliques de RGD.**

La cyclisation des peptides RGD par l'intermédiaire de bisulfures, de thioethers, de cycles aromatiques rigides ou d'autres hétérocycles, confère aux peptides des affinités et une sélectivité variables pour un type d'intégrine (Gottschalk KE. 2002).

D'après différentes études portant sur l'effet de la structure du peptide RGD vis-à-vis de son affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, Liu et al. (2006) ont démontré (figure 28) que les structures penta-peptides cycliques contenant le motif RGD possèdent les meilleures

affinité et sélectivité de liaison pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. De plus, l'acide aminé en position 5 n'a pas d'influence significative sur l'affinité du peptide pour l'intégrine. Ainsi, l'acide aminé valine (V) de c(RGDfV) peut être remplacé par une lysine (K) ou un acide glutamique (E) sans modifier l'affinité du peptide pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

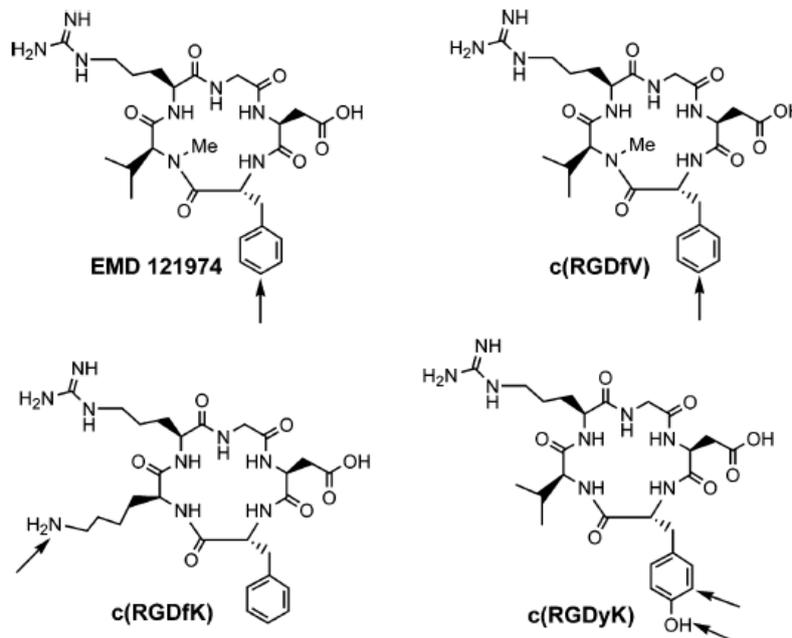


Figure 28 : Les structures optimisées des RGD cycliques en tant que ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Les flèches indiquent les emplacements possibles pour la fixation directe d'un radio-isotope ou pour former un chélate avec un radio-isotope (Liu S. 2006).

I-5-Concept de multivalence

Les ligands naturels de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, telle que la vitronectine, possèdent souvent plusieurs motifs RGD impliqués dans la liaison à l'intégrine. Afin d'améliorer l'affinité et l'avidité des peptides synthétisés, des ligands multivalents ont de ce fait été mis au point afin d'induire la captation cellulaire via la voie d'endocytose dépendante de l'intégrine (Boturyn D. 2004).

I-5-1- c-[RGDfK] Dimère

Rajopadhye et al (2000) ont développé le premier radiotraceur cyclo-RGD dimérique, $E[c(RGDfK)]_2$ (figure 29), à fin diagnostique, marquable au ^{99m}Tc et à ^{111}In , ou thérapeutique, pouvant être marqué à ^{90}Y ou au ^{177}Lu .

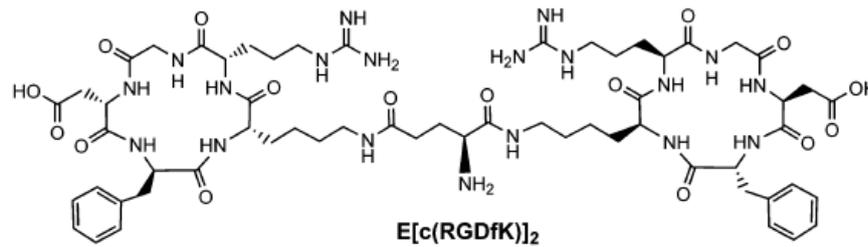


Figure 29 : Structure de E[c(RGDfK)]₂

La faible distance (~20 liaisons) séparant les deux motifs RGD rend peu probable l'interaction simultanée avec deux intégrines $\alpha_v\beta_3$ adjacentes. Cependant, la liaison d'un motif de RGD à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ augmente significativement « la concentration locale » du deuxième motif de RGD à proximité du site de liaison : ceci pourrait augmenter le taux de liaison à $\alpha_v\beta_3$ ou réduire la dissociation de cette liaison. La « concentration local de RGD » élevée peut expliquer la captation tumorale plus forte et le temps de captation plus long des dimères cycliques radioactifs (^{99m}Tc , ^{111}In , ^{90}Y , ^{18}F , et ^{64}Cu) par rapport à leurs analogues monomériques (Liu S. 2006).

I-5-2- c-[RGDfK] tétramère

Plusieurs groupes de recherche ont appliqué le concept de polyvalence pour synthétiser de nouvelles molécules, telles que les RGD-cyclique tétramériques. Boturny et al. (2004) ont synthétisé une série de c-[RGDfK] tétramères et ont constaté que la multivalence du peptide augmente significativement l'affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les analyses *in vitro*. Des résultats similaires ont été obtenus par Wu et al. (2005) avec un autre tétramère de c-[RGDfK].

I-5-3- Considérations pharmacocinétiques pour le développement de dérivés de RGD

La considération pharmacocinétique principale pour l'imagerie des tumeurs par un médicament est qu'il doit avoir une captation tumorale (rapport de l'activité tumorale / activité résiduelle (bruit de fond) ou rapport T/B) importante dans la période la plus courte possible. Le caractère lipophile des molécules entraîne leur élimination par voie hépatique ; de plus, la fixation aux protéines circulantes a comme conséquence une plus longue rétention de la radioactivité dans le sang. Ces

deux facteurs « élimination hépatobiliaire » et « forte fixation protéique » sont préjudiciables à un rapport T/B élevé. Par conséquent, un but important de la recherche sur les traceurs de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est d'améliorer les rapports de T/B par modification de la cinétique d'élimination des traceurs radioactifs. À cette fin, des groupements glucose, galactose ou des chaînes d'acides aminés hydrophiles ont été ajoutés à la structure (Liu S. 2006).

La fixation d'une fonction glycosylée sur la base RGD augmente l'élimination rénale et favorise un rapport T/B élevé. Des séquences tripeptidiques d'acide aspartique et de sérine (figure 30) ont été également utilisées par Poethko et al. (2003) pour modifier la cinétique d'excrétion du peptide ^{18}F -c(RGDfK). Les deux peptides ainsi modifiés ^{18}F -Asp³-RGD et ^{18}F -Ser³-RGD ont alors des caractéristiques de biodistribution et d'élimination comparables à ceux du galacto-RGD- ^{18}F (figure 31).

Une autre approche consiste à fixer une chaîne polyéthylène glycol sur la structure RGD afin d'améliorer la rétention tumorale par internalisation de la molécule. Un polyéthylène glycol (PEG) greffé au cyclo-RGD améliore également de manière significative le rapport T/B (Harris 2003). Chen et al. ont également constaté que le couplage au PEG (figure 14) peut améliorer la captation tumorale et la cinétique d'élimination des dérivés de RGD monocycliques marqués à l' ^{125}I et au ^{18}F c(RGDyK) ou du dimère ^{64}Cu -E [c(RGDyK)]₂ (Chen X. 2004 (1,2), 2005). De même, le HEG (hexaéthylène d'acide glycolique) peut être utilisé comme espaceur des cycles RGD fluorés, et le couplage au diacide cystéique améliore l'élimination sanguine et réduit les captations hépatique et rénale (Harris TD. 2003, Onthank 2004).

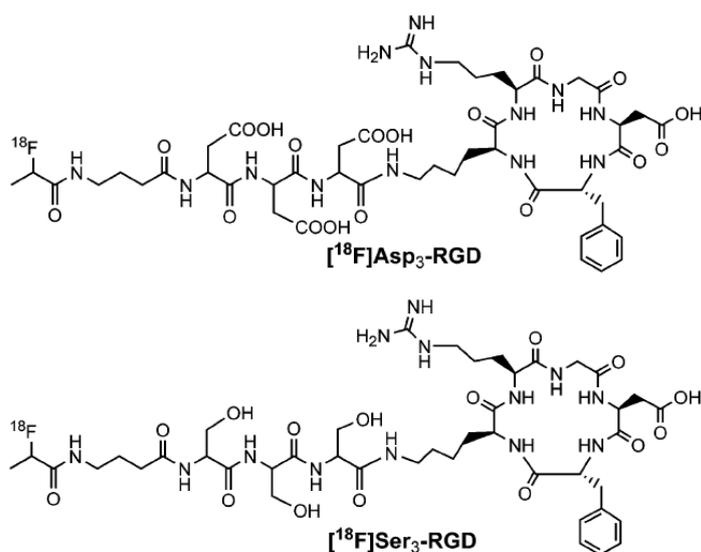


Figure 30 : Structure de ^{18}F -Asp³-RGD et de ^{18}F -Ser³-RGD (Haubner R. 2005).

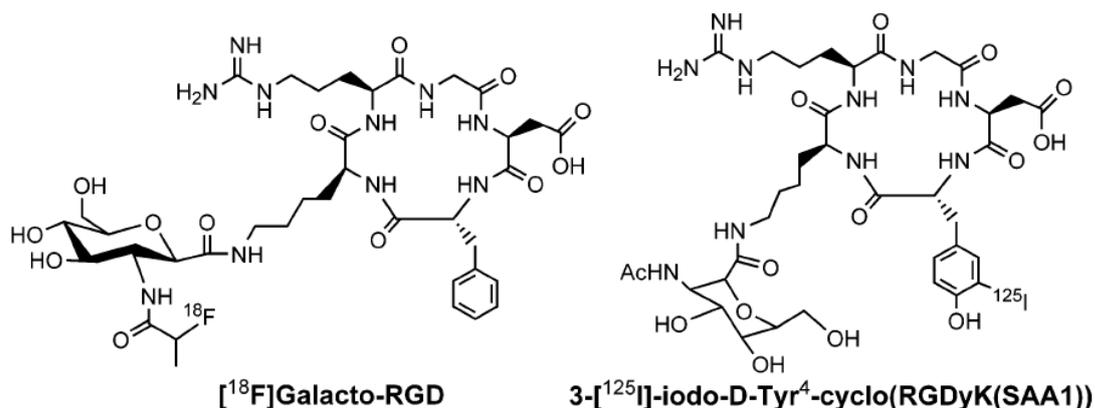


Figure 31: Exemples de dérivés de cyclo-RGD radiomarqués (Liu S. 2006).

I-6-Captation rénale des dérivés de RGD :

Les petites biomolécules circulantes sont filtrées par les capillaires glomérulaires des reins et peuvent être réabsorbées via les cellules tubulaires proximales par endocytose. Les membranes des cellules tubulaires rénales chargées négativement retiennent les acides aminés de charge positive. Les groupes carboxylique et sulfonique sont déprotonés en conditions physiologiques. Par conséquent, les acides aminés négativement chargés, seuls ou en courtes séquences, ont été proposés comme linker entre les cyclo-RGD afin de réduire la captation rénale (Liu S. 2002, 2004).

I-7- RGD et traitement anti-angiogénique

La formation des vaisseaux sanguins tumoraux est sous le contrôle de l'activation, la prolifération, l'adhésion, la migration et la différenciation des cellules endothéliales. Par conséquent, chacun de ces phénomènes constitue une cible potentielle pour le développement de molécules anti-angiogéniques.

Dans cette optique, la Vitaxine et le Cilengitide, deux molécules liant le récepteur $\alpha_v\beta_3$ ont été développés. La Vitaxine est un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Tucker GC. 2003), tandis que le Cilengitide (MD121974) est un petit peptide cyclique contenant le motif -RGD- (Smith JW. 2003).

De multiples dérivés des peptides RGD (Okro'j M. 2003) et d'anticorps ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comme le 17E6 (Mitjans F. 2000) ou d'autres facteurs clés de l'angiogenèse comme le VEGF ont été développés dans ce but.

I-8- Conclusions :

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.

Comme il a été démontré, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ paraît être une cible pertinente dans l'imagerie des néovaisseaux tumoraux. Ainsi, les peptides RGD représentent non seulement des agents potentiels de dépistage précoce et de surveillance de la réponse au traitement anti-tumoral, mais pourraient également être utilisés comme une nouvelle stratégie thérapeutique.

L'utilisation de ligands RGD multivalents (dimère ou tétramère) pourrait conférer des propriétés particulières aux traceurs notamment lors de la captation cellulaire. Au cours de ces dernières années, les peptides RGD radioactifs ont été utilisés en tant qu'agents de détection tumorale par TEMP ou TEP sur divers modèles animaux et plus récemment chez l'homme. Cette utilisation répond aux objectifs suivants :

- La quantification relative des néovaisseaux est un indicateur pronostic potentiel métastatique tumoral,
- Compte tenu du nombre de thérapies anti-angiogéniques en développement, la présence ou non de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ au niveau même de la tumeur doit être déterminée 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 pourrait permettre de démontrer l'intérêt du protocole thérapeutique ou au contraire d'arrêter une cure inefficace.

Des dérivés de peptides-RGD radioactifs, marqués par des émetteurs β^- , pourraient également avoir une indication thérapeutique dans le cas de traitement de tumeurs surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

I-9- Angiogenèse et le peptide HARP

Comme il a été décrit précédemment, l'angiogenèse conduit à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ce mécanisme est défini comme un processus dynamique induit par les facteurs angiogéniques. L'un de ces facteurs est l'« Heparin Affin Regulatory peptide » (HARP), également nommé pléiotrophine, le plus souvent exprimé par les cellules tumorales elles-mêmes (Courty 1991).

HARP (Courty J. 1991) est un peptide de 136 acides aminés qui constitue, avec la protéine Midkine (MK) (Muramatsu T. 1993), une nouvelle famille de facteurs de croissance à forte affinité pour l'héparine. Initialement, HARP a été isolé à partir de cerveaux de rats nouveaux-nés en tant que molécule induisant *in vitro* une forte croissance dendritique et axonale (Rauvala H. 1989), suggérant que ce peptide soit impliqué dans la maturation des neurones (Merenmies J. 1990).

Par la suite, des études ont montré que ce peptide était aussi présent dans d'autres organes ou tissus tels que le cœur (Hampton BS. 1992), l'utérus, les cartilages et l'os (Laaroubi K. 1994), démontrant que la fonction de HARP ne se limite pas à l'activation de la croissance neuronale. L'implication de HARP dans la régulation de l'angiogenèse tumorale a été décrite par Choudhuri et al. (Choudhuri R. 1997). Lors d'expériences de croissance tumorale MCF-7 chez la souris Nude, cet auteur a démontré que les cellules tumorales surexprimant le peptide HARP se développent plus rapidement que les cellules MCF-7 natives *in vivo*. De plus, cette augmentation de la croissance tumorale est corrélée à une augmentation de la densité vasculaire. Plus récemment, Soulie et al. (Soulie P. 2002) ont réalisé des dosages sériques de HARP et MK chez des patients atteints de tumeurs solides de stade avancé (métastatique dans 94% des cas), par test ELISA. Les résultats montrent que les niveaux d'expression de HARP et MK sont augmentés dans 53% des cas.

La structure moléculaire du peptide HARP est représentée dans la figure ci-dessous (figure 32). Ce peptide de 15 kDa contient deux domaines basiques en N- et C-terminal et deux domaines homologues à la thrombospondine de type 1 (en rouge sur le diagramme).

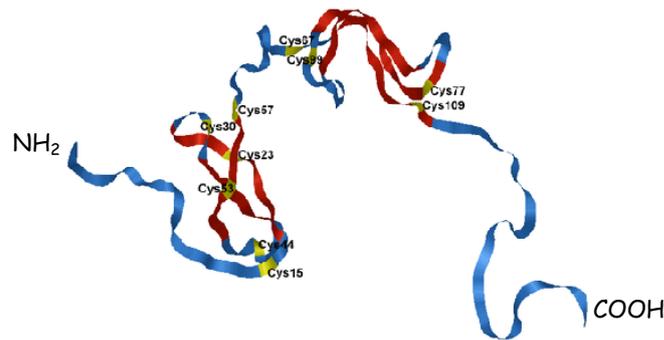


Figure 32 : Structure moléculaire du peptide HARP (Courty J. 2006)

Comme la plupart des facteurs de croissance, l'activité biologique de HARP est due à une interaction directe avec son récepteur transmembranaire au stade de haute affinité ($K_D = 50\text{pM}$), récepteur dont l'activité tyrosine kinase active la voie des MAP-kinases. Ce récepteur nommé ALK, ou "anaplastic lymphoma kinases", a été décrit en 2001 par Stoica et al. (Stoica GE. 2001).

I-9-1- Mécanisme d'action de HARP

L'activité biologique du peptide HARP dépend de son interaction avec les glycoaminoglycanes (GAG) comme les héparanes sulfates ou les chondroïtines sulfates (Delbé J. 1995, Vacherot F. 1999). L'activité mitogénique de HARP est potentialisée en présence d'héparine, d'héparane sulfate et de chondroïtine sulfate A et B; ainsi, les héparinases suppriment l'activité mitogénique de HARP alors que l'ajout d'héparine ou de GAG rétablit son activité.

De plus, les GAG induisent la dimérisation de HARP, entraînant la dimérisation de son récepteur ALK et ainsi la transduction du signal intracellulaire (Figure 33) (Bernard- Pierrot I. 2002).

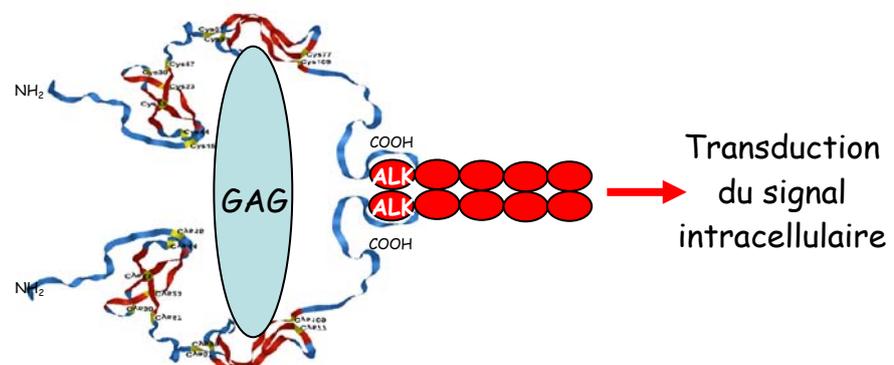
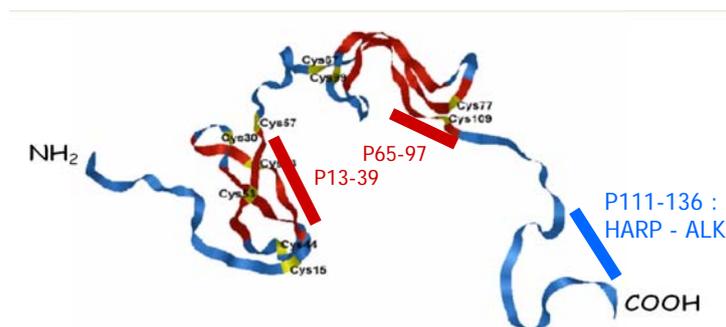


Figure 33 : Mécanisme d'action de HARP(Courty J. 2006).

Ces différentes études ont permis d'identifier les domaines moléculaires nécessaires à l'activité biologique de HARP et ont conduit au développement d'inhibiteurs spécifiques de ce peptide.

- Bernard-Pierrot et al. (2002) ont démontré que la partie C-terminale de HARP correspondant aux 26 derniers acides aminés (acides aminés 111 à 136) (figure 34) est directement liée à l'interaction de HARP avec ALK et par conséquent à l'induction d'activité biologique du peptide. Dans cette étude, ils ont démontré que le peptide HARP tronqué (acides aminés 1 à 110) possède une très faible activité angiogénique.
- D'autres études ont montré que la séquence homologue à la thrombospondine de type 1 est nécessaire à :
 1. L'interaction de HARP avec les GAG (HAMMA-Kourbali Y. 2008),
 2. L'interaction avec le VEGF ou "vascular endothelial growth factor", fortement impliqué dans le processus d'angiogenèse (Hérulet M. 2004).



Erreur !

Figure 34 : Représentation des séquences de HARP possédant une activité biologique (Courty J. 2006).

Deux familles de peptides ont été élaborées et correspondent aux domaines nécessaires à l'activité biologique de HARP:

- Le domaine C-terminal de HARP (P111-136)
- Les deux domaines thrombospondine-like de HARP : (P13 - 39) et (P65 - 97).

Des expériences d'inhibition de la croissance tumorale sur souris Nude ont été conduites, à l'aide d'un modèle de carcinome prostatique humain (PC-3). Après développement des tumeurs, les souris ont été traitées ou non avec le peptide P111-136. Les souris du groupe traité présentent une diminution de 55% des vaisseaux tumoraux, ce qui confirme l'activité anti-angiogénique de ce peptide (figure 35).

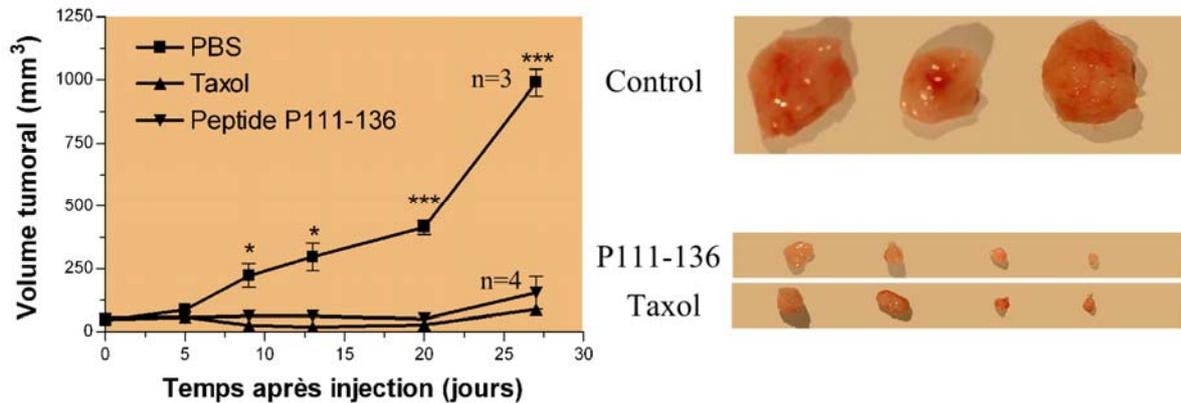


Figure 35 : Effet du peptide P111-136 sur la croissance tumorale de PC-3 injectées en s.c. chez la souris Nude. Après développement tumoral, les souris sont traitées avec une solution de PBS (groupe contrôle), du Taxol (15 mg / kg) ou avec le peptide P111 - 136 (5mg/kg) (Courty J. 2006).

Il est admis que le peptide P111-136 inhibe l'interaction de HARP avec son récepteur au stade de haute affinité, alors que les peptides P13-39 et P65-97 inhibent l'activité biologique de HARP par interaction avec le récepteur au stade de faible affinité.

Récemment, le peptide P111-124 a été synthétisé par laboratoire CRRET, Paris XII, UMR CNRS-7149 ; les propriétés anti-angiogéniques, la biodistribution et les études d'imagerie non-invasive sur petit animal de ce peptide sont en cours d'évaluation par notre équipe (INSERM- U877).

II- Les maladies cardiovasculaires et athérosclérose

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent la première cause de mortalité dans le monde occidental (28% de tous les décès par an) (Organisation Mondiale de la Santé, 2003). En dépit de progrès importants dans le diagnostic et le traitement de ces maladies au cours des 25 dernières années, elles restent encore la cause la plus fréquente de mortalité dans le monde (plus de 4 millions /an soit 49% en Europe) (Petersen, 2005). Le coût économique de ces maladies est estimé dans l'Union Européenne à 169 milliards d'euros (Petersen S. 2005 ; Leal J. 2006), dont plus de 10% de cette somme pour la France (Leal J. 2006).

L'athérosclérose, pathologie inflammatoire chronique, est responsable des principaux événements coronariens. De nombreuses études ont amélioré la connaissance de cette pathologie, caractérisée par différents stades en fonction de la composition de la plaque.

Actuellement, aucune méthode d'imagerie non invasive ne permet de mettre en évidence les plaques d'athérome vulnérables. La Médecine Nucléaire peut apporter ses méthodes. De nombreuses cibles ont été étudiées (LDL-^{99m}Tc, LDL-¹²³I, ...) mais aucune n'est suffisamment spécifique des plaques vulnérables.

L'objectif de ce projet est de mettre au point un radiopharmaceutique permettant de détecter la présence de plaques vulnérables afin de 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.

II-1-Physiopathologie de l'athérosclérose

L'athérosclérose est caractérisée par l'accumulation de lipides, de cellules inflammatoires, et de tissu conjonctif dans la paroi artérielle (Davies JR. 2004). C'est une maladie chronique et progressive avec une phase asymptomatique longue. L'anomalie initiale est un dépôt, se traduisant par une coloration jaunâtre macroscopiquement visible sur la surface endothéliale d'une artère et causée par

l'accumulation de lipides et de macrophages. Celle-ci se développe en une plaque athérosclérotique se composant d'un cœur central lipidique limité du côté de la lumière par une chape fibreuse contenant des cellules musculaires lisses (VSMCs) et du tissu conjonctif (en particulier du collagène). Pendant que la plaque se développe, le diamètre total du vaisseau augmente de manière à ce que le débit sanguin soit préservé (remodelage positif, ou développement excentrique de la plaque). En conséquence, les grandes lésions athérosclérotiques peuvent s'accumuler sans changement de débit sanguin ou de production de symptômes alarmants. Finalement, l'artère ne peut plus se dilater, et la plaque commence à envahir la lumière du vaisseau, perturbant ainsi la circulation sanguine.

L'athérosclérose reste cliniquement silencieuse jusqu'à ce que deux événements donnent l'alerte ; premièrement, le débit sanguin diminue et produit des symptômes d'ischémie réversible, tels que l'angine. Deuxièmement, la chape fibreuse se rompt, résultant en l'exposition dans la lumière du vaisseau du collagène sub- endothélial et des lipides (Fuster 1996). Ceci mène à l'activation des plaquettes et des coagulants. L'activation de ces plaquettes produit une surexpression des récepteurs de la glycoprotéine IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) à leur surface qui, une fois stimulée, favorise l'agrégation. De l'activation des facteurs VII et XI résulte la production de thrombine, de fibrinogène, et de fibrines, et la production d'un thrombus responsable des symptômes de l'accident coronaire.

Le déclenchement, la progression et la rupture finale d'une plaque athérosclérotique vulnérable (figure 36) avec comme conséquence un événement thrombo- embolique, sont bien décrits. Le processus de l'athérogénèse se produit principalement dans les artères de grande et moyen diamètre et implique un dysfonctionnement endothélial, une inflammation, une accumulation de cholestérol, un phénomène d'apoptose, une dégradation extracellulaire de matrice et un stress oxydatif (Corti 2004). En outre, l'athérosclérose est nettement accélérée par la présence de facteurs de risque cardiovasculaires principaux tels que l'hypercholestérolémie, l'hypertension, le tabagisme et l'obésité, qui agissent sur l'endothélium de la paroi artérielle en favorisant la formation des plaques athérosclérotiques (Naghavi M. 2003). Ces plaques athérosclérotiques sont des épaissements localisés asymétriques de l'intima et se composent de différents types cellulaires (monocytes circulants, endothéliales et musculaires lisses), de lipides, de débris cellulaires et de tissu conjonctif (Libby P. & Theroux P. 2005)

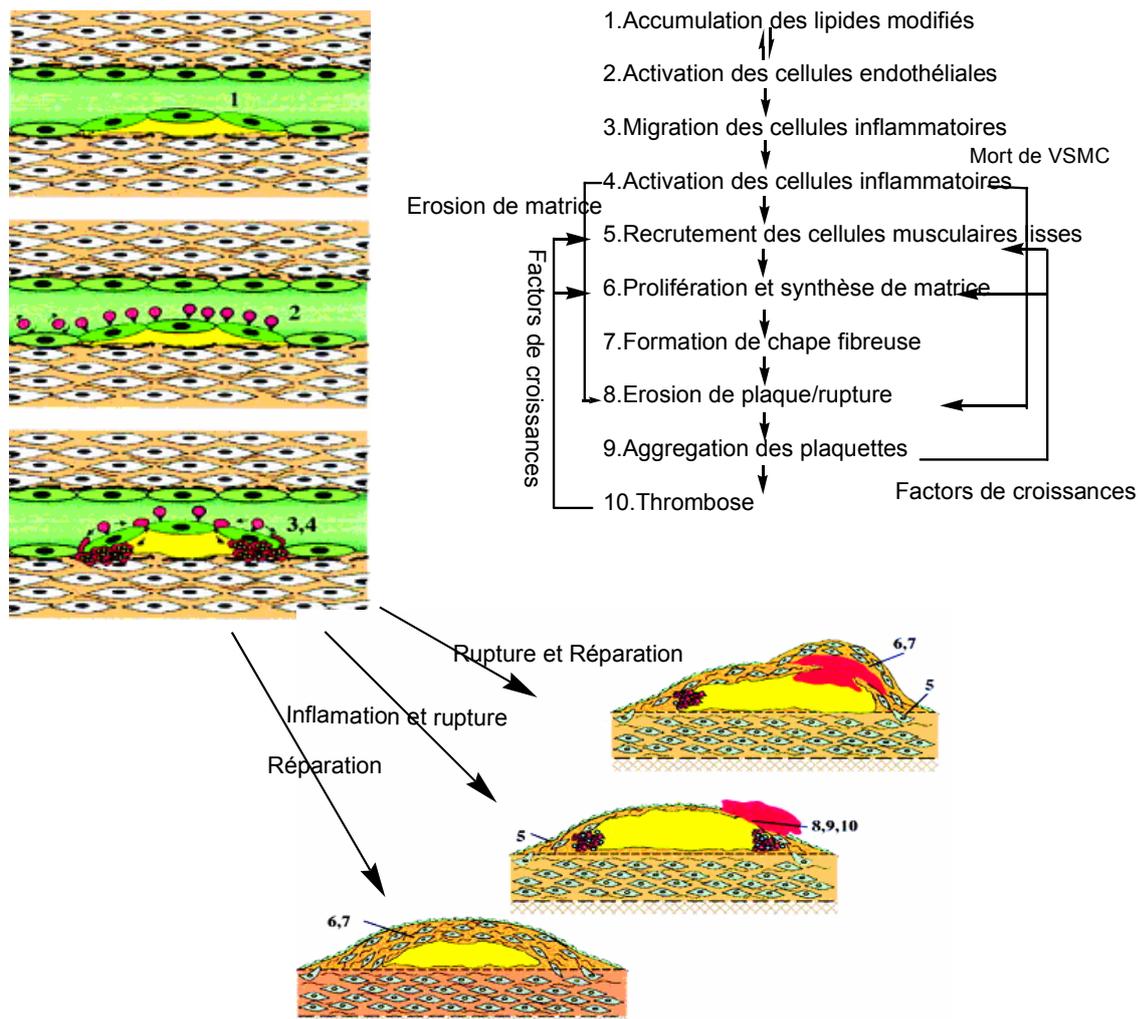


Figure 36 : Interactions cellulaires pendant le développement et la progression de l'athérosclérose (Davies JR. 2004)

II-1-1-Le dysfonctionnement endothélial

L'endothélium constitue l'interface entre la circulation sanguine et la paroi artérielle. Ses cellules jouent un rôle critique dans l'homéostasie vasculaire en tant que barrière donnant lieu à une perméabilité sélective entre les cellules sanguines et les tissus.

Le dysfonctionnement des cellules endothéliales est la première manifestation physiologique détectable de l'athérosclérose (Behrendt D. 2002). On a montré que les principaux facteurs de risque athérogéniques, tels que le tabagisme, le niveau élevé de LDL, l'hypertension, et le diabète, perturbent la fonction endothéliale. L'endothélium normal a des fonctions antithrombotiques, anti-inflammatoires, et vasomodulatrices par la sécrétion de substances telles que la prostacycline et l'oxyde nitrique (NO), qui empêchent l'activation des plaquettes et favorisent la

vasodilatation (Davies JR. 2004). En outre, le NO empêche l'expression des molécules d'adhérence responsables du recrutement de cellules inflammatoires. La fonction de barrière et la capacité sécrétrice de l'endothélium sont perturbées dans l'athérosclérose. Ceci se manifeste par une augmentation de perméabilité aux lipides et aux cellules inflammatoires, principalement les monocytes et les lymphocytes T.

II-1-2-Rétention du cholestérol dans intima

L'hypercholestérolémie et les autres formes de dyslipidémie athérogène favorisent l'activation de l'endothélium dans les grandes et moyennes artères. Cette pathologie est suivie par une accumulation de LDL (et de VLDL). La différence entre les taux d'entrée et de sortie des LDL dans l'intima, qui correspond à la quantité de LDL lié ou dégradé aux cellules de la matrice, est un élément critique dans la formation des lésions athérosclérotiques. L'évidence jusqu'ici indique que la captation des LDL, leur concentration et leur période de séjour dans l'intima est significativement augmentée à l'emplacement des plaques. D'ailleurs, des niveaux élevés de LDL circulantes, augmentent l'accumulation des LDL et les risques cardiovasculaires.

II-1-3-Formation de LDL oxydés

Après avoir traversé l'endothélium, les LDL sont captées dans l'intima grâce à l'interaction électrostatique entre leur composant protéique « apoB100 » et la matrice de protéoglycanes. Les LDLs captées subissent des modifications selon différents processus, comme l'oxydation, la protéolyse, la lipolyse et l'agrégation (Berliner JA. & Heinecke JW. 1996). La formation des lipides oxydés et biologiquement actifs est un facteur principal dans le déclenchement de la réponse inflammatoire dans la paroi artérielle. Ces lipides oxydés sont également les modulateurs efficaces des facteurs de transcription et de l'expression nucléaire de gènes dans des cellules cibles. (Lusis AJ. 2000).

En effet, les LDL, même faiblement modifiées, possèdent un pouvoir liant à des phospholipides oxydés contenant des acides gras polyinsaturés. Ces LDL peuvent alors conduire les cellules endothéliales à exprimer des molécules d'adhérence pour des monocytes tels qu'ICAM-1 et VCAM-1. En conséquence, les monocytes circulants s'approchent de l'endothélium, y adhèrent, et migrent ensuite par diapédèse à travers les cellules endothéliales jusque dans l'espace sub-endothélial. Plusieurs protéines chimiotactiques telles que « la protéine chimiotactique

monocytaire » et son récepteur, CCR2, renforcent ce processus (Tedgui et Mallat 2001).

II-1-4-Rôle des monocytes- macrophages

Les monocytes-macrophages captent les LDLs fortement oxydées par l'intermédiaire de récepteurs « scavengers », principalement SR - A et CD36 et se transforment en cellules spumeuses caractérisées par la présence cytoplasmique de nombreux dérivés du cholestérol et de LDLs.

Les cellules spumeuses sécrètent également des médiateurs de l'inflammation tels que le facteur déclenchant l'activation des plaquettes, des interleukines (IL), des phospholipases et des métalloprotéases. En effet, les cytokines et les facteurs de croissance secrétés par les macrophages et les cellules T sont importants pour la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi que pour la production de la matrice extracellulaire de la plaque athérosclérotique vulnérable.

En outre, les macrophages, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales contribuent également à la réaction inflammatoire par l'intermédiaire du CD40, qu'elles expriment à leur surface. L'activation de ce récepteur mène à la production des cytokines inflammatoires, métalloprotéases et protéines d'adhérence. (Hansson GK. 2005).

II-1-5-La dimension immuno-inflammatoire de l'athérosclérose

Les cellules du système immunitaire telles que des lymphocytes T, les monocytes, les macrophages et les mastocytes parcourent le tissu (la paroi artérielle athérosclérotique) à la recherche de l'antigène. Les lymphocytes T infiltrés sont en général présents dans les lésions athérosclérotiques. Elles consistent principalement en CD4+, qui reconnaît l'antigène des molécules MHC classe II (Hansson GK. 2005). La liaison de l'antigène au récepteur des cellules T, lance une cascade d'activation et mène à l'expression d'un ensemble de cytokines et d'enzymes. Ensuite, les cytokines stimulent la production des facteurs pro-inflammatoires. De cette façon, l'activation d'un nombre limité de cellules d'immunitaire peut lancer une inflammation.

Ainsi, le déséquilibre « dynamique » entre l'activité inflammatoire et anti-inflammatoire est un facteur important dans la progression de l'athérosclérose (Sposito AC. & Chapman MJ. 2002).

II-1-6-La dimension de l'apoptose

La plaque d'athérome est le lieu d'un intense processus apoptotique (Mallat Z. 2001). L'apoptose implique principalement des macrophages et des lymphocytes T, mais toutes les autres cellules de la plaque (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses) peuvent également être affectées (Tricot O. 2000). La réaction inflammatoire est un déterminant majeur de l'importance de l'apoptose intra plaque. En effet, les cytokines pro inflammatoires peuvent induire l'apoptose dans tous les types de cellules de la plaque, en raison de la production excessive d'oxyde nitrique (NO) menant à la formation de peroxy-nitrite, un radical fort et cytotoxique. La production de NO est directement corrélée avec le degré d'apoptose dans la plaque chez l'homme (Mallat Z. & Tedgui A. 2000).

L'apoptose joue donc un rôle déterminant dans la formation du thrombus. On observe fréquemment l'apoptose de macrophage dans le cœur lipidique. Ceci contribue à l'expansion du cœur lipidique dans lequel des microvésicules apoptotiques s'accumulent. Le rôle physiopathologique de l'apoptose dans la plaque d'athérome est lié au potentiel pro-thrombotique des cellules composantes et des vésicules apoptotiques qui s'y trouvent. Les macrophages et les cellules spumeuses chargées d'esters de cholestérol sont le lieu primaire de la production du facteur tissulaire (TF). Ce facteur tissulaire est une glycoprotéine exprimée par les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses. L'accumulation de TF dans ces cellules et dans les vésicules apoptotiques est un facteur critique dans la détermination du potentiel des évolutions thrombogéniques de la plaque (Libby P. & Theroux P. 2005).

II-1-7-Rupture de plaque et formation de thrombus

Des plaques athérosclérotiques avancées sont caractérisées par un cœur lipidique extracellulaire entouré par une chape fibreuse composée de cellules musculaires lisses et riche en collagène. Des cellules T, des macrophages et des mastocytes s'infiltrant dans la lésion et se retrouvent au niveau des zones d'épaule de la plaque. Les plaques complexes deviennent instables ou vulnérables en réponse aux facteurs locaux et systémiques ; la formation de thrombus peut également être accélérée par les mêmes facteurs (Corti R. 2004; Libby P. & Theroux P. 2005). L'inflammation active est une caractéristique majeure de la plaque vulnérable (Naghavi M. 2003 ; Libby P & Theroux P. 2005).

La rupture de la plaque implique que des agents pro-thrombotiques, principalement le TF, entre en contact avec le sang. Les cellules immunitaires actives et les macrophages situés dans la zone d'épaulement produisent de nombreux agents pro inflammatoires et des enzymes protéolytiques (telles que des metalloprotéases) qui affaiblissent la chape fibreuse. La plaque stable est donc transformée en une structure vulnérable et fragile, qui peut se rompre sous l'effet d'un stress mécanique, avec pour conséquence la formation d'un thrombus et le déclenchement d'un syndrome coronaire aigu (Steinhubl S. & Moliterno DJ. 2005).

Les plaques vulnérables semblent être dispersées dans les artères coronaires des patients présentant une maladie cardiovasculaire par ailleurs connue, augmentant de ce fait le risque de subir un autre d'événement (Nissen SE. 2002, Casscells W. 2003).

II-2-Les molécules d'adhésions et l'athérosclérose

Les molécules d'adhésion cellulaire sont des protéines exprimées à la surface des cellules qui permettent l'adhésion d'une cellule à une autre ou à la matrice extracellulaire. Dans l'athérosclérose, le recrutement des monocytes aux sites de dysfonctionnement endothélial est régulé par des molécules d'adhésion exprimées à la surface de l'endothélium vasculaire (figure 37). Les LDLs oxydés sont un des stimuli majeurs pour l'expression de ces molécules d'adhésion. Ces molécules d'adhésion appartiennent à la famille des sélectines, des intégrines, et des immunoglobulines. (Huo Y. 2001) ;

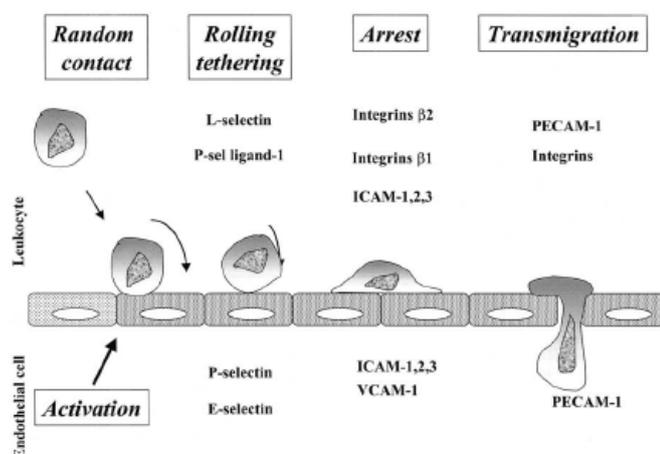


Figure 37: Représentation schématique de l'interaction des leucocytes et des cellules endothéliales pendant l'athérosclérose et rôle des différentes molécules d'adhésions dans ce processus (Blankenberg S. 2003).

-les sélectines (E-, P- et L- sélectines) interviennent dans le recrutement des leucocytes lors de la réponse inflammatoire,

- les immunoglobulines sont des protéines transmembranaires possédant une série de motifs extracellulaires communs à ceux des immunoglobulines G (IgG-like domains) et un court domaine cytoplasmique. Parmi les molécules de la superfamille des immunoglobulines, on distingue les molécules d'adhésion intercellulaires 1,2 et 3 (ICAM-1,2 et 3), la molécule d'adhésion endothéliale et plaquettaire 1 (PECAM 1 ou CD31) et la molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 (VCAM-1).

-Les intégrines sont des hétérodimères composés des sous unités α et β liés de manière non covalente. Les intégrines formées avec sous unité $\beta 1$ (CD29) sont aussi appelés antigènes très tardifs (very late antigen VLA) car elles sont exprimées tardivement par les lymphocytes à la suite de leur activation. L'un d'elles, VLA4 ($\alpha_4\beta_1$) est le principal ligand de VCAM-1.

II-3-VCAM-1 et athérosclérose

VCAM-1 est une glycoprotéine de 110 KD, inductible, et exprimée à la surface de l'endothélium. 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 38). La fixation de VCAM-1 à l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ « VLA-4 », son ligand principal, implique le domaine 1 et le domaine 4.

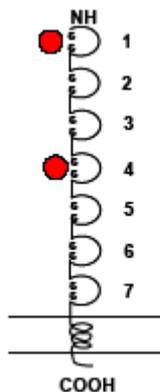


Figure 38: Structure de VCAM-1. VCAM-1 possède deux sites de liaison pour VLA-4 au niveau des domaines extracellulaires 1 et 4 (Cybulsky MI. 2001).

VCAM-1, exprimée par les cellules endothéliales activées, est responsable de l'adhésion avec les lymphocytes B et T, les monocytes, et les polynucléaires éosinophiles et basophiles par l'intermédiaire des intégrines $\alpha_4\beta_1$ exprimés par ces cellules (Huo Y. 2001). Son expression est régulée par différents facteurs comme l'inflammation ou l'hypercholestérolémie qui stimulent l'expression des gènes de la cellule endothéliale vasculaire par l'intermédiaire de chémokines et de cytokines (IL1, IL4, $\text{TNF}\alpha$ et LPS). Par conséquent, VCAM-1 peut être considérée comme un marqueur de l'athérogénèse car elle n'est pas ou peu exprimée en condition basale mais au stade précoce, elle est exprimée 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 MI. 2001).

L'expression de VCAM -1 est une manifestation d'un dysfonctionnement de l'endothélium. Il constitue une cible extrêmement pertinente pour l'imagerie non invasive de la plaque d'athérome vulnérable. Un traceur spécifique et sensible de cette molécule serait donc d'un grand intérêt.

Le peptide B2702 marqueur de VCAM-1 :

Le résidu peptidique 75-84 de la molécule du CMH-1, B2702, présente un effet immunomodulateur puissant à une liaison spécifique à VCAM-1 (Ling X. 2000). Cet effet, observé chez l'animal ainsi que chez l'homme, est due à la compétition entre le peptide et VLA-4.

B2702, est un dérivé peptidique de l'hélice α de HLA de class 1. Sa fixation 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. Ling et al ont montrés que le motif dimérique B2702 (séquence 84-75/75-84) est le meilleur inhibiteur de la liaison VCAM-1/ VLA4 (Ling X. 2000).

II-4-Imagerie de la plaque d'athérome

De nombreuses modalités d'imagerie ont été ou sont actuellement développées pour détecter les plaques d'athérome vulnérables (tableau 4). Parmi ces techniques, on distingue d'une part les technique invasives telles que l'angiographie par rayons X,

l'échographie ultrasonique intravasculaire (IVUS), la tomographie de cohérence optique (OCT) et la thermographie. On distingue d'autre part des techniques non invasives telle que l'échographie ultrasonore, le scanner aux rayons X, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'imagerie nucléaire. Les techniques invasives fournissent des détails d'une bonne précision sur la composition de la plaque, mais, à l'inverse des techniques non invasives, leur utilisation ne peut être envisagée sur de larges populations.

Imaging modality	%		Lipid	Fibrous cap	Thrombus	Macrophage/ inflammation	Ca ²⁺	Apoptosis
	Stenosis	Wall						
Invasive								
X-ray angiography	●●●●	—	—	—	(●)	—	●●●●	—
IVUS	●●●●	●●●●	(●●●●)	(●●●●)	(●●●●)	—	●●●●	—
OCT	●	●	●	●	●	—	●	—
Thermography	—	—	—	—	—	●	—	—
Non Invasive								
US	●●●	●●●	—	—	—	—	●●●	—
MRI	(●)●●●	●●●●	●	●	●●●	(●)	(●)●●●	—
EBCT	—	—	—	—	—	—	●●●●	—
MSCT	(●)●●●	●●●●	●●●	●	—	—	●●●●	—
Nuclear	—	—	●●	—	●●	●●	—	●

Tableau 4: Modalités d'imageries utilisées pour l'évaluation des plaques d'athérome humaines (Davies JR. 2005).

II-4-1- Les approches en imagerie nucléaire des plaques d'athérome vulnérables

L'imagerie nucléaire présente plusieurs avantages par rapport aux autres modalités déjà discutées ci-dessus, tels que sa nature non invasive et son potentiel à réaliser l'imagerie des différents vaisseaux. Bien que l'imagerie nucléaire ne puisse pas concurrencer l'IRM et le scanner X en termes de détails anatomiques et de résolution spatiale, les techniques comme la tomographie par rayon γ (TEMP) et la tomographie par émission de positron (TEP) sont capables de détecter des quantités extrêmement faibles de traceur, et d'évaluer ainsi les aspects physiopathologiques de la plaque d'athérome sur un plan cellulaire et moléculaire suite à l'injection d'une dose physiologiquement inerte du traceur radioactif.

Le défi principal pour l'imagerie nucléaire des plaques athérosclérotiques est la petite taille de la plupart des lésions. Pour assurer une meilleure imagerie de la plaque, il est impératif que le rapport plaque/bruit de fond (sang) soit assez haut. Idéalement,

le traceur radioactif devrait seulement être capté par la cellule ou la molécule cible située dans la plaque et pas par les tissus alentour, aussi devrait-elle être rapidement éliminée de la circulation. Cependant, dans la pratique ces conditions sont rarement réunies ; ainsi la résolution spatiale des images doit être le meilleur possible de sorte que la captation du traceur par la plaque puisse être distinguée de celle des structures environnantes.

Pour l'imagerie des plaques athérosclérotiques, plusieurs radiotraceurs spécifiques d'un certain nombre de composants de la plaque ont été testés.

II-4-2- Imagerie de l'accumulation de lipides dans la plaque d'athérome

a-LDL

L'accumulation de lipides, en particulier sous forme de LDLs riches en cholestérol, fait partie intégrante de l'initiation, de la croissance et de l'instabilité de la plaque. Cette accumulation représente donc un processus important à mesurer et quantifier. Différentes études utilisant des LDLs marquées aux radionucléides émetteurs gamma tel que l'iode-123, l'iode-125, le technétium-99m et l'indium-111, ont montré qu'il est possible de détecter *in vivo* les lésions asymptomatiques chez l'homme au niveau des artères carotidiennes, iliaques et fémorales (virgolini I 1991(1,2)). Cependant, la demi-vie plasmatique longue du radiotraceur ¹²⁵I-LDL nécessite une imagerie tardive (8-21h après injection) et les plaques d'athérome de type fibreuse ne sont pas visible avec cette methode (Narula J. 2005).

b- LDLox

Les LDLox sont beaucoup plus facilement captées par les macrophages de la plaque et l'on peut par conséquent s'attendre à une captation plus rapide que pour les LDL natives. Luliano et al ont montré que la captation des LDLox marquées au Tc-99m est légèrement plus élevée que celle des LDLs natives marquées au Tc-99m (Luliano L. 1996). De plus, le traceur LDLox présente une clairance beaucoup plus rapide. Cependant, cette différence n'est pas suffisante pour améliorer la détection des lésions.

c- les anticorps

Des anticorps spécifiques d'épitopes des LDL oxydées ont été évalués comme radiotraceurs de la plaque d'athérome vulnérable. MDA-2 est un anticorps murin monoclonal qui se lie aux épitopes malondialdehyde-lysine des LDL oxydées. MDA-2

ne lie ni les LDLs natifs, ni les HDLs, ni les VLDLs. *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. 2002). Cette fixation est plus importante quand la plaque est riche en cellules spumeuses et en lipides. Elle représente donc un index d'instabilité de la plaque. Cependant, comme pour tous les anticorps, la cinétique d'élimination est très lente (plusieurs heures) et la fixation non spécifique doit être limitée par l'injection d'anticorps froid à haute dose.

d- les analogues des apolipoprotéines

Les oligopeptides synthétiques, analogues de l'Apolipoprotéine B, ont aussi été développés. Le peptide synthétique 4 (SP4) a confirmé une élimination rapide et une accumulation plus importante dans l'aorte athérosclérotique de lapins hypercholestérolémiques par rapport à des lapins normocholestérolémiques (Hardoff R. 1995).

II-4-3-Imagerie des macrophages et MMPs de la plaque

Les macrophages sont directement responsables de l'instabilité de la plaque. Par conséquent plusieurs approches d'imagerie nucléaire ont été testées pour quantifier l'activité des macrophages dans la plaque d'athérome.

-Puisque les macrophages sont dérivés des monocytes circulants, le radiomarquage des monocytes par l'In-111, et la réinjection aux patients a été effectué. Mais une activité n'a pu être détectée que dans 40% des patients (Virgolini I. 1990).

-Les monocytes sont recrutés dans la plaque d'athérome par divers molécules chémoattractrices dont MCP1. MCP-1 marqué à l'iode-123 ou technétium-99m a été utilisé afin de visualiser la fixation spécifique sur les zones riche en lipides (Narula J, 2005)

-La digestion de la chape fibreuse par les MMPs est un facteur déterminant de l'instabilité de la plaque. La détection non invasive des MMPs permettrait d'identifier des plaques à haut risque de rupture (Kopka K. 2004). Différents radiotraceurs ont été synthétisés à partir des inhibiteurs de MMPs. Un composé iodé a été retenu par Schafers et al (2004) en raison de sa bonne affinité *in vitro* pour les MMP-2 et MMP-

9. Il permet de visualiser les plaques sur des lésions carotidiennes *in vivo* chez la souris apoE^{-/-}. Cette fixation est corrélée au taux de MMP-9 présent dans la plaque d'athérome (schafers M. 2004, Dobrucki LW. 2005).

- Le fluorodeoxyglucose (FDG) s'accumule dans les cellules métaboliquement actives en empruntant les transporteurs du glucose. Quand le FDG est radiomarqué par un isotope émetteur de positron tel que le ¹⁸F, son accumulation permet sa détection et sa quantification en imagerie TEP. Les macrophages recrutés au sein de la plaque d'athérome présentent un métabolisme exacerbé qui nécessite une forte consommation de glucose. Le [¹⁸F]-FDG permet la visualisation de ces plaques (Bleeker-Rovers CP. 2003). Néanmoins, le ¹⁸FDG 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.

II-4-4-Les cibles alternatives pour l'imagerie de la plaque

- La mort régulière ainsi que l'apoptose des cellules musculaire lisses et des macrophages sont une caractéristique particulière des plaques instables. Les cellules apoptotiques expriment de la phosphatidylsérine (PS) à la surface de leur membrane cellulaire. L'annexine V a une affinité élevée pour la PS. Elle se lie fortement à la PS, c'est pourquoi cette molécule radiomarquée au Tc-99m et à l'iode-125 est utilisé pour visualiser *in vivo* les plaques d'athéromes (Kolodgie FD. 2003, Kietselaer BL. 2004)

- Les intégrines et particulièrement $\alpha_v\beta_3$ sont apparus comme des cibles potentielles des marqueurs de la plaque (Sadeghi MM. 2004 , Dobrucki LW. 2005).

II-4-5- Le thrombus comme une cible pour l'imagerie nucléaire

La rupture de la plaque d'athérome conduit à la formation d'un thrombus. De nombreux radiotraceurs de ce thrombus ont été évalué. Ils ont pour cibles les plaquettes (Moriwaki H. 1995, 2000), la fibrine et les molécules fibrinolytiques (Ciavolella M. 1999). Ces radiotraceurs sont particulièrement intéressants pour diagnostiquer les événements coronariens aigus, ainsi que les thrombi veineux (Mitchel J. 2000). En revanche, il n'y a pas de thrombus au niveau des plaques d'athérome vulnérables non compliquées.

II-5-Conclusion

Parmi les nombreuses modalités d'imagerie invasives et non invasives actuellement à l'étude, la médecine nucléaire semble être tout à fait adaptée au diagnostic de la plaque d'athérome vulnérable, grâce à sa haute sensibilité et son approche métabolique. 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. Deux causes principales à ceci sont, d'une part une cinétique sanguine lente de certains radiotraceurs (anticorps, LDL) et d'autre part une fixation non spécifique. En effet, la taille des plaques d'athérome est de l'ordre du 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.

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.

III- Lupus érythémateux disséminé

Le lupus érythémateux disséminé est une maladie auto-immune caractérisée par un trouble sévère de l'immunité, avec une perte de la tolérance et un défaut de contrôle des lymphocytes. Cette affection peut entraîner potentiellement une auto destruction de tous les organes. Elle présente une importante morbidité par l'atteinte rénale et cérébrale et par le fait qu'elle touche des sujets jeunes. Son traitement particulièrement lourd grève le pronostic à long terme.

Cette maladie affecte essentiellement des femmes (9/1) jeunes, en période d'activité ovarienne. Elle débute habituellement durant la troisième décennie.

La cause du lupus érythémateux disséminé reste inconnue mais des multiples facteurs génétiques, hormonaux, environnementaux et immunologiques favorisent sa survenue et son évolution.

Depuis plusieurs années, différentes recherches se concentrent sur le lupus érythémateux disséminé qui représente un prototype de maladie auto-immune rhumatismale systémique. De nombreux facteurs sont susceptibles de moduler les événements qui aboutissent à l'état auto-immun dans le lupus. L'objectif d'un de ces travaux est d'approcher tous les domaines impliqués dans l'induction et le développement de la maladie afin de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui se situent aux stades précoces de la maladie, qui perpétuent son établissement et qui régulent les phases typiques d'exacerbation/rémission. Le but ultime de ce travail est de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques capables de cibler spécifiquement les cellules délétères tout en minimisant les effets secondaires tels que ceux induits par les traitements actuels.

III-1- Le splicéosome et son intérêt dans la recherche thérapeutique sur le lupus

Chez les eucaryotes, les gènes codant pour des protéines sont constitués d'une suite d'exons et d'introns alternés. Lors de la transcription, un pré-ARN messager (ARNm) est synthétisé, celui-ci va être épissé (excision des introns et ligature des exons) pour donner un ARNm dit mature. Cet ARNm mature est alors exporté du noyau vers le cytoplasme pour être traduit en protéine. L'épissage (splicing) est

assuré par un ensemble de complexes ribonucléoprotéiques (RNP) appelé collectivement splicéosome. Le splicéosome contient des particules snRNP (small RNP particles) et hnRNP (heterogeneous RNP particles). Dans les mitochondries et les bactéries, par exemple, il existe également des introns autoépissables, capables de s'exciser seuls. Par analogie avec le fonctionnement du ribosome, on pense que dans le splicéosome, c'est l'ARN qui est catalytique et donc que le splicéosome est un ribozyme. Dans son extrême complexité, le mécanisme catalytique exact du splicéosome n'est pas encore complètement élucidé.

III-1-1-. Particules snRNP

D'un point de vue architectural, les particules snRNPs sont constituées d'une molécule d'ARN appartenant à la famille des ARN de la série U (petits ARN de taille inférieure à 250 nucléotides, riches en uridine) à laquelle sont associées des protéines, formant ainsi les particules dites U-snRNPs. Certaines protéines des U-snRNPs sont communes à toutes les particules, ce sont les protéines Sm (par exemple SmB/B' et SmD1). D'autres, en revanche, sont spécifiques d'un type seulement de particule ; ce sont, par exemple, les protéines U1- 70K, U1-A et U1-C pour les particules U1-snRNP ou les protéines U2-A' et U2-B'' pour les particules U2-snRNP. Les pré-U-snARN sont transcrits dans le noyau, exportés dans le cytoplasme, dans lequel ils sont associés aux protéines et maturés pour former des particules fonctionnelles prêtes à être réimportées dans le noyau (Will CL 2001). L'import nucléaire des snRNPs U1, U2, U4 et U5 dans les cellules eucaryotes fait intervenir la snurportine 1, membre de la famille des importines α , qui reconnaît la coiffe guanosine triméthylée (m3G cap) des U-snARN. Les séquences NLS (nuclear localisation signal) des protéines Sm semblent être aussi impliquées dans la reconnaissance des U-snRNP par la snurportine 1.

général, les Ac anti-U1A sont produits les premiers, puis apparaissent les Ac anti-U1-70K et ultérieurement, enfin, sont produits les Ac anti-SmBB' et anti-SmD1 (James JA 1998). Les épitopes des protéines du spliceosome reconnus par les Ac de patients ou de modèles murins auto-immuns sont bien connus. Leur identification, notamment dans les protéines U1-70K, U1-A, U1-C, SmBB', SmD1, SmD3 et hnRNPA2/B1 a fait l'objet de nombreuses études américaines et européennes depuis plus de 20 ans (Fournel S 2003, Routsias JG 2004). Un certain nombre d'informations est aussi disponible quant à la localisation des épitopes de ces protéines qui sont reconnus par les lymphocytes T de souris et patients atteints de lupus et de connectivite mixte (Hoffman RW. 2004).

III-1-3- La région contenant le motif RNP1 de la protéine U1- 70K est ciblée par les anticorps et les cellules T CD4+ dans le lupus

L'intérêt de l'étude d'équipe de Pr. Muller s'est porté sur la protéine U1-70K dont ils ont étudié les propriétés de reconnaissance par les lymphocytes T de souris lupiques puis de patients. En testant une série de peptides chevauchants, couvrant cette protéine de 437 résidus d'acides aminés, ils ont identifié un épitope présent dans le peptide 131–151, reconnu par les Ac et les lymphocytes T CD4+ issus des ganglions lymphatiques de souris MRL/lpr (haplotype H-2k) et (NZB × NZW)F1 (haplotype H-2 d/z)(Monneaux F 2000 et 2001(2)). La séquence 131–151 renferme un motif RNP1 qui est très conservé à l'intérieur d'un domaine plus large d'environ 80–90 résidus (appelé RBD ou RRM ou RNP-80), impliqué au sein de la particule dans la liaison de la protéine à l'ARN. Le motif RNP1 est présent dans d'autres protéines du spliceosome, par exemple U1-A et hnRNPA2/B1, qui sont également la cible d'auto Ac. On notera en revanche que les protéines U1-C et SmD1, aussi reconnues par les Ac d'individus lupiques, ne renferment pas de motif RNP1. Cette équipe a montré expérimentalement que le motif RNP1 pouvait jouer un rôle important dans la réponse auto-immune dirigée contre des éléments du spliceosome et qu'il pourrait être impliqué dans les premières étapes de la diversification de la réponse humorale et cellulaire intervenant au cours de la maladie lupique (Monneaux F. 2001(1), 2002 et 2004). La protéine U1-70K est hautement phosphorylée sur des résidus sérine toujours non identifiés (Woppmann A 1993). Muller et al. ont synthétisé puis étudié les propriétés immunologiques d'un analogue de la séquence 131–151 contenant un résidu de phosphosérine en position Ser140 (peptide P140). Il s'est avéré que non

seulement le peptide P140 était reconnu par les Ac et les cellules T CD4+ de souris MRL/lpr, mais qu'administré en solution saline à des souris jeunes, il retardait l'apparition de la protéinurie, diminuait la production de taux élevés d'Ac dirigés contre l'ADN natif, marqueur sérique de la maladie, et entraînait une augmentation très significative de la durée de vie des souris traitées (Monneaux F. 2003). De manière tout à fait remarquable, ils ont montré que le peptide P140 induisait chez la souris MRL/lpr une réponse tolérogène vis-à-vis d'autres peptides de la protéine U1-70K (Monneaux F. 2004), ce que Kaliyaperumal *et al.* ont appelé diversification tolérogène (Kaliyaperumal A 1999). La réponse tolérogène s'exerce également vis-à-vis des lymphocytes T reconnaissant d'autres protéines du spliceosome. La séquence non phosphorylée est sans effet sur le cours de la maladie chez la souris MRL/lpr et un autre analogue synthétisé avec une phosphosérine en position 137 dans la séquence 131–151 n'est que très faiblement reconnu par les cellules T CD4+. Les résultats chez l'homme indiquent que les deux peptides 131–151 et P140 se lient *in vitro* à différentes molécules HLA de classe II et qu'environ 50 % des patients lupiques, mais aucun patient atteint de polyarthrite rhumatoïde, de syndrome de Sjögren, de polymyosite, de cirrhose biliaire primitive, d'hépatite auto-immune ou de maladies infectieuses, possèdent dans le sang périphérique des cellules T qui reconnaissent spécifiquement le peptide P140 (Monneaux F. 2005). De manière très intéressante, contrairement à ce qui est visualisé chez la souris, les cellules T de patients lupiques ne prolifèrent pas *ex vivo* en présence du peptide P140, mais secrètent de l'IL-10, une cytokine régulatrice.

III-2-. Une stratégie thérapeutique basée sur un peptide dans le lupus

Des essais chez des volontaires sains ont montré que le peptide P140 était dépourvu de toxicité. Des essais de phase II engagés chez des patients lupiques se sont avérés être très prometteurs (Monneaux F. 2007). Dès lors, il devient très important de comprendre le mode d'action du peptide P140.

D'autres peptides dont les séquences proviennent d'autoantigènes du lupus ont été décrits comme des candidats intéressants pour le développement de stratégies thérapeutiques spécifiques chez des individus lupiques. On citera surtout des peptides d'histones et notamment, le peptide 71–94 de l'histone H4 (Kang HK. 2005) et le peptide 111–130 de l'histone H3 (Suen JL. 2004) qui renferment des épitopes reconnus par les lymphocytes T de souris lupiques.

III-3-. Conclusion

Un peptide phosphorylé de 21 résidus correspondant à la séquence 131–151 de la protéine U1-70K a été généré qui se comporte comme un épitope universel (il est reconnu par un large panel de molécules du CMH de classe II murin et humain) et qui présente des propriétés tolérogènes dans le lupus murin. Les propriétés thérapeutiques et notamment immunomodulatrices de ce peptide sont actuellement testées chez l'homme. A priori, rien ne prédisposait le spliceosome comme cible particulière dans la recherche thérapeutique dans le lupus. Aucune étude n'a montré par exemple que des Ac dirigés contre des protéines du spliceosome étaient pathogènes.

Il n'existe aucune preuve expérimentale montrant que le blocage d'une activité fonctionnelle des antigènes du spliceosome est impliqué dans la pathogénie des connectivites. On peut penser que l'effet thérapeutique (et immunomodulateur) est ailleurs. En enrayant, par un mécanisme qui reste à définir, l'enchaînement de la réponse auto-immune (réponse initiale → coopération T-B → diffusion et diversification de la réponse → développement d'une réponse cellulaire et humorale délétère → maladie), un peptide ou un groupe restreint de peptides participant à cette spirale, peut apparemment dérouter la cascade d'évènements et ralentir, voire éteindre ses effets. Certainement d'autres peptides, comme peut-être certains peptides d'histones, peuvent avoir le même effet tolérogène. Le grand intérêt de cette approche est d'espérer des retombées thérapeutiques par une stratégie d'immunomodulation spécifique ciblant les cellules du système immunitaire qui sont délétères, sans modifier l'ensemble du système immunitaire.

Partie II

Matériels, Méthodes et Résultats

A- Matériels

Partie II : Matériels, Méthodes et Résultats

A- Matériels

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, équipée d'un système d'aspiration de l'air avec un filtre à charbon. La manipulation du technétium-99m ou de l'indium-111 s'effectue sous une 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 gérés par décroissance ($t_{1/2} < 100$ jours) sont conservés sur une période correspondant à 10 fois la demi-vie du radioélément concerné et sont ensuite éliminés en conformité avec la législation en vigueur.

II- Les études analytiques

Les solutions étant extrêmement diluées, le ligand et l'isotope sont présents en quantité infime. Les techniques analytiques physico-chimiques usuelles (UV, RMN) 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 sur couche mince (CCM) avec une lecture des plaques réalisée par un radiochromatographe équipé d'une sonde de mesure gamma, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) avec une analyse de l'éluat par absorption UV et une mesure de la radioactivité.

II-1- 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®), normale (Merck) ou ITLC-SG (Pal Gelman Science). Pour chaque peptide, différents éluants sont

testés afin d'optimiser la séparation des molécules et de l'isotope libre : l'acétonitrile ou un 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 NaI. Les gels d'électrophorèse sont comptés avec le même appareillage.

II-2- Chromatographie Liquide Haute Performance

Les analyses par CLHP ont été réalisées sur une CLHP analytique Waters® Delta 717, équipée d'une sonde radioactive NaI (TI) 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 soit sur une colonne séparatrice C18 Lichrosorb RP18 column (Supelco®), 20 cm, 5 µm avec un débit de 0,7 ml/min, soit sur une colonne séparatrice C4 Waters®, symmetry 300™, 3,5µm avec un débit de 0,7 ml/min. 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 et une purification des traceurs.

II-3- Chromatographie liquide

Pour certains peptides la purification était nécessaire afin d'avoir la meilleure pureté radiochimique. Ces purifications ont été réalisées en fonction du peptide sur une Colonne Sephadex® G5 NAP™ et (ou) par chromatographie d'échange d'ions sur résine anionique BIO-RAD, AG® 1-X8, 200-400 mesh forme Cl⁻ ou cationique BIO-RAD, AG® 50W-X8, 100-200 mesh, forme H⁺, et par chromatographie de partage sur colonne Sep-Pak® plus C18 cartridge Waters®.

III- Mesure de la radioactivité

Différents instruments de mesure de la radioactivité ont été utilisés. La mesure des échantillons liquides et solides est réalisée soit par un activimètre Capintec® CRC15

(pour les activités supérieures à 37 KBq), soit par un passeur d'échantillon, compteur gamma Cobra Packard® (pour les activités inférieures à 37 KBq). Les scintigraphies sont réalisées grâce à une gamma- caméra dédiée au petit animal (γ Imager Biospace).

IV- Les peptides

Depuis 1980 et l'utilisation des dérivés de la somatostatine dans le diagnostic des tumeurs neuroendocrines, les peptides sont de plus en plus proposés comme traceurs en médecine nucléaire. L'objectif de ce travail est de réaliser et de valider le marquage au technétium 99m, à l'indium-111 et à l'iode-125 de différents ligands peptidiques proposés comme nouveaux traceurs.

Utilisation des peptides en médecine nucléaire :

Les peptides peuvent être considérés comme des agents de choix pour des applications diagnostiques et thérapeutiques en médecine nucléaire. De nombreux peptides ont déjà été radiomarqués essentiellement dans le diagnostic des cancers, les cellules tumorales surexprimant des récepteurs spécifiques des peptides ou de leurs analogues marqués. En fonction du radio-isotope utilisé, la tumeur peut être soit visualisée, soit traitée. Nous pouvons citer, parmi tous les peptides radiomarqués commercialisés, les analogues de la somatostatine (14 AA) marqués à l'indium 111 (Octreoscan®), de la vasoactive intestinal hormone (VIP, 28 AA), de la bombésine (GRP, 14 AA), de la neurotensine (13 AA) 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 et finalement aux petits peptides synthétiques. Les anticorps sont des molécules de grande taille et de haut poids moléculaire, ce qui limite leur fixation à la cible et ralentit la clairance sanguine ; il en résulte un rapport cible / bruit de fond (sang) faible, par contre les peptides de petite taille ont souvent une clairance sanguine, une diffusion tissulaire et une fixation tumorale rapides. De plus, ils ont une affinité plus grande pour leurs

récepteurs que les peptides de grande taille et ils sont généralement peu immunogènes.

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 d'espacement 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 nécessaire car les rayonnements doivent agir au niveau de l'ADN.
- Les autres prérequis sont un radiomarquage avec un haut rendement et une activité spécifique et une stabilité du marquage *in vitro* et *in vivo* élevées. 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.

IV-1- Les marqueurs de $\alpha_v\beta_3$

Comme précisé précédemment, 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). Cette étude a pour objectif d'évaluer

de nouveaux peptides radiomarqués permettant de détecter ces néovaisseaux par imagerie.

- Synthèse chimique des dérivés RGD :

Nos produits ont été synthétisés par le laboratoire de chimie LEDSS V, dirigé par le Pr. P. Dumy, à la faculté de Chimie de Saint-Martin d'Hères. La formule chimique et les applications du RAFT décrites ci-après ont été protégées par un dépôt de brevet. Tous les dérivés RGD utilisés sont cycliques. 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 qui est présent sur les plaquettes (Kantlehner M. 1999).

IV-1-1- Les dérivés RGD :

a- Cyclo(-RGDfK-) ou cRGD

RGD 272 dénommé cRGD est un peptide monocyclique formé de la séquence RGDfK soit : arginine(R) – glycine (G) - acide aspartique (D) – phénylalanine modifiée (f) – lysine (K) (Figure 40). Il peut être marqué avec du technetium-99m car une histidine (H) est fixée sur la lysine. Le peptide cRGD est le ligand spécifique de $\alpha_v\beta_3$ et il est considéré comme un contrôle "positif" (Dechansreiter M.A. 1999, Giannis A. 1997).

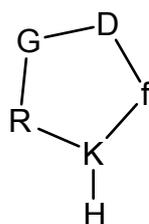


Figure 40 : Schéma d'un pentacycle contenant la séquence peptidique RGD.

b- RAFT (c[-RGDfK-])₄ ou RAFT-RGD

Ce peptide est constitué de quatre peptides cRGD fixés sur un groupe porteur RAFT. Sur ce RAFT, les chimistes ont fixé soit un résidu histidine (RGD268) afin de réaliser le marquage au technétium-99m, soit un groupement DOTA (RGD297) afin de

pouvoir réaliser un marquage à l'indium. Ces molécules sont dénommées respectivement RAFT- RGD et RAFT- RGD -DOTA (Figure 41).

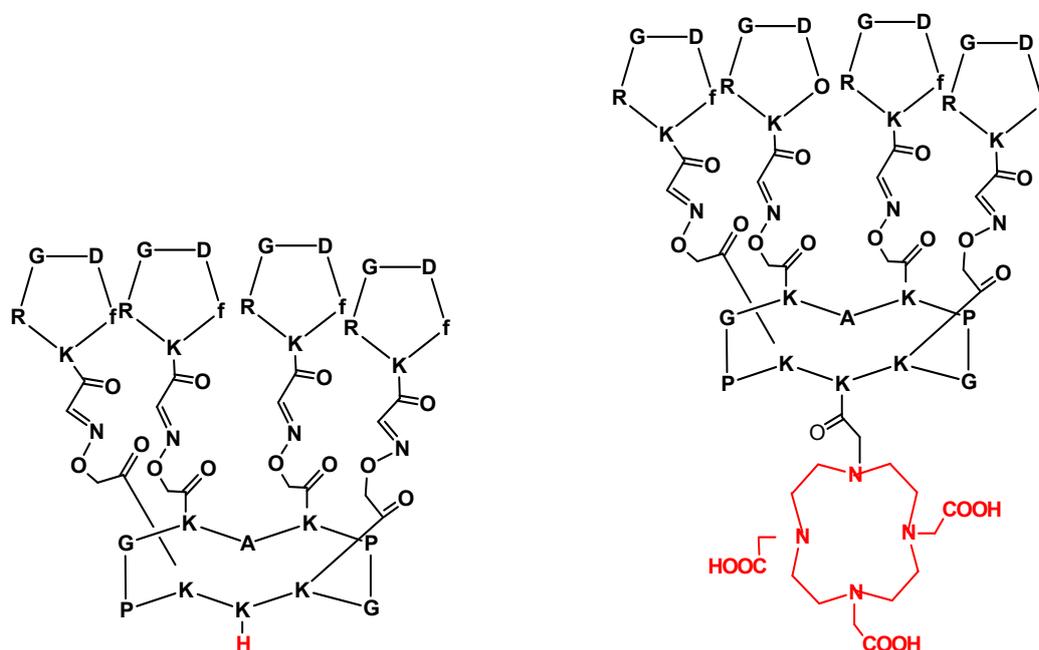


Figure 41 : Structure de (a) RAFT-RGD contenant une histidine pour le marquage au ^{99m}Tc et (b) RAFT-RGD-DOTA contenant un cycle DOTA pour le marquage à l' ^{111}In .

Le RAFT : 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 42). Cette structure cyclique lui confère une plus grande rigidité structurale et une stabilité conformationnelle mais aussi une résistance aux enzymes protéolytiques (Garanger E. 2005). Le Raft permet de lier un grand nombre de résidus par l'intermédiaire des fonctions amines libres de ses 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 42). 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. 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 (Boturyn D. 2004).

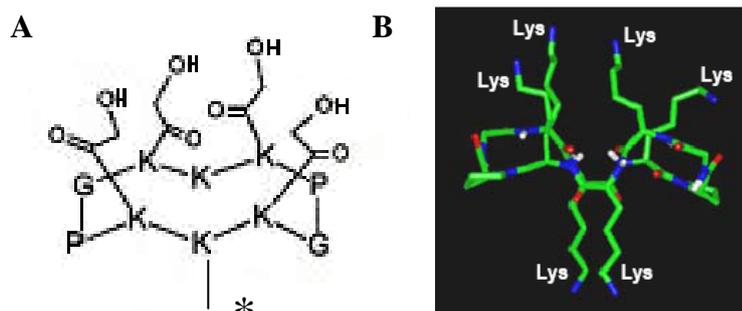


Figure 42 : Structure du gabarit RAFT. A : fonctionnarisation du RAFT permettant la liaison de 4 structures identiques. B : structure tridimensionnelle dans l'espace (Garanger E. 2005).

c- RAFT (c[-RADfK-])₄ ou RAFT-RAD

Le peptide RAFT-RGD est comparé à une molécule non spécifique : le RGD 304 (dénommé aussi RAFT-RAD), qui présente la même formule que le RAFT-RGD sauf au niveau du motif cible RGD où la glycine a été remplacée par une β -alanine (A) c[**RADfK**] (Figure 43). 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 RAFT-RAD 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 ont fixé au niveau du gabarit Raft, sur le plan opposé aux quatre motifs « RAD », sur un résidu lysine, un résidu histidine afin de faciliter le marquage au technetium-99m.

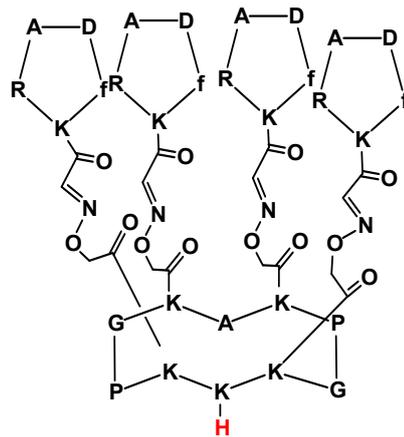


Figure 43 : Structure de la molécule RAFT-RAD. Une histidine est fixée sur le cycle RAFT afin d'avoir la possibilité de marquage au ^{99m}Tc .

IV-1-2- Le peptide HARP111-124

L'*heparin affin regulatory peptide* (HARP) est un polypeptide de 18 kDa se liant à l'héparine. Il est fortement exprimé dans les tissus en développement ainsi que dans de nombreuses tumeurs primaires humaines et semble jouer un rôle clé dans la croissance et la différenciation cellulaire. *In vitro*, HARP présente une activité angiogénique et il stimule également la prolifération de nombreux types cellulaires tels que les cellules fibroblastiques, endothéliales et épithéliales. HARP est une protéine sécrétée, organisée en deux domaines, chaque domaine contient une région en feuillets beta et un groupe de résidus basiques. La séquence 111-124 du peptide HARP a été synthétisée et purifiée par le laboratoire CRRET, CNRS Upres-A 7053, à l'université Paris XII. Ce peptide possède 14 acides aminés dont une tyrosine (Y) à proximité du C terminal (Figure 44).



Figure 44 : Séquence peptidique de HARP 111-124.

IV-2- Les marqueurs de la plaque d'athérome

Les peptides utilisés comme marqueurs de la plaque d'athérome, les marqueurs de VCAM-1, sont:

1. le peptide synthétique B2702 et ses dix dérivés,
2. les ligands naturels de VLA-4 : les peptides BOT321 et BOT 337,
3. le peptide EP 070946.

IV-2-1- Le peptide B2702 et ses dix dérivés

a- Le peptide B2702 :

Le peptide de synthèse B2702 (84-75) a pour formule générale : **HGR ENL RIA LRY**. Un résidu histidine (H), ligand du synthon tricarbonyle technétié, est fixé au peptide B2702(84-75) par l'intermédiaire d'un résidu glycine (G).

b- Les dérivés des peptides B2702 :

Afin d'évaluer l'influence du changement des acides aminées de B2702 sur l'affinité du peptide à son récepteur, nous avons étudié les dix séquences peptidiques présentés dans le tableau 5. Les acides aminés HG- sont toujours gardés pour permettre le marquage au technetium-99m. Tous les dérivés ont été synthétisés par la société EUROGENTEC. Chaque peptide est dénommé PBn (n=1-10).

Nom donné au peptide	Référence	Séquence peptidique
PB1	EP070743	H ₂ N- HGR ANL RIL ARY- COOH
PB2	EP070740	H ₂ N- HGR ENL AIL ARY- COOH
PB3	EP070736	H ₂ N- HGR ENL RIL ARA- COOH
PB4	EP070737	H ₂ N- HGR ENL RIL AAY- COOH
PB5	EP070739	H ₂ N- HGR ENL RAL ARY- COOH
PB6	EP070741	H ₂ N- HGR ENA RIL ARY- COOH
PB7	EP070744	H ₂ N- HGA ENL RIL ARY- COOH
PB8	EP070738	H ₂ N- HGR ENL RIA ARY- COOH
PB9	EP070742	H ₂ N- HGR EAL RIL ARY- COOH
PB10	EP070735	H ₂ N- HGR ENL RIL ARY- COOH

Tableau 5 : Schéma des séquences peptidiques des dérivés de B2702. Chaque peptide est dénommé PBn (1-10).

IV-2-2- Les ligands naturels de VLA-4 : les peptides BOT321 et BOT 337

Les peptides BOT321 et BOT337 ont été synthétisés par l'équipe de chimie du LEDSS V (Pr Dumy). Ces deux peptides appartiennent à la protéine VLA-4, ligand naturel de VCAM-1. Les séquences peptidiques de ces molécules sont présentées

les études d'imagerie ont été réalisées au laboratoire INSERM U877. La séquence peptidique est présentée ci-dessous :



V- Les réactifs 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 et CCM :

- Acétonitrile
- Acide trifluoroacétique
- Acide chlorhydrique 8N
- Eluat de Technétium-99m : Générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ Elumatic III (Schering® Cis-Bio international)
- Isolink (Tyco® Healthcare Mallinckrodt)
- Na^{125}I (Amersham Pharmacia® biotech (AS 600 –700 GBq/mg))
- Chloramine-T (Sigma Aldrich)
- Iodobeads® (Pierce)
- Pyrosulfite de sodium (Fluka®)
- Ethanol (Prolabo)
- Tampon phosphate
- Sang humain total (EFS Grenoble)

VI- Les animaux

Différentes souris ont été utilisées au cours des expérimentations animales :

Les études de biodistribution et de métabolisation des ligands de $\alpha_v\beta_3$ ont été effectuées chez la souris Balb/c, la souris C57B1/6 et la souris nude, toutes provenant du laboratoire Charles River, St Germain sur l'Arbresle, France.

Les souris "nude" ont une aplasie du thymus, ce qui leur donne la particularité d'être déficientes en lymphocytes T et qui facilite le développement de tumeurs xénogreffées. Ces souris sont fragiles, c'est pourquoi elles sont placées dans une animalerie spécifique avec litière, alimentation et boissons stériles.

Les souris Balb/c et C57Bl/6J ont été choisies car elles permettent le développement de tumeurs syngéniques, respectivement les TS/A-pc et les B16F0. Les protocoles sont en accord avec les lois éthiques et ont été soumis et validés par le comité d'éthique du CRESSA (La Tronche, France).

Le peptide HARP-111-124 a été étudié chez la souris nude porteuse de tumeurs MDA-MB231.

Les études des marqueurs d'athérosclérose ont été réalisées chez la souris C57Bl/6 contrôles et la souris C57Bl/6 ApoE ^{-/-} hypercholestérolémique. Ces souris âgées de 6 semaines sont également fournies par Charles River.

Finalement, la biodistribution, l'imagerie et la stabilité *in vivo* du peptide P140 ont été effectuées chez la souris contrôle et la souris lupique MRL/lpr.

B- Méthodes

B- Méthodes

I- Marquage des analogues RGD, marqueurs de l'angiogénèse

I-1. Marquage au Technétium-99m

Le technétium-99 métastable est le radio-isotope le plus utilisé en médecine nucléaire. Ses caractéristiques physiques (demi-vie de 6h, 98% de rayonnements γ , E de 140 KeV), sa facilité d'obtention et son coût de production sont idéals pour son utilisation en scintigraphie diagnostique. Le choix du marquage au technétium s'est imposé. Plusieurs méthodes de marquage mettant en jeu plusieurs intermédiaires (MAG3, HYNIC, etc...) existent et permettent de radiomarquer des peptides et des petites protéines. Nous avons choisi d'étudier le marquage avec un chélate bifonctionnel commercialisé par la société Malinkrödt sous le nom d'Isolink[®], constitué par un mélange de sodium boranocarbonate ($\text{Na}_2\text{BH}_3\text{CO}_2$; 4,5 mg), de sodium carbonate (Na_2CO_3 ; 7,15 mg), de sodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 2,85 mg) et de sodium tartrate ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$; 8,5mg).

Le marquage réalisé, nous avons étudié la stabilité *in vitro* des complexes formés dans le milieu de marquage et le sang humain, la biodistribution *in vivo* chez la souris, ainsi que la stabilité *in vivo* des traceurs dans le sang, le foie, les reins et l'urine. Ces études ont été réalisées au laboratoire INSERM U877.

Pour effectuer le radiomarquage au technétium, différents réactifs ont été utilisés :

- 1 ml d'une solution de pertechnétate de sodium de 2200-3700 MBq (60-100mCi). L'éluat issu d'un générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ Elumatic III, Cis Bio international doit avoir moins de 2 heures.
- L'Isolink[®],
- une solution aqueuse du peptide,
- une solution d'acide chlorhydrique HCl 2N.

Le marquage s'effectue en 2 étapes :

Premièrement, on ajoute au kit d'Isolink[®], 2200 à 3700 MBq (60-100mCi) de l'éluat frais de pertechnétate de sodium. Le volume est de 1 ml. La solution est chauffée à 100°C pendant 30 minutes dans un bloc chauffant. Le chélate $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

formé est dans un milieu très basique que l'on doit neutraliser à pH 7-8 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (2N, 80 µl) avant de procéder dans la deuxième étape à la complexation du peptide. Les conditions de cette réaction (durée, température, pH, activité spécifique et concentration de peptide) sont à déterminer pour chaque molécule. Il se produit une réaction d'échange de ligands : il y a substitution des molécules d'eau du premier complexe et les atomes donneurs (azote) du peptide.

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'acétonitrile/H₂O 60/40, le technétium libre est toujours au front du solvant, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ présente un R_f de 0,8 et le peptide technétié reste au point de dépôt.

L'analyse CLHP des complexes technétiés a été testée avec comme éluant un gradient de concentration acétonitrile/H₂O/TFA. Soit A une solution aqueuse (H₂O-TFA 0,1%) et B un mélange acétonitrile/H₂O/TFA (90/10/0,1) ; le gradient de concentration se déroule de la manière suivante : de 0 à 5 min, 5 % de B, de 5 à 20 min, 5 à 60% de B, de 20 à 30 min, 60% de B. La colonne est une colonne Lichrosorb RP C18, (Supelco®) 5 µm. Le débit d'élution est de 0,7 ml/min. Les temps de rétention pour le pertechnétate ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$), $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ et le peptide marqué sont de 5 minutes, 7 minutes et 25 minutes respectivement.

Définition de la réaction de marquage

Trois ligands ont été synthétisés par l'équipe du Pr. Dumy au LEDSS V :

- (1) cRGD sur lequel une histidine a été fixée,
- (2) RAFT-RGD et
- (3) RAFT-RAD

Dans les deux derniers, quatre motif cycliques RGD et RAD sont fixés sur un gabarit RAFT sur lequel une histidine nécessaire à la complexation du technétium a été fixée. Les 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
- Durée d'incubation
- pH du solvant
- Concentration peptidique

I-1-1- Étude de la réaction de marquage de cRGD-^{99m}Tc

Le motif cyclique de RGD (RGD 272) possède la formule RGDfK et un résidu histidine qui est ajouté pour faciliter le marquage au Technétium-99m. Ce peptide est dénommé cRGD. Le peptide technétié par l'intermédiaire d'Isolink[®] est dénommé cRGD-^{99m}Tc.

• Paramètres de la réaction

Influence de la durée et de la température de la réaction :

Les radiopharmaceutiques utilisés en médecine nucléaire ayant une durée d'utilisation généralement courte du fait de la demi-vie de 6h du technétium, il faut les fabriquer de manière rapide. Il est nécessaire d'atteindre une pureté radiochimique maximale pendant un temps court, ce qui demande d'accélérer la réaction en augmentant la température. L'échange des molécules d'H₂O du complexe tricarbonyle par les groupes électrophiles du peptide peut se produire à température ambiante, mais la cinétique de réaction est lente. Il est donc nécessaire de chauffer et pour ce faire, la stabilité du peptide doit être vérifiée.

100 µg de peptide dilué dans 100 µl d'eau purifiée sont incubés à 60, 100 et 150 °C, pendant 15, 30, 45 minutes. Chaque échantillon est ensuite analysé par CLHP en condition isocratique (Acétonitrile/H₂O, 50/50) la détection UV se fait à 254 nm. Les résultats montrent que le peptide est stable jusqu'à 100°C pendant 30 minutes.

Pour préciser les conditions de marquage, 100 µl (1 mg/ml) de cRGD sont mis en présence d'une solution de [^{99m}Tc(CO)₃(OH₂)₃]⁺ à 2 GBq, à pH 7-8. Le mélange est incubé à 25, 50 et 80 °C pendant 2h. Des prélèvements sont effectués à 20, 30, 60 et 120 minutes et sont analysés immédiatement par CCM et CLHP dans les conditions déjà décrites ci-dessus.

Influence de la concentration en peptide : Mesure de l'activité spécifique

10, 25 et 50 µg de peptide cRGD (environ 9 nmoles, 23 nmoles et 45 nmoles) sont incubés séparément avec 1500 MBq (~41 mCi) de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ à 80°C pendant 20 minutes. Parallèlement, les mêmes quantités de peptide sont incubées avec 2,2 GBq (~60 mCi) et 2,6 MBq (70 mCi) de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$.

Influence du solvant

En gardant la concentration en peptide de 1 mg/ml, nous avons effectué la réaction de complexation dans différents solvants : tampon PBS à pH 7,4 et NaCl 0,9% en présence des mêmes quantités de complexe $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ précédemment utilisées.

I-1-2- Etude de la réaction de marquage de RAFT-RGD- $^{99\text{m}}\text{Tc}$

RAFT-RGD-H (RGD268) est un peptide synthétisé par l'équipe du Pr. Dumy. Quatre cycles de RGD sont liés à une structure polypeptique RAFT. Le radiomarquage au technétium est réalisé sur le plan opposé aux 4 RGD par l'intermédiaire d'un résidu histidine fixé sur le RAFT.

• Paramètres de la réaction

Influence de la durée et de la température de la réaction :

Dans un premier temps, la stabilité du peptide RAFT-RGD en fonction de la température est analysée par CLHP :

100 µg de peptide solubilisé dans 100 µl d'un mélange H₂O / éthanol (80/20) sont incubés à 50, 80 et 100°C pendant 30 min. Des aliquotes sont analysées par CLHP avec détection UV.

Après détermination de la température maximale tolérée par le peptide, le processus de marquage est étudié :

- 100 µg de peptide RAFT-RGD (1 mg/ml) sont mis en présence d'une solution de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ à 740 MBq, à pH 8. La solution est incubée à 70°C pendant 1 heure dans un bloc chauffant. Des prélèvements sont effectués à 10, 20, 30 et 60 minutes. Ces aliquotes sont immédiatement analysées 1) par CCM sur plaque de silice C18 comme phase stationnaire et avec les solvants NaCl 0,9% et

acétonitrile/H₂O (60/40) pour la migration et 2) par CLHP avec une détection en UV et une détection de la radioactivité dans les conditions précédemment utilisées.

Influence de la concentration en peptide : Mesure de l'activité spécifique

Afin d'avoir des images de qualité, nous avons essayé d'obtenir la meilleure activité spécifique possible :

- Quatre aliquotes de 50 µg de peptide RAFT-RGD (1 mg/ml) sont incubées avec des solutions de [^{99m}Tc(CO)₃(OH₂)₃]⁺ à 555 MBq (15 mCi), 740 MBq (20 mCi) et 925 MBq (25 mCi) à pH 8, pendant 20 minutes à 70°C (la meilleure condition obtenue lors de l'expérience précédente). Les aliquotes sont analysées par CCM et CLHP dans les mêmes conditions.
- Quatre aliquotes de 100 µg de peptide (1 mg/ml) sont mis en présence de 1510 MBq (30 mCi), 1700 MBq (35 mCi) et 1880 MBq (40 mCi) de solution de [^{99m}Tc(CO)₃(OH₂)₃]⁺ et incubées à 70°C pendant 20 minutes.

I-1-3- Etude de la réaction de marquage de RAFT-RAD-^{99m}Tc

Le RAFT-RAD est une molécule non spécifique et proche structuralement du RAFT-RGD, hormis le fait qu'un résidu bêta alanine (βA) remplace un résidu glycine (G), ce qui empêche toute interaction avec l'intégrine α_vβ₃. Quatre cycles de RAD sont liés à la structure polypeptique RAFT. Le radiomarquage au technétium est réalisé par l'intermédiaire d'un résidu histidine fixé sur le RAFT.

Le marquage de RAFT-RAD au technétium-99m est effectué en utilisant la même méthode que celle développée pour le RAFT-RGD-^{99m}Tc. L'étude des différents paramètres de la réaction (la durée, la température, le solvant, ainsi que la mesure de l'activité spécifique) est réalisée dans les mêmes conditions que celles du cRGD-^{99m}Tc.

Stabilité des peptides technétiés

La stabilité des peptides radiomarqués est mesurée au cours du temps. Chaque échantillon est conservé à température ambiante pendant 24 heures. La pureté radiochimique des aliquotes de solution après 1, 3, 4, 6, 8 et 24 heures d'incubation est déterminée par CCM et CLHP.

I-1-4- Propriétés physico-chimiques des dérivés RGD marqués au technetium-99m

Après avoir déterminé les paramètres de la réaction de marquage et obtenu des molécules marquées avec un bon rendement, une pureté radiochimique de plus de 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 sa stabilité *in vivo*. La lipophilie des traceurs par mesure de leur coefficient de partage, ainsi que la répartition sanguine des traceurs par mesure de leur fixation aux éléments figurés du sang et aux protéines plasmatiques sont également étudiées.

- **Mesure du coefficient de partage**

La lipophilie des composés d'intérêt biologique représente le paramètre clé permettant d'interpréter et de prédire les phénomènes de transport des molécules à travers les membranes biologiques. Cette propriété est généralement mesurée par le partage d'une molécule entre deux phases, l'une organique et l'autre aqueuse, représentant un système biphasé non miscible. La détermination du coefficient de partage P , exprimé sous forme de $\log P_{O/W}$, permet de prédire des phénomènes d'absorption ainsi que d'autres phénomènes intervenant dans le transport de métabolites.

- 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 avec l'activimètre. 100 μ l de solution de la molécule marquée avec une activité comprise entre 185 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 μ l de chaque phase est recueillie et mesurée avec l'activimètre. Cette mesure est effectuée pour chaque molécule marquée.

- **Etude de la disponibilité des traceurs ; fixation aux cellules sanguines et protéines plasmatiques**

Mesure de la fixation cellulaire

L'étude de la fixation du traceur technétiié aux cellules sanguines est effectuée après centrifugation d'un échantillon sanguin, en mesurant la répartition de la radioactivité entre le culot cellulaire et le sérum. Ceci permet de déterminer 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. Pour ce faire, le radioligand est mis en contact avec du sang total et incubé à 37°C. Après 30 minutes, 1 heure et 2 heures d'incubation, le sang est centrifugé à 2000 Tr/min pendant 15 minutes et la radioactivité du culot cellulaire et du surnageant est mesurée avec l'activimètre.

Mesure de la fixation aux protéines plasmatiques

Différentes méthodes permettent d'évaluer la fixation non spécifique des complexes technétiiés aux protéines plasmatiques :

- Précipitation des protéines par l'acide trichloracétique 10%
- Electrophorèse

L'acide trichloracétique et la précipitation des protéines plasmatiques

Les protéines plasmatiques précipitent en présence d'acide trichloracétique à 10% ou TCA 10%.

- Un échantillon de 370 MBq (10 mCi) de peptide technétiié est incubé avec 2 ml de sang total à 37°C pendant 2 heures. Après 30 minutes, 1 et 2 heures, un prélèvement de 200 µl de sang est centrifugé et les cellules sanguines sont éliminées. Le sérum recueilli est mis en présence de TCA 10% et centrifugé à 1500 Tr/min pendant 10 minutes. La radioactivité des cellules sanguines, du surnageant et du précipité protéique est mesurée avec l'activimètre. Le surnageant est analysé par CLHP.

Détermination de la fixation aux protéines plasmatiques par électrophorèse

En dépit de la facilité de mesure de la fixation protéique par précipitation, le risque de coagulation des peptides marqués libres reste important. Pour cette raison, nous avons essayé de l'analyser par électrophorèse.

1. 37 MBq (1 mCi) de peptide marqué sont mis en contact avec 1 ml de sang humain total à 37 °C pendant 1 heure. 200 µl de sang sont prélevés et

centrifugés à 2000 Tr/min pendant 5 minutes. 40 µl de ce sérum sont déposés sur un gel d'agarose, hydragel K20 (Sebia®).

2. 40 µl de peptide marqué (afin de contrôler la migration du peptide libre) sont également déposés sur le même support, ainsi que 40 µl de sérum provenant du même sang incubé à 37°C pendant 1 heure.
3. Les gels sont mis dans une cuve sous une tension de 270 V pendant 35 minutes dans un tampon Tris-Barbital.
4. La répartition de la radioactivité le long du gel est mesurée à l'aide d'un appareil Berthold® et les différents pics de radioactivité sont associés aux différents groupes de protéines du sérum colorés préalablement.

I-1-5-Etude du métabolisme des complexes technétiés

Etude du métabolisme *in vitro*

L'évaluation de la pureté radiochimique du peptide marqué après incubation dans un échantillon de sang permet d'apprécier la décomplexation du traceur en fonction du temps et d'évaluer sa stabilité *in vitro*.

Stabilités sanguines des complexes cRGD-^{99m}Tc, RAFT-RGD-^{99m}Tc et RAFT-RAD-^{99m}Tc

La stabilité de ces peptides radiomarqués est déterminée après incubation de la préparation en présence de sang total sur une durée de 24 heures.

- Le radiomarquage de chaque peptide au ^{99m}Tc est réalisé avec une pureté radiochimique de plus de 95%.
- Un échantillon de 370 MBq de chaque peptide est dilué dans 5 ml de sang total prélevé extemporanément dans un tube hépariné. Le mélange est incubé à 37 °C dans un bain-marie, sous agitation, pendant 6 heures. Après 1, 4 et 6 heures d'incubation, une aliquote de sang est centrifugée et filtrée sur Nanosep® (10K oméga™, Pall life science, New York).
- Le sérum filtré est analysé par CLHP sur colonne C18 dans les conditions précisées au moment de l'analyse du marquage. Des fractions de 0,7 ml sont recueillies et mesurées à l'aide du compteur gamma Cobra®.

Evaluation de la trans-chélation du complexe RAFT-RGD-^{99m}Tc

Pour la mise au point d'un radiopharmaceutique, l'étude de la stabilité *in vitro* et *in vivo* est un critère essentiel. Le traceur ne doit pas être métabolisé, ni subir de trans-chélation par certains acides aminés de protéines biologiques présentes dans l'organisme «tels que la cystéine et l'histidine» et ce, pendant tout le temps nécessaire à sa distribution jusqu'à sa cible. Dans le cas où il y aurait une dégradation ou une décomplexation, la scintigraphie représenterait le technétium libre ou le métabolite technétié, ce qui entraînerait une erreur d'interprétation des images. Dans la littérature, différentes méthodes ont été utilisées afin de déterminer la stabilité des peptides marqués au ^{99m}Tc *in vivo* en incubant les complexes en présence de cystéine, d'histidine ou d'EDTA.

En 1999, Waibel R a montré que l'histidine présente la meilleure affinité pour le synthon tricarbonyle technétié du fait de la présence de ses atomes d'azote, dont un azote cyclique qui stabilise la structure. Ces atomes d'azote sont susceptibles de s'échanger avec les molécules d'eau du synthon, propriété qui nous aide à fabriquer nos complexes technétiés (Waibel R, 1999). De même, la cystéine présente une affinité importante pour le synthon tricarbonyle technétié par la présence de son groupement thiol. Ces deux acides aminés sont présents dans l'organisme sous forme d'acides aminés libres ou incorporés aux protéines.

Stabilité du complexe en présence de L-histidine et de cystéine

- 1 nmole de RAFT-RGD-^{99m}Tc est incubée avec respectivement 1 nmole, 10 nmole et 100 nmole de L-histidine à 37 °C pendant 1 heure. Le mélange est analysé par CLHP, colonne C18-RP (5 µm, 4,6 x 250 mm) dans les conditions d'analyse précitées.

- 1 nmole de RAFT-RGD-^{99m}Tc est mise en présence de solutions de concentrations variables en cystéine. Les quantités choisies en cystéine sont de 1 nmole, 10 nmoles et 100 nmoles. Chaque mélange peptide technétié-cystéine est incubé à 37°C pendant 1 heure dans un bain marie sous agitation et analysé par CLHP.

I-1- 6- Etude du métabolisme *in vivo*

Toutes les transformations apportées par le métabolisme peuvent modifier les propriétés physico-chimiques et pharmacologiques du traceur. Les études de cinétique sanguine ainsi que les études de biodistribution permettent de déterminer toutes ces modifications et aussi de sélectionner le radioligand qui présente les caractéristiques les plus favorables, telles qu'une clairance sanguine rapide, une élimination urinaire préférentielle et une grande stabilité. Les études de cinétique sanguine et de biodistribution de nos analogues RGD marqués au technétium-99m ont été effectuées par Lucie Sancey (Sancey 2006). En concomitance de la biodistribution, nous avons évalué la stabilité de marquage et l'influence du métabolisme sur les traceurs à partir de prélèvement de sang, d'urine, de foie et de rein. Chaque échantillon est analysé par CLHP.

Evaluation pharmacologique des peptides cRGD, RAFT-RGD, RAFT-RAD marqués au ^{99m}Tc pour la visualisation de l'angiogenèse tumorale

Trois types de souris ont été utilisés pour l'étude *in vivo* des analogues RGD technétiés, les souris nude, Balb/c et C57Bl/6J. Avant l'injection, les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine et de kétamine puis placées sous la camera dédiée au petit animal (γ imager Biospace). Des images sont réalisées à 1, 4 et 6 heures après administration du traceur.

A la fin de chaque l'expérience, des échantillons de sang et d'urine sont prélevés et analysés par CLHP :

1. Une goutte d'urine est recueillie puis diluée dans une solution de NaCl 0,9% (qsp 100 μ l) et analysée directement par CLHP.
2. Les échantillons sanguins sont prélevés dans le cœur et centrifugés immédiatement à 1500 Tr/min, le sérum obtenu est filtré sur Nanosep[®] 10K par centrifugation à 10000 Tr/min pendant 30 min et le filtrat est analysé par CLHP dans les conditions habituelles.

Des échantillons des principaux organes sont prélevés, pesés et la radioactivité est comptée à l'aide du passeur gamma Cobra pour l'étude de biodistribution du traceur. Afin d'évaluer la stabilité du traceur dans le foie et les reins, ces organes sont broyés dans 200 μ l de tampon phosphate pH 7,4. Le broyat final homogène est centrifugé et le surnageant filtré sur Nanosep[®] 10 K omega[™] et le filtrat analysé par CLHP.

I-2- Marquage à l'indium-111

L'Indium-111, un des métaux de post-transition du groupe 13, est un émetteur γ utilisé essentiellement pour l'imagerie biomédicale. Les métaux de post-transition ne peuvent remplacer le technétium-99m, facilement disponible à un coût relativement faible, que dans le cas où la cinétique du phénomène biologique à étudier est trop lente par rapport à la demi-vie du technétium ($T_{1/2}=6,02$ h). Dans ces conditions, l'indium-111 peut avantageusement être substitué au technetium-99m. Cette situation se présente surtout dans le cas du marquage d'anticorps, de peptides ou d'oligonucléotides dont les cinétiques de biodistribution sont souvent lentes (de l'ordre de 24 heures). Différents chélates bifonctionnels (DOTA, OXIN, DTPA) existent et permettent un marquage de petits protéines et de peptides à l'indium. Le macrocycle DOTA (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid) est choisi à cause de ses avantages par rapport à d'autres chélates (Partie I-chapitre II-6). Le DOTA peut coordiner un ion indium avec son cycle à quatre azotes dont chacun est lié à une chaîne latérale carboxylate.

I-2-1- Définition des paramètres de marquage de RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In

Pour effectuer le radiomarquage du peptide RAFT-RGD à l'Indium-111, la présence d'un groupe intermédiaire DOTA est nécessaire. Ce groupe est fixé sur le gabarit RAFT à l'emplacement de l'histidine préalablement utilisée pour le marquage au technétium-99m. Ceci est réalisé par l'équipe du Pr. Dumy.

Radiomarquage de l'Indium-111 par l'intermédiaire du DOTA

La fixation de l'Indium-111 sur le cycle DOTA dépend de nombreux paramètres : nature du solvant, température et pH de la réaction, durée d'incubation et concentration du peptide.

Nous avons testé la possibilité de marquer le peptide RAFT-RGD-DOTA sous différentes conditions :

- Compte tenu des propriétés de l'indium le peptide est dilué (1 mg/ml) dans des solutions d'acétate d'ammonium 0,1M et 1 M à pH=4.

- 5, 35, 50 et 100 μl (1 mg/ml) de peptide sont incubés avec 1,85 MBq (50 μCi) d'indium-111 sous forme In^{3+} , à 70°C.
- Les préparations sont analysées par CCM et CLHP après 30 minutes d'incubation.

Conditions d'analyse :

Par CCM : l'analyse par chromatographie sur couche mince est réalisée en utilisant du papier Whatman 2 mm et de la silice fixé sur de la fibre de verre (ITLC) «*silicagel impregnated glass fiber sheet*» (PALL Life sciences) comme phases stationnaires. Plusieurs solvants ont été testés : H_2O , Méthanol, Citrate de sodium et un mélange NH_4AC 10% / méthanol (80/20). L'objectif de cette étude est de préciser le R_f de l'indium libre et de ses complexes. Pour ce faire, une aliquote de 1 μl de InCl_3 et des différents complexes sont analysées dans les différentes conditions. Après migration des échantillons sur 10 cm, la phase stationnaire est analysée par un détecteur de radioactivité Berthold.

Par CLHP : une colonne RP-C18 lichrosorb[®] est utilisée avec un gradient de solvants H_2O -TFA 0,1%(A) et acétonitrile-TFA 0,1%(B), de 0-5 min 5% de B, 5-25 min 5%-80% de B et 25-30 min 80% de B. L'éluion s'effectue à un débit de 0,7 ml/min. Des échantillons de InCl_3 et de peptide RAFT-RGD-DOTA froid sont injectés. Le temps de rétention de l'indium-111 est déterminé par le détecteur de radioactivité et celui du peptide par le détecteur UV à 254 nm.

- La stabilité du peptide a été étudiée en fonction de la température entre 60°C et 100°C et suivie par CLHP dans les conditions décrites ci-dessus. Une dégradation est notée autour de 100°C, le marquage est donc étudié à 70°C.

Influence de la quantité de peptide

L'efficacité du marquage à l'indium a été étudiée pour des quantités comprises entre 5 et 500 μg .

1,85 MBq (50 μCi) d'Indium-111 sont mis en présence de 5, 35, 50, 100 et 500 μg de RAFT-RGD-DOTA dilués dans de l'acétate d'ammonium 1M à une concentration de

1 mg/ml. Ces solutions sont incubées à 70°C et après 30 minutes d'incubation, les préparations sont analysées par CLHP.

Influence de la température

Pour préciser l'influence de la température, le marquage a été étudié à des températures de 60°C et 80°C. L'étude précédente a montré que le marquage était réalisable avec une activité spécifique de 18,5 MBq (50 µCi) / 35 µg :

35 µg de RAFT-RGD-DOTA sont donc dissous dans une solution d'acétate d'ammonium 1M à une concentration de 1 mg/ml. Cette solution est incubée avec 1,85 MBq d'indium soit à 60°C, soit à 80°C. Des aliquotes sont prélevées à partir de 10 min toutes les 5 minutes et le rendement est mesuré par CCM. Une analyse CLHP est effectuée après 20, 30 et 40 minutes d'incubation.

Concentration et nature des solvants

Toutes ces expériences ont montré que le marquage est réalisable avec une pureté radiochimique de plus de 90%. Afin de vérifier si cette valeur peut être encore améliorée en changeant le solvant ou la concentration du solvant, le radiomarquage est réalisé dans du NaCl 0,9% et de l'acétate d'ammonium entre 0,01 et 1 M.

- 1,85 MBq d'In-111 sont mis en présence de 35 µg de peptide RAFT-RGD-DOTA dilués soit dans du NaCl 0,9%, soit dans de l'acétate d'ammonium à 0,01, 0,1 ou 1 M.
- Chaque préparation est incubée à 80°C pendant 20 minutes puis analysée en CLHP dans les conditions habituelles.

I-2-2- Evaluations physico-chimiques et biologiques de RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In

• Evaluation de la stabilité du radiomarquage dans le temps

Le marquage est effectué avec 35 µg de peptide en présence de 1,85 MBq d'indium-111 dans une solution d'acétate d'ammonium à 0,1 M pendant 20 minutes à 80°C.

La stabilité de la molécule radiomarquée est mesurée dans le temps, dans le milieu de marquage.

- La solution de peptide marqué est conservée à température ambiante pendant 48 heures. La pureté radiochimique est évaluée en prélevant des aliquotes à 1, 2, 4, 8, 24 et 48 heures qui sont ensuite analysées par CLHP.

- **Evaluation du coefficient de partage du peptide marqué**

La lipophilie du RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In est déterminée par la mesure de son coefficient de partage entre l'octanol et une solution tampon phosphate sodique à pH 7,4.

3,7MBq (100 µCi) du peptide marqué sont ajoutés au mélange tampon phosphate / octanol (V/V). L'échantillon est vortexé 5 minutes puis centrifugé pendant 1 minute. 100 µl de chaque phase sont recueillis et la radioactivité est mesurée.

- **Evaluation de la répartition sanguine**

À partir de la circulation générale, les traceurs se distribuent dans l'organisme. La distribution tissulaire est due à la différence d'affinité entre les protéines plasmatiques et les cibles cellulaires ; plus la fixation aux protéines plasmatiques est importante et forte, moins le traceur peut diffuser dans les tissus car seule la forme libre est diffusible.

Pour apprécier la disponibilité de notre traceur, sa liaison aux cellules et aux protéines sanguines est évaluée.

Détermination de la fixation sur les globules

37 MBq (1 mCi) de traceur marqué sont placés dans 1 ml de sang total humain. Des échantillons de 200 µl sont prélevés après 1, 2 et 6 heures d'incubation, puis centrifugés à 2000 Tr/min pendant 5 minutes. Ce test permet d'évaluer la proportion de traceur qui est liée aux cellules sanguines.

Détermination de la fixation sur les protéines plasmatiques par électrophorèse

Les surnageants des expériences précédentes ont été analysés par électrophorèse afin de déterminer la fixation du traceur sur les différentes protéines plasmatiques.

Evaluation de la stabilité du marquage dans le sang humain *in vitro*

37 MBq (1 mCi) de la préparation sont incubés avec 1 ml de sang total dans un bain-marie à 37°C sous agitation pendant 24 heures. Des aliquotes de 100 µl de sang sont prélevées après 30 minutes, 1, 2, 4, 6 et 24 heures d'incubation. Chaque échantillon est centrifugé à 2000 Tr/min pendant 5 minutes afin d'éliminer les globules. Les surnageants sont passés à travers d'une membrane filtrante (Nanosep® 10K oméga™, Pall life science, New York, USA) en centrifugeant à 10000 Tr/min pendant 20 minutes afin d'éliminer les grosses protéines. Le filtrat est analysé par CLHP dans les conditions habituelles.

I-2-3- Evaluation du métabolisme *in vivo*

Les expérimentations animales ont été réalisées chez la souris C57Bl/6J greffée avec le mélanome B16F0, en conformité avec les lois sur l'expérimentation animale.

La biodistribution et l'imagerie ont été étudiées après injection du traceur radioactif dans une des veines latérales de la queue à différents temps. A la fin de chaque expérience, des échantillons de sang, d'urine, de foie et de rein ont été analysés par CLHP pour déterminer la stabilité du traceur.

I-2-4- Evaluation pharmacologique du peptide marqué

- Après avoir vérifié la pureté radiochimique du RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In, 3,7 MBq (100 µCi) de la préparation sont injectés dans une veine latérale de la queue de souris.

- Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine (15mg/kg) et kétamine (75mg/kg) puis placées sous la camera dédiée au petit animal (γ imager Biospace). Des images sont réalisées à 30 minutes, 1, 2, 24 et 48 heures après l'administration du traceur.

- A la fin de chaque expérience, les échantillons de sang et d'urine sont prélevés et analysés par CLHP.

Les échantillons d'urine sont recueillis et dilués dans 100 µl de NaCl 0,9% et injectés directement sur la colonne de CLHP.

Les échantillons de sang sont prélevés dans le cœur et sont centrifugés immédiatement, le sérum obtenu est filtré sur Nanosep[®] et analysé par CLHP en présence d'un gradient de solvant déjà décrit.

- Des échantillons des principaux organes sont prélevés, pesés et la radioactivité est comptée pour l'étude de la biodistribution du traceur.
- Afin d'évaluer la stabilité du traceur dans le foie et les reins, ces organes ont été broyés dans un tampon phosphate à pH 7,4. Les solutions homogènes sont centrifugées, le surnageant filtrés sur Nanosep[®] 10K et le filtrat est analysé par CLHP.

I-2-5- Détermination du produit inconnu détecté dans les reins

Comme il sera expliqué dans la partie Résultats, l'analyse des reins montre l'apparition d'un complexe marqué, plus hydrophile que le RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In. Nous avons émis l'hypothèse que ce composé pourrait être le complexe DOTA-indium-111 qui se serait séparé du peptide lui-même. Nous avons donc étudié la complexation de l'indium-111 avec le groupement DOTA et déterminé ainsi les propriétés physico-chimiques de ce complexe afin de les comparé à celles du produit inconnu obtenu dans les reins.

Radiomarquage du DOTA à l'indium-111

30 µl de la solution du groupement DOTA dans de l'acétate d'ammonium à 0,1 M (pH=5) à une concentration de 1 mg/ml sont incubés avec 37 MBq (1 mCi) d'indium-111 pendant 20 minutes à 80°C.

Le contrôle de la pureté radiochimique est effectué par CLHP, sur colonne C18 Lichrosorb, avec un gradient des solvants H₂O/TFA 0,1% (A) et acétonitrile/TFA 0,1%-H₂O/TFA 0,1% (90/10) (B), de 0 à 5 minutes 5% de B, de 5 à 20 minutes 5-60% de B, de 20-27 minutes 60% de B, de 27-29 min 60-80% de B, 30 minutes 5% de B ; un débit à 0,7ml/min et une détection de la radioactivité. En sortie de colonne, l'éluât est recueilli par fractions de 0,7 ml dans des tubes à hémolyse. L'activité de ces tubes est mesurée au passeur gamma Cobra.

Après confirmation de la pureté radiochimique du marquage du DOTA à l'indium-111, l'étude du coefficient de partage est réalisée afin d'expliquer la forte captation rénale.

L'étude de la lipophilie du DOTA-¹¹¹In

3,7MBq (100 µCi) de DOTA-¹¹¹In sont ajoutés à 1 ml d'un mélange octanol / tampon phosphate à pH 7,4. Cette préparation est vortexée, centrifugée et les deux phases sont séparées. La radioactivité de 100 µl de chaque phase est mesurée à l'aide d'un activimètre Capintec® CRC15.

Détermination de la charge électrique par résines échangeuses d'ions

3,7MBq (100 µCi) de la solution radiomarquée sont déposés sur les colonnes échangeuses d'anions et de cations. Des fractions de 200 µl de NaCl sont ensuite déposées afin d'éluer le composé radiomarqué. Les éluants sont recueillis et comptés à l'activimètre.

II-Radiomarquage du peptide HARP111-124 ; marqueur de l'angiogenèse

II-1-Marquage à l'Iode-125

Préparation du traceur iodé

Le marquage s'effectue par iodation directe d'un résidu tyrosine présent à l'extrémité du peptide. L'iode est apporté sous forme d'iodure de sodium Na¹²⁵I (Amersham Bioscience). L'iode est oxydé selon la méthode à la chloramine-T (en solution ou sous forme commerciale Iodobeads®). Le réactif oxydant transforme les ions ¹²⁵I⁻ en ions iodonium ¹²⁵I⁺. Ces derniers sont 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 double liaisons ou un noyau aromatique, et notamment en « ortho » des résidus OH de la tyrosine du peptide. La réaction est stoppée par suppression de l'oxydant, ce qui inactive les formes oxydées de l'iode.

Optimisation du marquage du HARP 111-124 à l'iode-125

Un résidu tyrosine est ajouté à l'extrémité C- terminale de la molécule HARP111-124 afin de permettre la radioiodation.

La concentration en chloramine-T doit être aussi faible que possible afin de limiter le risque de dénaturation du peptide. Afin de réduire la réaction d'oxydation et en considérant que le HARP 111-124 est très sensible à l'oxydation, nous avons décidé d'utiliser l'Iodobeads[®] comme oxydant.

- 37 MBq (1mCi) de Na¹²⁵I, dilué dans 100 µl de tampon phosphate sont mis en contact avec une bille d'Iodobeads[®] pendant 5 minutes à température ambiante.
- 20 µg de peptide sont ajoutés et incubés dans les mêmes conditions.
- Après 15 min de contact avec l'oxydant, l'Iodobeads[®] est séparé de la solution.
- L'analyse de la pureté radiochimique par CLHP est effectuée sur une colonne RP, C4 Waters[®] avec un gradient des solvants H₂O/TFA 0.1% (A) et acétonitrile /TFA 0.1% - H₂O/TFA 0.1% (90/10) (B), de 0 à 5 minutes 5%B, de 5 à 20 minutes 5-60% B, de 20-30 minutes 60% B; débit 0.7ml/min et détection de la radioactivité.

La pureté radiochimique de ce peptide marqué est inférieure à 90%. Il doit donc être purifié. Pour ce faire, le peptide est passé sur colonne Sephadex G5, colonne C18 Sep-pak ou sur colonne échangeuse d'anion. Différents solvants aqueux et organiques sont testés. Ils doivent être compatibles avec une administration chez l'homme ou être éliminés par évaporation si nécessaire : eau distillée, NaCl 0,9%, éthanol, acétonitrile, acétone. L'objectif est d'éliminer les iodures libres.

Différentes méthodes de séparation ont été testées :

1. Chromatographie sur colonne Sephadex G5 :

3,7 MBq de solution issue du radiomarquage sont déposés sur la colonne, et élués 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 (65/35).

2. chromatographie échangeuse d'ions :

Une colonne échangeuse d'anions est préparée. 3,7 MBq de solution radiomarquée sont déposés sur la colonne et élués par fractions de 0,5 ml de chlorure de sodium 0,9%,

3. chromatographie sur colonne Sep-pak C18

3,7 MBq de solution radiomarquée sont déposées sur la colonne (la colonne est activée préalablement par le méthanol) et éluées par des fractions de 3x0,5 ml de chlorure de sodium 0,9% afin d'éliminer les iodures libres. Puis le peptide est élué par des fractions de 3x0.5 ml d'Ethanol/H₂O 50/50.

II-2-Evaluations physico-chimiques et biologiques du HARP111-124

Etude de stabilité *in vitro*

La stabilité du traceur est évaluée par CLHP. Le traceur HARP-P111-124-¹²⁵I est incubé en présence de sang humain total à température ambiante. Après 1, 3 et 6 heures d'incubation, le sérum est recueilli, filtré sur Nanosep[®] et analysé dans les conditions décrites. Le peptide incubé en sérum physiologique est analysé directement de la même manière.

Fixation sur les protéines plasmatiques

L'étude de fixation sur les protéines plasmatiques est effectuée par précipitation des protéines par le TCA 10%.

II-3-Etude de biodistribution, imagerie et stabilité *in vivo* chez la souris nude porteuse de tumeurs MDA-MB231

L'étude de biodistribution est suivie par imagerie, effectuée par Julien Dimastromatteo. Les souris font l'objet d'une imagerie scintigraphique planaire (gamma-imager, Biospace Mesures, Paris, France). 7.4MBq (200 µCi) du radiotraceur sont injectés aux souris. Après 30 minutes et 6 heures, les animaux sont sacrifiés et les organes principaux sont prélevés pour mesurer la radioactivité qu'ils contiennent (Cobra II – Packard). Des échantillons de sang et d'urine sont également prélevés pour analyse de la stabilité du traceur par CLHP.

III- Marqueurs de la plaque d'athérome : radiomarquage des analogues B2702, BOT 321, BOT337 et EP070946 ;

- **Marquage au Technetium-99m**

Tous les marqueurs de la plaque d'athérome testés, ont été radiomarqués au technétium-99m. Comme les analogues RGD, les marquages ont été effectués par l'intermédiaire du petit synthon tricarbonyle Isolink[®] Mallinkrodt.

III-1-Les peptides B2702 :

11 peptides ont été marqués : B2702 et PB_n (n=1-10). Nous avons en premier lieu testé la possibilité de marquer le peptide B2702 sous différentes conditions de température et de durée de chauffage.

- Une solution de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ à 2200 MBq/1ml est préparée et neutralisée à pH 8 par HCl 2N.
- 550 MBq (~15mCi) de cet intermédiaire sont mis en présence de 50 µg de peptide, précédemment dilués en solution aqueuse à 1 mg/ml.
- Deux échantillons de cette solution sont incubés à 50°C et 80°C respectivement pendant 40 minutes (Le peptide B2702 froid, est stable jusqu'à 100 °C (Valérie Ardisson 2006)).
- Toutes les 10 minutes, un aliquote de ces préparations est prélevée et analysée par CCM (RP18, solvant NaCl 0,9% et acétonitrile/H₂O (60/40)). La distribution de la radioactivité sur ces plaques est mesurée grâce à un radiochromatographe Berthold[®].
- A 30 minutes, les aliquotes (0.37MBq [10 µCi]) sont analysés en CLHP, par une colonne C18, gradient d'élution H₂O-TFA 0,1% (A) / (acétonitrile-TFA 0,1%)-(H₂O -TFA 0,1%) (90/10) (B) ; de 0 à 5 mn 5 % de B, de 5 à 20 mn de 5% à 60 % de B, et de 20 à 30 mn 60% de B ; débit 0,7 ml/mn ; détecteur UV et détecteur de radioactivité.

Activité spécifique

L'expérience précédente nous a montré que le marquage est réalisable avec une activité spécifique de 11 MBq/µg. Nous avons essayé d'augmenter cette valeur dans les mêmes conditions.

- La solution de $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ est préparée et neutralisée à pH 8 par HCl,
- 50 µg de peptide sont mis en contact avec 1110 MBq (30mCi), 1500 MBq (~40mCi) et 1850 MBq (50 mCi) de l'intermédiaire technétié,

- Chaque solution est incubée à 80 °C pendant 30 minutes puis analysée par CLHP dans les conditions précédentes.

Après détermination des paramètres de marquage de B2702, nous avons testé les 10 dérivés (PB_n (n=1-10)) dans les mêmes conditions, afin d'avoir des traceurs technétiés avec une pureté radiochimique supérieure à 95%.

Propriétés physico- chimiques et pharmacologiques des peptides B2702 (B2702 et PB1 à PB10)

Différentes analyses ont été effectuées afin de déterminer les propriétés physico-chimiques de ces peptides. Nous avons étudié leur stabilité dans le temps, leur lipophilie ainsi que leur métabolisme sanguin chez la souris.

- Mesure de la stabilité : Chaque échantillon est conservé pendant 6 heures à température ambiante et jusqu'à 24 heures à une température entre 4°C et 8 °C. Un échantillon de solution est prélevé et analysé par CLHP, 3, 6 et 24 heures après la préparation.
- Mesure de coefficient de partage : la lipophilie de chaque molécule est déterminée par mesure de coefficient de partage par la méthode déjà décrite.
- Mesure de la fixation aux protéines plasmatiques : cette valeur est déterminée par électrophorèse pour B2702 et pour les autres dérivés en précipitant les protéines sériques par TCA 10%. Afin de vérifier que le peptide-même ne précipite pas en présence de TCA 10%, ces valeurs sont déterminées dans un second temps par ultrafiltration. Une fraction du sang total (incubé avec le traceur technétié) est filtré sur Nanosep[®] 10 K à 9000 Tr/min pendant 30 minutes et les activités du filtre et du filtrat sont mesurées à l'activimètre.
- Mesure de la stabilité sanguine de B2702 *in vitro* : le peptide radiomarqué est incubé avec le sang total humain pendant 6 heures à 37°C sous agitation. L'analyse de CLHP est effectuée sur les prélèvements à 1, 3 et 6 heures.

- Etude métabolique *in vivo*: les expérimentations animales ont été réalisées chez la souris C57Bl/6 contrôle et C57Bl/6 ApoE *-/-* hypercholestérolémique. L'artère carotide gauche de ces animaux est ligaturée afin d'induire la formation d'une plaque d'athérome. Après 3 semaines, le traceur est injecté et l'imagerie et la biodistribution ont été étudiés après 3 heures post injection. L'étude de stabilité du traceur *in vivo* a été effectuée par prélèvement de sang et d'urine au moment de la biodistribution (3 heures après injection).

III-2-Les peptides BOT 321 et BOT 337 (dérivé de VLA4) et EP070946

Les 2 peptides BOT 321 et BOT 337 ont été synthétisés par l'équipe de chimie du LEDSS V (Pr. Dumy). Chaque peptide a 15 acides aminés. Le peptide EP070946 synthétisé par EUROGENTEC, possède 14 acides aminés. Dans chacun de ces peptides, une histidine est ajoutée sur la lysine, afin de donner la possibilité de marquage au technetium-99m toujours par l'intermédiaire d'Isolink[®].

La méthode de marquage est identique au B2702.

Pour tous les peptides étudiés :

- nous avons testé leur résistance à la chaleur jusqu'à 100°C,
- Sur 100 µg de chaque peptide, 740 MBq de l'intermédiaire technétié préalablement préparé sont ajoutés. Le temps d'incubation et la température optimale de la réaction sont déterminés,
- Dans les mêmes conditions, la pureté radiochimique et l'activité spécifique jusqu'à 37MBq/µg (1 mCi/µg) ont été étudiées,
- La lipophilie et la stabilité du traceur dans le temps et dans le sang total sont également mesurées,
- La répartition sanguine et la fixation non spécifique sur les protéines plasmatiques sont étudiées par précipitation à l'aide de TCA 10%,
- Les études *in vivo* (biodistribution et imagerie) chez la souris C57Bl/6 contrôle et C57Bl/6 ApoE *-/-* hypercholestérolémique sont effectuées, et les échantillons de sang et d'urine sont analysés par CLHP au terme de chaque manipulation.
- Toutes les analyses ont été faites par CLHP sur une colonne C4 Waters[®] avec un gradient d'élution de H₂O-TFA 0,1% (A) / acétonitrile-TFA 0,1% (B) ; de 0 à

5 mn 5 % de B, de 5 à 20 mn de 5% à 80 % de B, et de 20 à 30 mn 80% de B ; débit 0,7 ml/mn - détecteur UV et détecteur de radioactivité ont été utilisés.

IV- Radiomarquage du peptide P140, un agent thérapeutique de lupus érythémateux disséminé

- Optimisation de réaction de radioiodation

Le marquage est effectué par l'iode-125. Il existe 3 résidus tyrosine dans la séquence peptidique, qui permettent la fixation de l'iode par substitution électrophile.

- Radioiodation de P140 par Iodobeads[®]

Afin d'utiliser une quantité de chloramine-T aussi faible que possible et de diminuer le risque de dénaturation par cet oxydant, nous avons utilisé l'Iodobeads[®] :

- 37 MBq (1 mCi) d'une solution de Na¹²⁵I dilué dans 100µl de PBS sont mis en contact avec de l'Iodobeads[®]. Après 5 minutes d'oxydation, 30 µg d'une solution aqueuse à 1 mg/ml de P140 sont ajoutés et incubés pour 15 minutes à température ambiante. En fin de réaction, l'oxydant (Iodobeads[®]) est retiré et le peptide P140 marqué est analysé par CLHP sur une colonne C4 Waters[®] avec un gradient d'élution de H₂O-TFA 0,1% (A) / acétonitrile-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn 5 % de B, de 5 à 20 mn de 5% à 80 % de B, et de 20 à 30 mn 80% de B ; débit 0,7 ml/mn - détecteur UV et détecteur de radioactivité ont été utilisés.

La pureté radiochimique de ¹²⁵I-P140 est supérieure à 90% et la purification n'est donc pas nécessaire. Cette méthode est facile et efficace. La réaction s'arrête par élimination de Iodobeads[®] et la présence de réducteur n'est pas nécessaire. En dépit de tous ces avantages, la quantité de peptide fixée sur la bille d'Iodobeads[®] est importante. En outre la quantité très limitée de Chloramine-T fixée sur la bille ne permet pas d'augmenter l'activité du marquage. Pour ces raisons nous avons choisi de marquer le peptide P140 par la méthode à la chloramine-T en solution aqueuse.

Radioiodation de P140 par la méthode à la chloramine-T

- A une quantité définie de P140 dilué à une concentration de 1 mg/ml dans l'eau, nous ajoutons une solution d'iodure¹²⁵ de sodium à haute activité spécifique, de 2 à 10 µl en fonction de l'activité demandée, puis une solution de chloramine-T dont on déterminera la quantité optimale. Cette dernière doit être aussi faible que possible afin de limiter le risque de dénaturation du peptide. On agite et laisse incubé à température ambiante.

- Après 20 minutes d'incubation, la réaction d'oxydation est stoppée par l'ajout d'un agent réducteur, le pyrosulfite de sodium à 4 mg/ml (40 µl, 920 nmoles). Le rendement de marquage est déterminé par CLHP.

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

Etude *in vitro* et *in vivo*

Après définition des paramètres de marquage et mesure de la stabilité de celui-ci dans le temps et en présence du sang humain total, les deux peptides ont été injectés aux souris contrôles et lupiques, l'imagerie et la biodistribution sont faites à 60 minutes et 3 heures post-injection (toutes les études de biodistribution et d'imagerie ont été réalisés par Pascal PERRET).

A la fin d'expérience, des échantillons de sang et d'urine sont analysés par CLHP pour mesurer la stabilité du peptide iodé *in vivo*.

C- Résultats

C- Résultats

I- Marquage des analogues RGD, marqueurs de l'angiogénèse

I-1-Marquage au technétium-99m

Sachant que de nombreux acides aminés sont susceptibles de réagir avec le synthon carbonyle technétié, le marquage du peptide RAFT-RGD-tyrosiné a été testé par Valérie Ardisson (Ardisson2006). Il a ainsi été montré que la pureté radiochimique ne dépasse pas 30% et que de multiples pics se présentent sur le chromatogramme de CLHP. Pour cette raison, il a été décidé de fixer une histidine sur la structure du RAFT de RAFT-RGD ou RAFT-RAD et sur la lysine du cRGD afin de stabiliser le complexe technétié préalablement formé.

I-1-1-Condition de la réaction de marquage de cRGD

L'analyse CLHP du peptide froid montre que la molécule n'est pas dégradée après 30 minutes d'incubation à 100°C. La réaction de marquage peut être réalisée à 80°C afin d'augmenter la cinétique de complexation du peptide avec le synthon tricarbonyle.

Une pureté radiochimique supérieure à 95% est obtenue soit après 30 minutes d'incubation lorsque la réaction de marquage est réalisée à 50°C soit après 20 minutes d'incubation à 80°C (n=3) (figure 46). La réaction n'est pas complète après une incubation à 25°C pendant 2H.

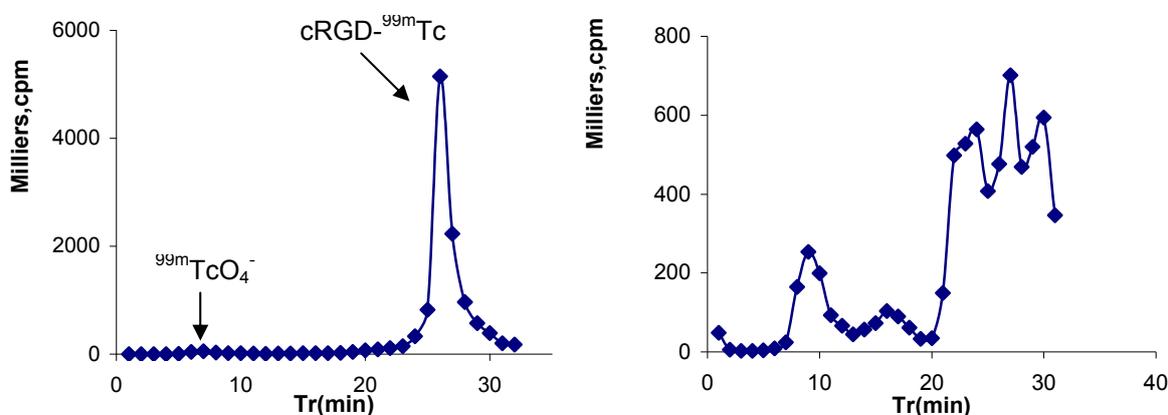


Figure 46: Chromatogrammes de cRGD-^{99m}Tc après incubation à 80°C pendant 20 minutes (a) et 25°C pendant 2h (b).

- Mesure de l'activité spécifique

Lorsque la réaction de marquage est réalisée en présence de 1500 MBq de solution technétée, la quantité minimum de peptide cRGD est de 50 µg (45 nmole) (avec 10 et 25 µg, la quantité de peptide pour obtenir une pureté radiochimique supérieure à 95% n'est pas suffisante). L'activité spécifique envisageable avec 50 µg de cRGD peut augmenter jusqu'à 44 MBq/µg (2.2 GBq de solution technétée pour 50µg du peptide). Avec 100 µg de cRGD, l'activité spécifique est toujours 44 MBq/µg.

- Etude de milieu de marquage

La pureté radiochimique est toujours supérieure à 95% quel que soit le solvant : PBS à pH 7.4, NaCl 0.9%, ou eau pure.

I-1-2- Condition de la réaction de marquage de RAFT-RGD

- Le RAFT-RGD est moins soluble que le cRGD dans l'eau pure ou dans les différentes solutions aqueuses. La présence de 20% d'éthanol est nécessaire pour dissoudre le lyophilisat dans un volume final de 100 µl. Dans les solutions salines, la proportion d'éthanol est de 25% pour volume final de 150 µl.

- L'analyse de la dégradation du peptide après incubation à 50°C, 80°C et 100°C pendant 30 minutes montre que le peptide est stable à la chaleur à 80 °C pendant 30 minutes. A 100°C, le RAFT-RGD commence à se dégrader après 15 minutes d'incubation.

- 100 µg du peptide sont marqués par 740 MBq d'Isolink® technétié après incubation à 70°C pendant 60 minutes au bloc chauffant en flacon fermé et serti. La pureté radiochimique mesurée par CCM (figure 47) après 15 minutes est de 80% et est supérieure à 95% à partir de 20 minutes. Ces résultats sont confirmés par CLHP. Le peptide RAFT-RGD-^{99m}Tc a un temps de rétention de 28 minutes, celui du TcO₄⁻ est de 5-7 minutes.

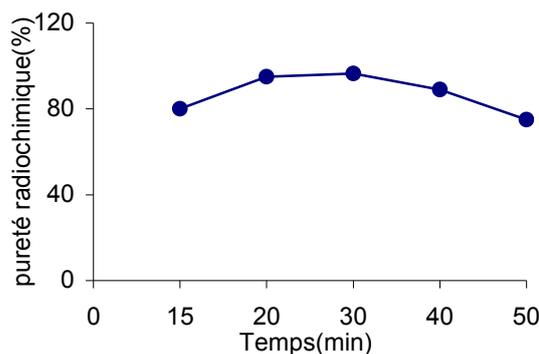


Figure 47 : Influence de la durée d'incubation sur la pureté radiochimique

▪ Détermination de l'activité spécifique

Puisque la réaction de marquage de 100 μg /740 MBq est effectuée avec une bonne pureté radiochimique, nous avons essayé d'augmenter l'activité spécifique afin d'améliorer les résultats obtenus en imagerie.

Après 20 minutes d'incubation à 70°C des aliquots de 50 μg en présence de 555 MBq (15mCi), 740 MBq (20mCi) et 925 MBq (25mCi), l'analyse CLHP a été effectuée. Les puretés radiochimiques sont respectivement supérieures à 90%, 70% et 20%. Ainsi, le marquage de 50 μg en présence de 555 MBq (15mCi) est acceptable. Nous avons décidé d'augmenter la masse de peptide pour améliorer l'activité spécifique compte tenu de l'activité à injecter pour obtenir des images correctes.

L'analyse CLHP des préparations de 100 μg de RAFT-RGD en présence de 1510 MBq (30 mCi), 1700 MBq (35 mCi) et 1880 MBq (40 mCi) de $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ a montré des puretés radiochimiques >95, >90 et >70% respectivement. En conséquence, la meilleure activité spécifique acceptée est de 100 μg de peptide avec 1700 MBq (35 mCi), soit 79 GBq/ μmole .

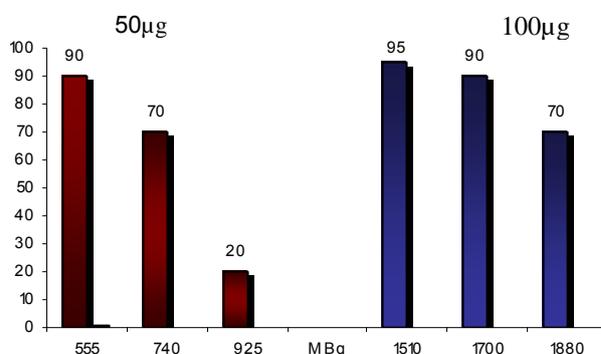


Figure 48 : Détermination de l'activité spécifique de RAFT-RGD-^{99m}Tc

I-1-3- Condition de marquage de RAFT-RAD

Les conditions de marquage de RAFT-RAD sont presque identiques à celles du RAFT-RGD.

La pureté radiochimique est supérieure à 95%, effectuée par CLHP après incubation de 100 µg du peptide avec 1510 MBq (30 mCi) de synthon bifonctionnel. Le temps de rétention est 26 minutes.

Conservation des peptides RGD technetiés

L'analyse CLHP des trois dérivés peptidiques RGD a montré que leur stabilité est supérieure à 95% après 8 heures d'incubation à température ambiante et supérieure à 90% après 24 heures à 4°C. Les peptides sont donc stables pendant leur temps d'utilisation.

I-1-4-Propriétés physico-chimiques des dérivés RGD marqués au ^{99m}Tc

▪ Coefficient de partage

La répartition des peptides entre la phase octanolique et la phase aqueuse (tampon phosphate) est étudiée à pH biologique (7.4). L'analyse montre que la valeur Log₁₀P de cRGD-^{99m}Tc, RAFT-RGD-^{99m}Tc et RAFT-RAD-^{99m}Tc est respectivement de -1,9, -0,7 et -1,75 (tableau 6). Tous les analogues RGD technetiés sont hydrophiles et solubles dans l'eau.

Traceur	cRGD-[^{99m} Tc]	RAFT-RGD-[^{99m} Tc]	RAFT-RAD-[^{99m} Tc]
Log P	-1,92	-0,72	-1,75
[Oct]/[H ₂ O](KBq)	1,2/100	19/100	1,7/100

Tableau 6: Valeurs de Log ([Oct]/[H₂O]) pour les dérivés RGD

▪ Fixation aux cellules sanguines

Les peptides RGD technetiés ont été incubés avec les conditions décrites dans le chapitre Méthodes. Pour l'ensemble des dérivés RGD, après centrifugation, 75-85% de l'activité totale est retrouvée dans le sérum et 15-25% dans le culot cellulaire au cours du temps (de 30 minutes à 2 heures).

▪ Fixation aux protéines plasmatiques

- Pour le RAFT-RGD-^{99m}Tc : Après précipitation des protéines sériques par une solution d'acide trichloracétique 10%, 40-50% de l'activité est retrouvée dans le culot peptidique et plus de 40% de l'activité persiste dans le surnageant. Le même exercice pour RAFT-RAD-^{99m}Tc montre que seulement 10% de l'activité est liée aux protéines plasmatiques et plus de 85 % dans le surnageant.

- Afin de préciser la fixation aux protéines plasmatiques et de vérifier que la précipitation par le TCA 10% n'entraîne pas le complexe non fixé sur les protéines plasmatiques, nous avons étudié cette liaison protéique par électrophorèse. La radioactivité associée aux différentes bandes protéiques est mesurée par un radiochromatographe Berthold®.

La figure 49 présente le profil électrophorétique du sérum humain normal. Il servira de référence pour interpréter les résultats des électrophorèses des peptides.

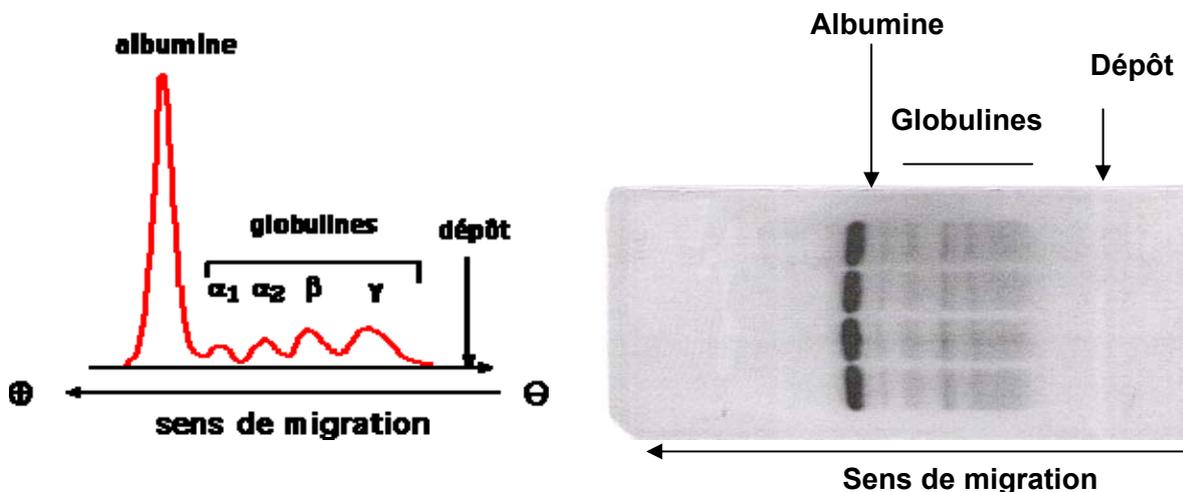


Figure 49 : Profil électrophorétique du sérum humain.

Les résultats obtenus à partir de RAFT-RGD-^{99m}Tc indiquent 3% de fixation sur l'albumine et 40-50% sur les globulines, tandis que pour le RAFT-RAD-^{99m}Tc, on a seulement une fixation de 8-10% sur l'albumine tandis que plus de 85 % du peptide technétié n'est pas fixé et reste libre, ce qui confirme les résultats obtenus par précipitation avec le TCA 10% (figure 50).

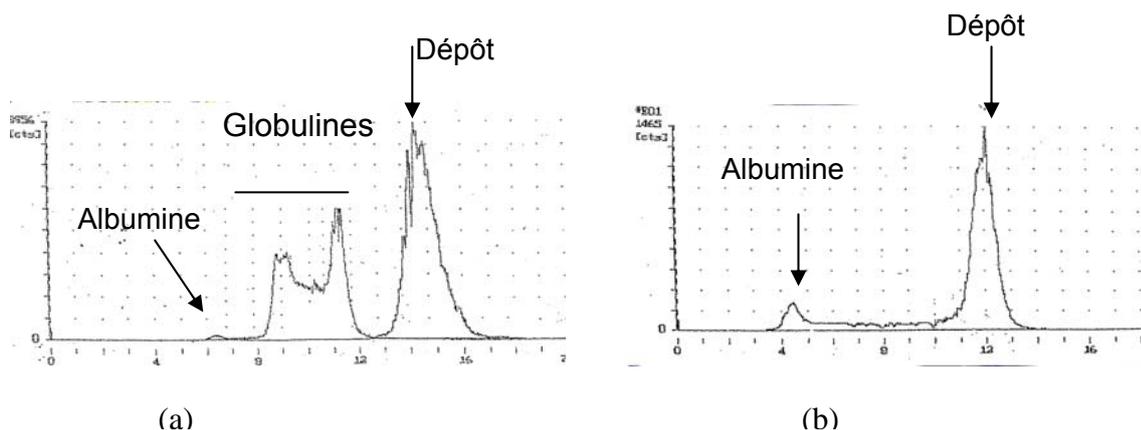


Figure 50 : Electrophorèse du peptide (a) : RAFT-RGD-^{99m}Tc et (b) RAFT-RAD-^{99m}Tc. Chromatogramme du gel d'agarose effectué par le détecteur Bertold®

I-1-5-Métabolisme *in-vitro*

Les peptides RGD ont été marqués avec une pureté supérieure à 95% et sont dilués dans le sang total humain et incubés à 37°C pendant 1, 4, 6 et 24 heures sous agitation, afin de reproduire au mieux les conditions *in vivo*. L'analyse CLHP est réalisée dans les conditions précédemment décrites.

- Après 1 heure d'incubation du peptide RAFT-RGD-^{99m}Tc dans le sang, on observe l'apparition de formes chimiques non résolues et non identifiées relativement proches du pic d'origine et augmentant dans le temps. Le taux de dégradation du peptide semble augmenter progressivement au cours du temps et on observe toujours 8-10 % de forme hydrophile du technétium (TcO_4^-) (figure51-a).
- Dans les mêmes conditions Le RAFT-RAD-^{99m}Tc est stable, aucune forme chimique différente de celle de départ n'est retrouvée dans le sérum. On note également la présence de TcO_4^- en faible quantité mais stable dans le temps (figure51-b).
- Dans les mêmes conditions le cRGD-^{99m}Tc présente une stabilité de plus de 90% après 6 heures d'incubation. Aucune décomplexation ou dégradation du peptide n'ont été observées (figure51-c).

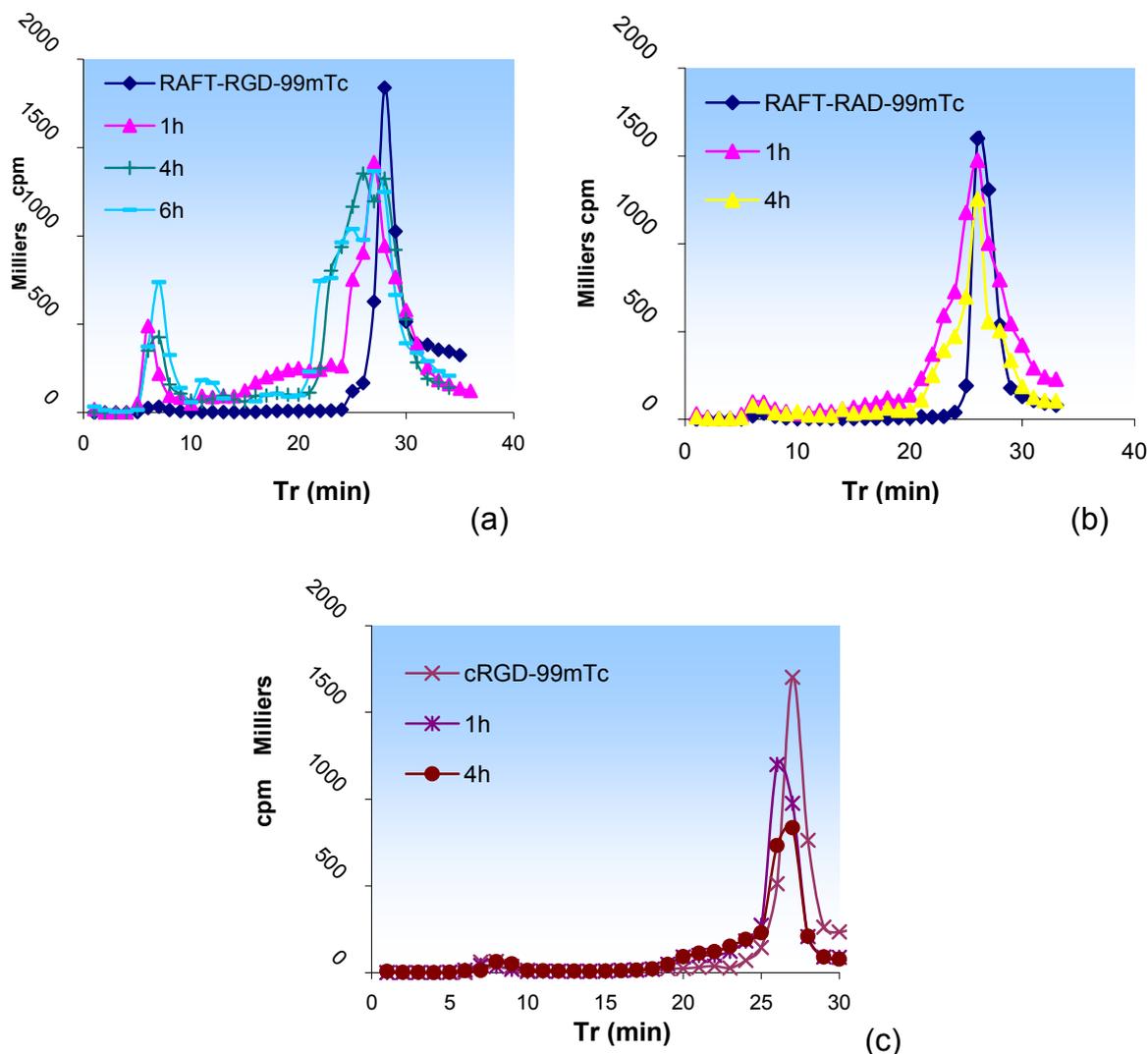


Figure 51 : Chromatogrammes CLHP après incubation du peptide ; RAFT-RGD- ^{99m}Tc (a), RAFT-RAD- ^{99m}Tc (b) et cRGD- ^{99m}Tc (c) en présence du sang humain total.

▪ Etude de trans-chélation du complexe RAFT-RGD- ^{99m}Tc

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 sera fonction de l'affinité relative du métal pour le synthon tricarbonyle ou pour les agents potentiellement concurrents. Dans cette démarche nous avons testé l'influence de la L- histidine et de la cystéine:

- Compétition en présence de L-Histidine :

En présence de 1 à 10 nmoles de L-histidine pour 1 nmole du complexe technétié, la décomplexation observée est faible. Mais la pureté radiochimique diminue avec l'augmentation de la quantité de L-histidine. A 100 nmoles, on observe un pic à 23 minutes à coté du pic du complexe (15% de l'activité totale). Ce pic correspond à un

nouveau complexe. On peut soupçonner la présence d'un complexe technétium - tricarbonyle –histidine indépendant du RAFT-RGD (Figure52-a).

Ceci pourrait expliquer la dégradation du peptide technétié en présence du sang.

- Compétition en présence de cystéine : dans les mêmes conditions que pour l'histidine après 1 heure d'incubation en présence de 100 nmoles de cystéine, on observe 10% de décomplexation avec apparition d'un pic à 22 minutes, correspondant à une trans-chélation entre peptide technétié (liaison histidine-technétium) et cystéine libre. Ceci peut correspondre à la cystéine technétié.

Après 2 heures d'incubation, il reste toujours plus de 75% du complexe d'origine (figure52-b).

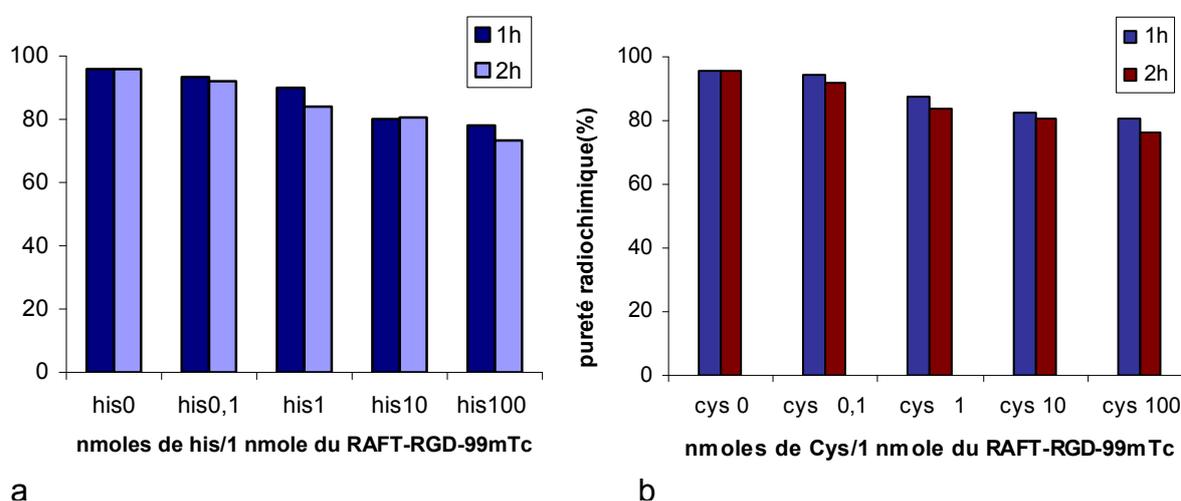


Figure 52 : Trans-chélation du RAFT-RGD-^{99m}Tc en présence de (a) histidine et (b) cystéine.

I-1-6-Métabolisme *in vivo*

Les expérimentations *in vivo* ont été réalisées chez la souris Balb/c, C57Bl/6 ou la souris nude, en conformité avec les lois sur l'expérimentation animale.

Biodistribution des dérivés RGD-^{99m}Tc

Les ligands technétiés ont été injectés à des souris porteuses de mélanome syngénique de type B16F0, un modèle tumoral très angiogénique exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Les ligands technétiés sont éliminés principalement par voie rénale mais également par voie hépatobiliaire. Leur clairance sanguine est lente. A une heure p.i., la

captation tumorale du cRGD-^{99m}Tc est proche de 1,6% DI/g, celle du RAFT-RGD-^{99m}Tc proche de 2,41 % soit un rapport de 1,5 en faveur du RAFT-RGD-^{99m}Tc ; cette différence de captation entre les deux ligands est significative ($p < 0,01$). De plus, le RAFT-RAD-^{99m}Tc est peu capté par les tumeurs, moins de 1% DI/g ; ces différences de captation sont significatives tant par rapport au RAFT-RGD-^{99m}Tc ($p < 0,001$) que par rapport au cRGD-^{99m}Tc ($p < 0,01$) (Sancey 2006).

Imagerie planaire des ligands RGD

L'imagerie planaire corps entier réalisée à l'aide des radioligands cRGD-^{99m}Tc, RAFT-RGD-^{99m}Tc et RAFT-RAD-^{99m}Tc est représentée en figure 53.

Avec les traceurs possédant le motif RGD, les tumeurs B16F0 $\alpha_v\beta_3$ -positives sont visibles une heure après injection ; avec le motif RAD, les tumeurs sont peu ou non visibles.

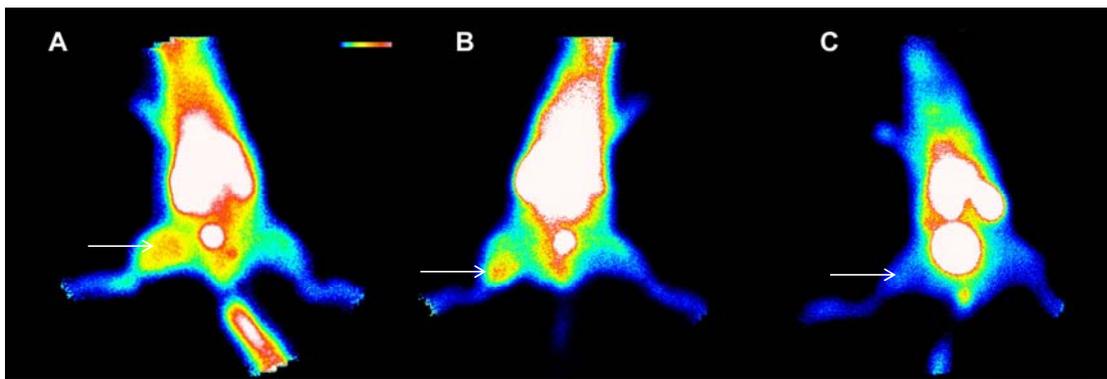


Figure 53 : Exemples d'imagerie planaire corps entier de souris greffées avec le mélanome B16F0, réalisés 1 heure après injection de (A) ^{99m}Tc-cRGD, (B) ^{99m}Tc-RAFT-RGD et (C) ^{99m}Tc-RAFT-RAD. Les tumeurs ont été greffées sur le membre inférieur situé à gauche de l'image (flèche).

Stabilité *in vivo* de RAFT-RGD-^{99m}Tc

- Analyses sanguines : l'analyse du sérum de la souris par CLHP, 1, 4 et 6 heures après administration de 37 MBq du complexe, montre une dégradation progressive indiquée par la présence de technétium-99m non lié au peptide (temps de rétention 7 minutes), ainsi que d'un large pic autour de 28 minutes représentant un mélange de peptide technétié et de plusieurs produits dégradés dont un à 21 minutes et l'autre à 25 minutes (figure 54, a).
- Analyses urinaires : l'analyse de l'urine 1 et 4 heures après injection montre la présence du peptide technétié sous forme non métabolisée (temps de rétention à 28

minutes) et de plusieurs molécules technétiées dont une molécule avec un temps de rétention de 21 minutes (n=5), et une autre avec un temps de rétention de 24 minutes (n=5). Chez toutes les souris analysées le peptide marqué sous forme non métabolisée représente 50% à 1 heure et 30% à 4 heures. L'activité du pic de 7 minutes correspond à du TcO_4^- et ne dépasse pas 5 à 10 % de l'activité totale de l'échantillon dans toutes les analyses (figure 54, b).

- Analyse du foie et des reins : l'analyse chromatographique du foie et des reins confirme la présence de plusieurs molécules technétiées avec les temps de rétention habituels de 21, 24 et 28 minutes, dont les proportions évoluent au cours du temps : existence de 50 % de traceur non dégradé à 1 heure et moins de 30% à 4 heures (figure 54, c et d).

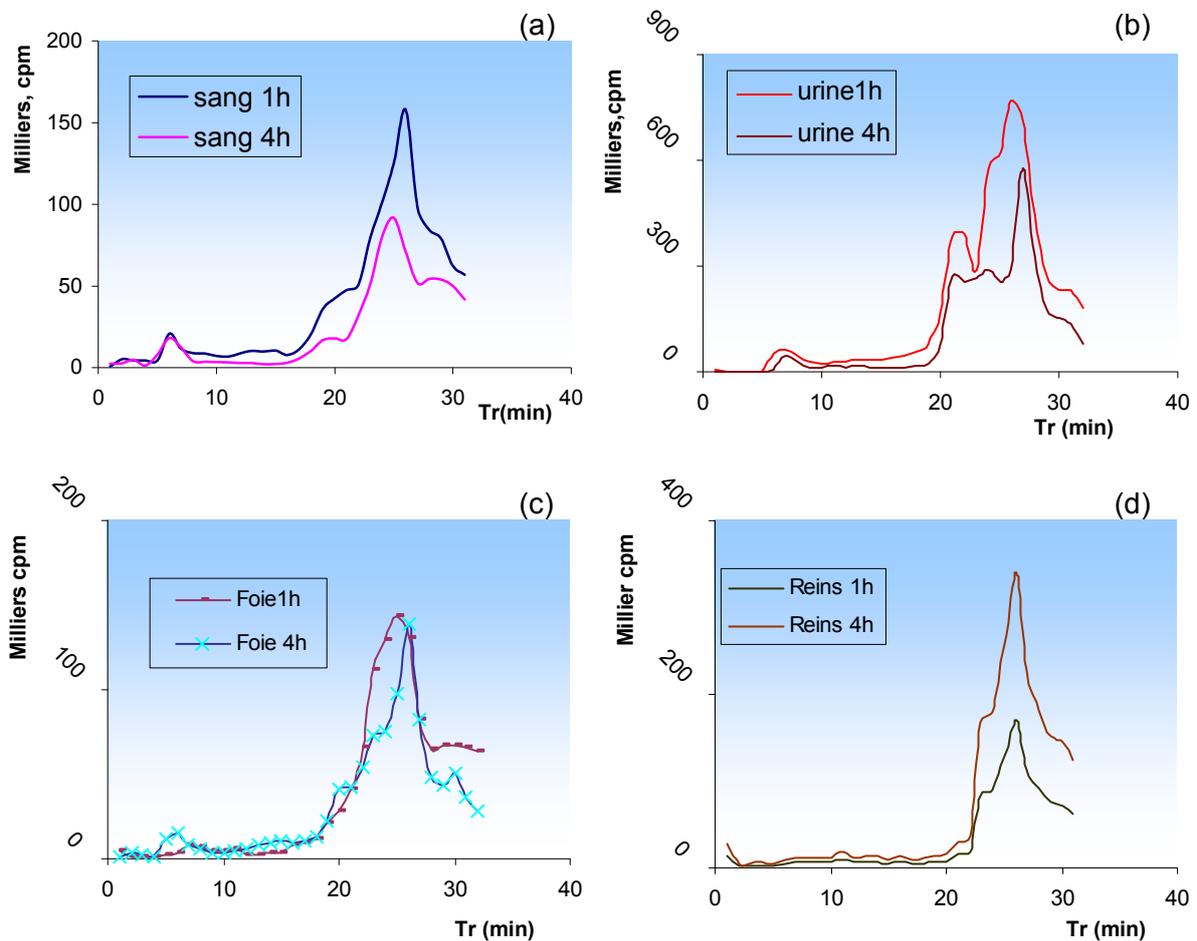


Figure 54 : Stabilité du peptide RAFT-RGD-^{99m}Tc, 1 et 4 heures après injection chez la souris : (a) dans le sang, (b) dans l'urine, (c) dans le foie et (d) dans les reins.

Stabilité *in vivo* de RAFT-RAD-^{99m}Tc

Analyses sanguines : L'analyse CLHP des échantillons de sérums prélevés 1 et 4 heures après l'administration du peptide marqué chez la souris détecte essentiellement le peptide technétié sous sa forme initiale. Le technétium libre est en faible proportion (figure 55, a). Dans le sang, la concentration de RAFT-RAD-^{99m}Tc décroît beaucoup plus rapidement que celle du RAFT-RGD-^{99m}Tc.

- Analyses urinaires : 1 et 4 heures après injection, on ne retrouve que le RAFT-RAD-^{99m}Tc dans les urines. Comme dans le sang, on note une faible activité du technétium libre par la présence d'un pic de chromatogramme à 7 minutes (figure 55, b).
- Analyse du foie et des reins : A 1 heure et 4 heures après injection, le traceur est majoritairement présent dans le foie et les reins sous forme non métabolisée (plus de 80% de l'activité chez 4 souris) (figure 55 c et d).

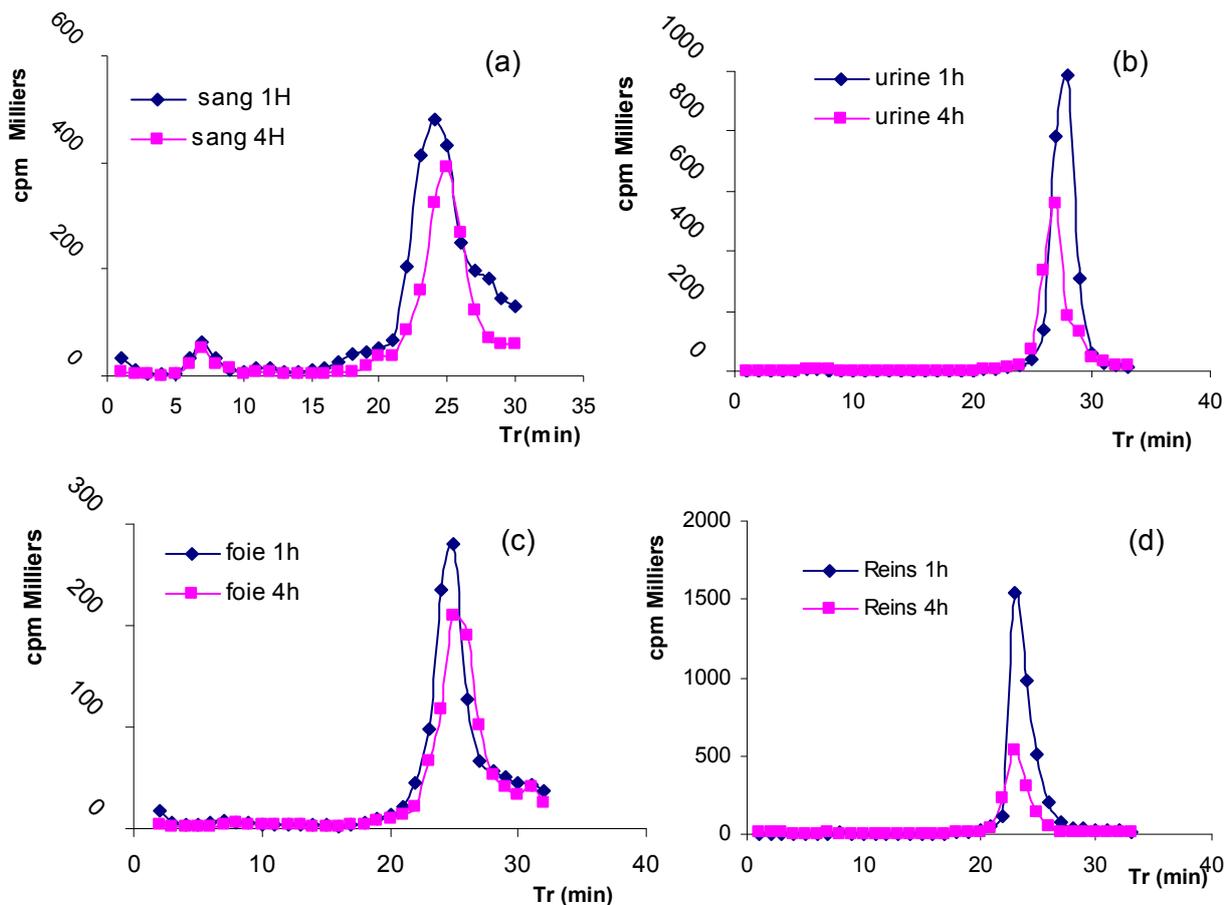


Figure 55 : Stabilité du peptide RAFT-RAD-^{99m}Tc, 1 et 4 heures après injection chez la souris : (a) dans le sang, (b) dans l'urine, (c) dans le foie et (d) dans les reins.

Stabilité *in vivo* de cRGD-^{99m}Tc

L'analyse CLHP du cRGD-^{99m}Tc montre la présence de plus de 70% de ce composé (temps de rétention : 26 minutes) dans les échantillons du sang (n= 3), du foie (n=2), des reins (n=2), et dans l'urine (n=4), à 1 et 4 heures après administration aux souris. Dans tous les échantillons 5-10 % de TcO₄⁻ sont détectés.

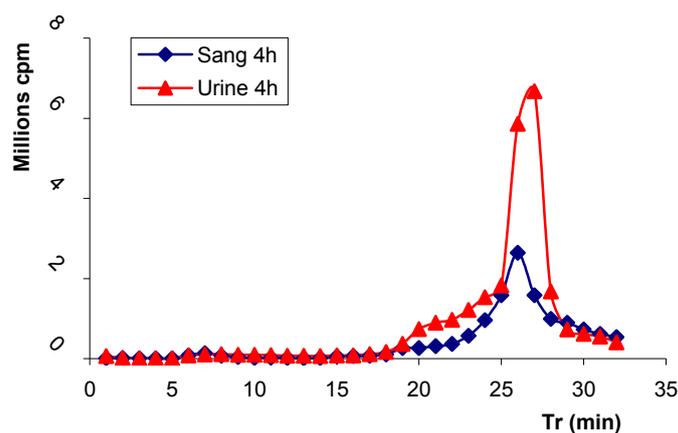


Figure 56 : Stabilité sanguine du peptide cRGD-^{99m}Tc, 4 heures après injection chez la souris.

I-2- Marquage à l'indium-111

Le marquage est effectué à partir de peptide RAFT-RGD-DOTA. Le groupement DOTA est fixé sur l'acide aminé lysine du gabarit RAFT afin de permettre l'introduction d'un ion ¹¹¹In³⁺.

I-2-1- Définition des paramètres de marquage de RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In

Le marquage est faisable à partir de 35 µg du peptide en présence de 1.85 MBq d'indium-111 avec une pureté radiochimique plus de 95%.

Condition d'analyses :

CCM :

Les conditions testées ont été présentées dans le tableau 7 :

Phase stationnaire	Solvant	Valeur R _f		
		RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In	¹¹¹ In ³⁺	¹¹¹ In-DOTA
papier	H ₂ O	0	0	0
	Méthanol	0 - 0.1	0 - 0.1	0.1 - 0.2
	Citrate sodium, pH = 2	0	0 - 0.3	
	NH ₄ Ac (10%) : Méthanol (80:20), pH = 4	0	0.1 - 0.2	0.5 - 0.6
ITLC	H ₂ O	0	0	0
	Méthanol	0	0.1	0.2 - 0.3
	Citrate sodium, pH = 2	0.1 - 0.2	0.7 - 0.8	
	NH ₄ Ac (10%) : Méthanol (80:20), pH = 4	0	0.9 - 1	0.7 - 0.8

Tableau 7 : Conditions d'analyses CCM du peptide RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In, ¹¹¹In³⁺ et DOTA-¹¹¹In.

Les dernières conditions ont été retenues.

CLHP :

L'analyse par CLHP montre que l'indium-111 libre a un temps de rétention de 5-7 minutes tandis que le peptide RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In sort de la colonne à 25 minutes (figure 57).

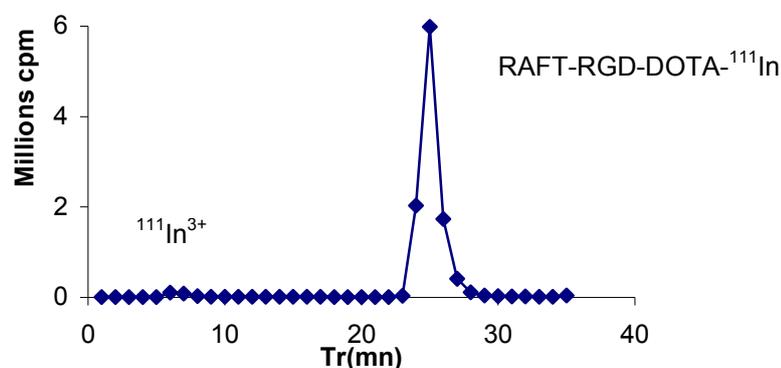


Figure 57 : Chromatogramme CLHP du RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In

Influence de la température

Le peptide RAFT-RGD-DOTA est stable à la chaleur jusqu'à 80°C, on peut donc étudier le marquage à 60°C et 80°C. L'analyse CCM montre une meilleure pureté radiochimique pour une incubation à 60°C pendant 30 minutes ou à 80°C pendant 20 minutes (figure 58). Nous avons choisi la dernière condition.

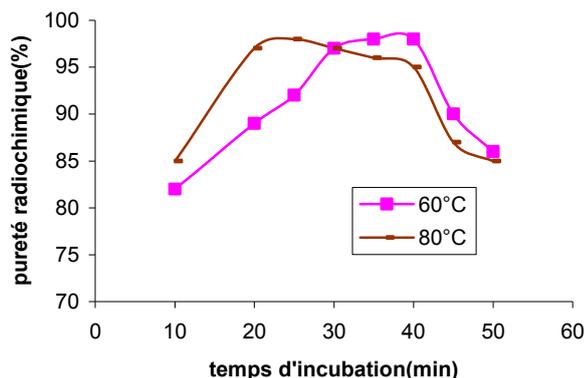


Figure 58 : Influence de la température et de la durée d'incubation sur la pureté radiochimique du RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In

Influence du solvant

L'étude de l'influence du solvant sur le marquage montre une pureté radiochimique supérieure à 95%, en utilisant le solvant acétate ammonium 0.1 M à pH5 (figure 59). Le NaCl 0.9% (à pH neutre) ne peut pas augmenter la pureté du marquage au-delà de 80% mais en ajoutant de l'acide chlorhydrique afin de diminuer le pH jusqu'à 5, le rendement de marquage augmente pour atteindre 90%.

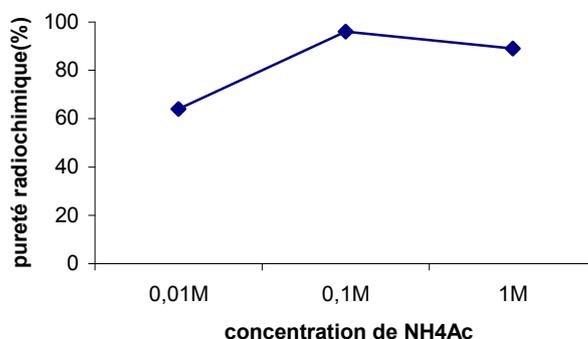


Figure 59 : Influence du solvant sur la pureté radiochimique du marquage du RAFT-RGD-DOTA à l'indium-111

I-2-2- Evaluations physico-chimiques et biologiques de RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In

Stabilité du marquage

La stabilité du marquage a été mesurée pendant 48 heures.

- L'analyse CLHP à 6, 24 et 48 heures après le marquage ne montre pas la présence d'indium-111 libre ni d'autre produit de dégradation.

- Lorsque le complexe est incubé dans du sérum physiologique à température ambiante, les analyses CLHP entre 1 heure et 48 heures montrent une stabilité de plus de 90%.

Stabilité du marquage dans le sang humain (*in vitro*)

Le RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In est incubé dans le sang humain pendant 24 heures à 37°C. L'analyse CLHP d'aliquotes à 0.5, 1, 2, 4, 6 et 24 heures ne montre aucune dégradation ou décomplexation au cours du temps. La pureté radiochimique du peptide marqué au départ est supérieure à 95% (n=3), on observe la même pureté après incubation dans les conditions précisées (figure 60).

Temps d'incubation (h)	0.5	1	2	4	6	24
Indium-111 libre (%)	0.4	1.6	1.6	1.9	2.1	2.5
RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In (%)	98.3	96.8	96.9	96.7	96.1	95.6

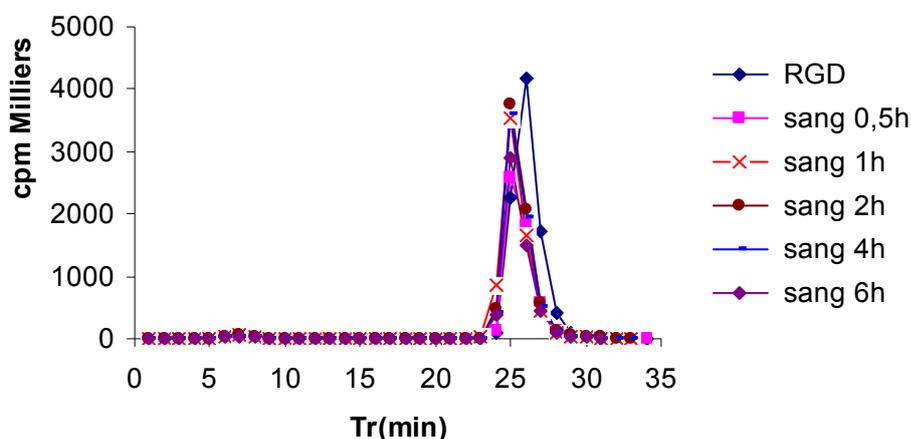


Figure 60 : Incubation du RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In en présence de sang humain total. La pureté radiochimique du complexe après incubation (a), chromatogramme CLHP (b).

Coefficient de partage

La valeur de Log ([Oct]/[H₂O]) pour ce peptide marqué à l'indium-111 est de -0.89. En comparaison pour le même peptide technétié, on observe une lipophilie presque identique.

Traceur	RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In
LogP	-0.89
[Oct]/[H ₂ O](KBq)	12.8/100

Tableau 8 : Coefficient de partage du RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In à pH 7.4.

Détermination de la fixation sur les cellules sanguines et les protéines plasmatiques

- On observe 10-15% de fixation sur les cellules sanguines, restant stable au cours du temps.
- L'étude par électrophorèse ne montre aucune fixation sur les protéines plasmatiques : La position du produit seul et la position du produit incubé dans le sérum sont identiques et ne correspondent à aucune migration des protéines plasmatique (figure 61) :

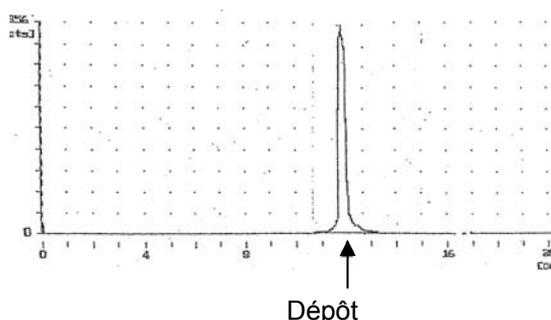


Figure 61 : Electrophorèse du peptide RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In. Chromatogramme du gel d'agarose effectué par le détecteur Bertold®.

I-2-3- Evaluation du métabolisme *in vivo*

- Biodistribution de RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe. Le peptide marqué à l'indium est principalement éliminé par voie rénale. La clairance sanguine est très rapide et la captation hépatique est très faible ce qui est peu surprenant compte tenu de son coefficient de partage. Hormis les reins, l'ensemble des organes et notamment le muscle capte peu le traceur. Ces caractères sont très favorable à l'obtention de bons rapports tumeur/ bruit de fond en imagerie mais la captation rénale reste très importante à 48 h puisqu'elle est supérieure à 30% DI/g. (figure 62).

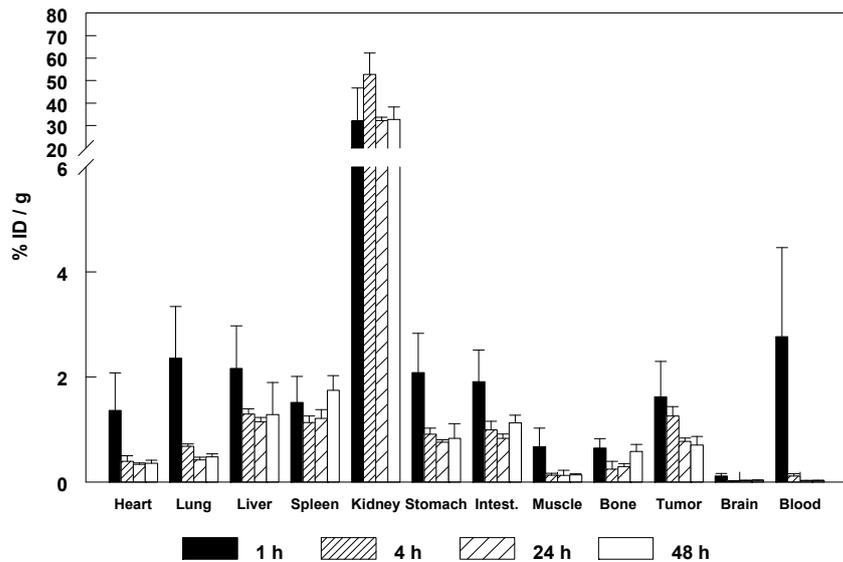


Figure 62 : Biodistribution du RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In chez la souris Balb/c greffée avec le carcinoma TS/A-pc.

- Images scintigraphiques

Les acquisitions ont été effectuées grâce à une caméra planaire dédiée à l'homme car celle dédiée au petit animal ne possède pas de collimateur nécessaire à l'imagerie à l'indium.

Les tumeurs greffées sur la patte gauche sont visibles sur tous les animaux, dès les premières secondes d'acquisition et aussi bien à 30 minutes qu'à 2 h post injection. On observe l'accumulation rapide du traceur dans les reins et la vessie.

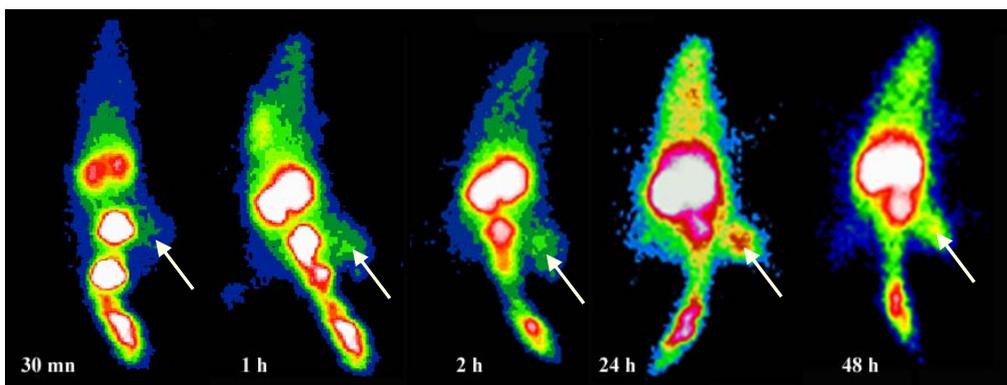


Figure 63 : Exemple d'imagerie planaire du RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In obtenue avec gamma caméra humaine.

I-2-4-Evaluation pharmacologique du peptide marqué

Stabilité sanguine du complexe injecté :

Au niveau sanguin, la concentration du complexe décroît très rapidement, ce qui rend les analyses CLHP impossibles du fait de la trop faible radioactivité.

Analyse dans l'urine et dans le foie : L'analyse CLHP de l'urine et du foie à 2, 4 et 24 heures après administration du traceur, ne montre que le complexe et moins de 10% d'indium-111 libre (tableau 9).

Organes ou liquides biologique	Composés	Temps (heures)		
		2 (n = 3)	4 (n = 3)	24 (n =1 ou 2)
Sang		Non détectable		
Urine	A	92.4 ± 0.6	92.8 ± 0.8	90.2 ± 0.1
	B	6.9 ± 0.9	6.5 ± 1.2	8.6 ± 0.5
Foie	A	89.3 ± 1.0	85.4 ± 0.5	83.9
	B	9.9 ± 0.3	11.2 ± 0.7	13.0
Reins	A	87.5 ± 0.5	54.3 ± 0.04	55.2
	B	6.1 ± 0.1	25.1 ± 0.2	24.0
	C	4.4 ± 0.2	11.1 ± 0.2	5.8

Tableau 9 : Etude de la stabilité de RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In dans les organes d'élimination et les liquides biologiques. Les résultats sont exprimés en : % ¹¹¹In³⁺ (A), % RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In (B) et % produit inconnu : Tr=9 minutes (C).

Analyse des reins : l'analyse chromatographique des échantillons rénaux prélevés à 2 heures et 24 heures après l'administration du peptide marqué chez la souris détecte essentiellement le traceur marqué à l'indium-111 sous sa forme initiale dont le pourcentage diminue jusqu'à 55% à 24 h (tableau 9). On note une faible présence d'indium libre qui augmente au cours du temps, ainsi que la présence d'une troisième espèce chimique dont le temps de rétention (9 minutes) correspond à un produit inconnu plus hydrophile que le complexe initial, dont la proportion augmente dans le temps et qui n'est détecté dans aucun autre organe ou liquide physiologique analysé. (figure 64)

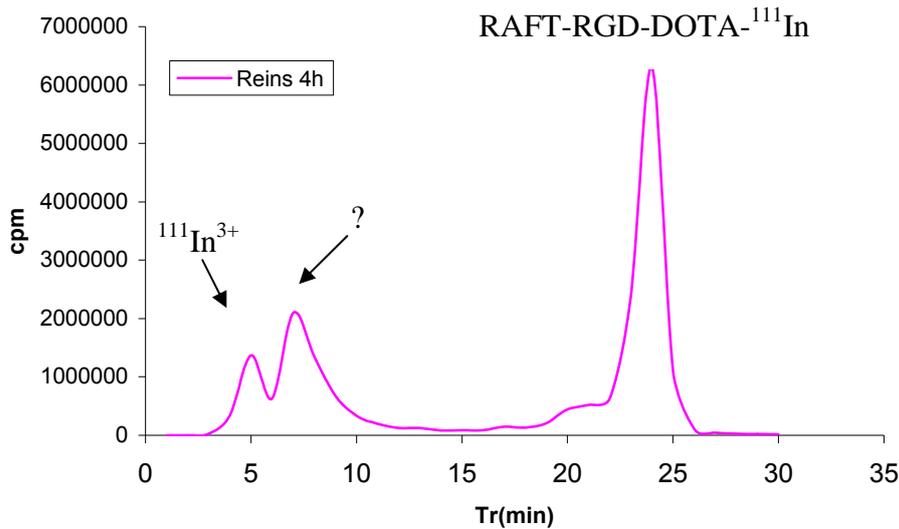


Figure 64 : Analyse CLHP des reins et détection de produit radioactif inconnu.

Afin d'identifier ce produit inconnu, nous avons fait l'hypothèse qu'il pourrait représenter le complexe de DOTA à l'indium-111, se séparant du peptide lui-même.

I-2-5-Determination du produit inconnu détecté dans les reins

Préparation de DOTA-¹¹¹In

Le marquage est réalisé dans les mêmes conditions que le marquage du RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In. Le rendement de marquage de DOTA-¹¹¹In est déterminé par CLHP (pureté radiochimique supérieure à 97%), la comparaison de son temps de rétention avec celui du produit inconnu montre qu'ils sont identiques (figure 65).

Pour confirmer cette hypothèse, la mesure de la lipophilie et la charge électrique de DOTA-¹¹¹In est effectuée.

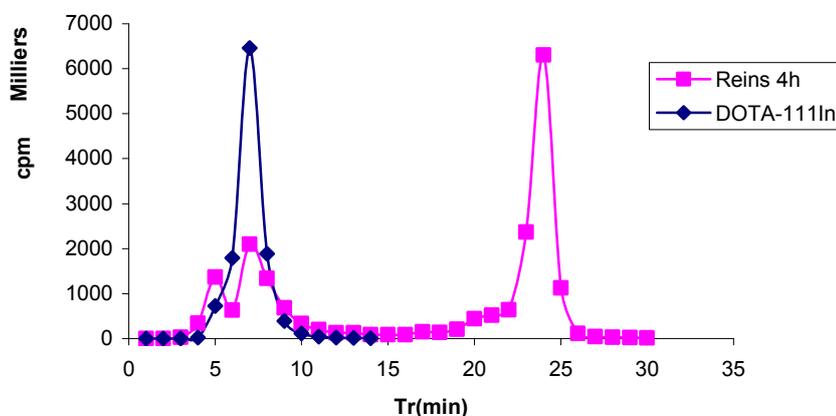


Figure 65 : Comparaison de chromatogramme de l'activité retrouvée dans les reins et celle du DOTA-¹¹¹In

Lipophilicité de DOTA-¹¹¹In

La valeurs de Log ([Oct]/[H₂O]) est de -0.5 comparée au -0.89 du RAFT-RGD-¹¹¹In.

Traceur	DOTA-¹¹¹In
Log P	-0.5
[Oct]/[H₂O](KBq)	31.2/100

Tableau 10 : La valeur de Log P du DOTA-¹¹¹In

Détermination de la charge électrique

Nous avons utilisé les résines échangeuses d'anions et de cations. Les résultats montrent une charge positive pour DOTA-¹¹¹In. Aucune charge n'est identifiée pour le peptide RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In. Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

	Résine anionique		Résine cationique	
	Résine (%)	Filtrat (%)	Résine (%)	Filtrat (%)
DOTA-¹¹¹In	7	93	63	37
RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In	10	90	17	83

Tableau 11 : Détermination de la charge électrique du complexe DOTA-¹¹¹In.

Conclusion :

Le marquage du RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In est effectué avec un bon rendement et une pureté radiochimique supérieure à 95%. La cinétique de complexation est rapide et reproductible. Un seul composé est observé. Le marquage est stable pendant 24 heures en milieu de marquage et en présence du sang humain total.

La clairance sanguine du RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In est très rapide. Deux heures après l'injection du traceur, l'activité sanguine est trop faible pour être analysée par CLHP. La fixation du complexe sur les protéines plasmatiques est très faible. Le seul problème important est la captation rénale. Afin d'identifier le fragment capté, nous avons comparé le pic CLHP de ce fragment avec celui du DOTA-¹¹¹In et montré que cette captation correspondait à celle de DOTA-¹¹¹In.

II-Evaluation du Peptide HARP111- 124 ; marqueur de l'angiogénèse

II-1-Marquage à l'Iode-125

Préparation du traceur iodé :

37 MBq (1 mCi) de iode-125 sont dilués dans 100 µl de PBS et mis en contact avec l'iodobeads[®]. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 20 µg du peptide HARP111- 124 sont ajoutés et incubés dans les mêmes conditions pendant 15 minutes. La pureté radiochimique du peptide marqué est inférieure à 90% (70-75%), ce qui nécessite de le purifier.

Différentes méthodes de séparation ont été testées : chromatographie d'exclusion sur Colonne Sephadex[®] G5, chromatographie d'échange d'ions et chromatographie de partage sur colonne Sep-Pak C18.

- La chromatographie d'exclusion sur Colonne Sephadex[®] G5 permet d'éluer le peptide HARP111- 124 avec un pourcentage de récupération de 70%. Le solvant d'élution est une solution de chlorure sodium 0.9%. Deux pics de radioactivité sont observés. L'analyse de ces pics par CCM a mis en évidence l'iode libre (les molécules restent au point de dépôt). Donc, cette méthode ne pourrait pas séparer le peptide iodé de l'iode libre.

- La chromatographie par échange d'ion permet d'éliminer l'iode libre, le pourcentage de récupération du peptide marqué est plus faible qu'avec la méthode de séparation sur colonne Sephadex[®] G5.

- Chromatographie de partage sur colonne Sep-Pak C18 : par cette méthode, l'iode libre est éliminé par élution de la colonne avec 1 ml d'eau et le peptide marqué est récupéré par passage d'une solution d'éthanol (50%) dans un volume de 1,5 ml par fractions de 0,5 ml. Le pourcentage de récupération de peptide marqué est 80%. Après purification, la pureté radiochimique est de plus de 95%.

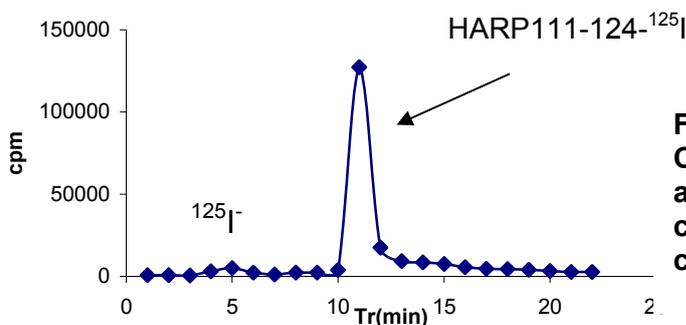


Figure 66 : Chromatogramme CLHP du peptide HARP111-124-¹²⁵I après purification par chromatographie de partage sur colonne Sep-Pak C18.

II-2-Evaluations physico-chimiques et biologiques du HARP111-124-¹²⁵I

Etude de Stabilité *in vitro*

- La pureté radiochimique de HARP111-124-¹²⁵I utilisé pour cet exercice est >95%. Cette valeur reste >90% 1 heure après le marquage, et >85% 3 et 6 heures après le marquage. HARP111-124-¹²⁵I est donc stable sur une période de 6 heures au moins.

- Après 1, 3, et 6 heures d'incubation en présence de sang humain total, la pureté radiochimique du traceur est respectivement de 90%, 80%, et 70% environ. Cette diminution s'explique par la présence d'iode-125 libre. Le traceur ne subit pas de modifications autres que cette déiodation.

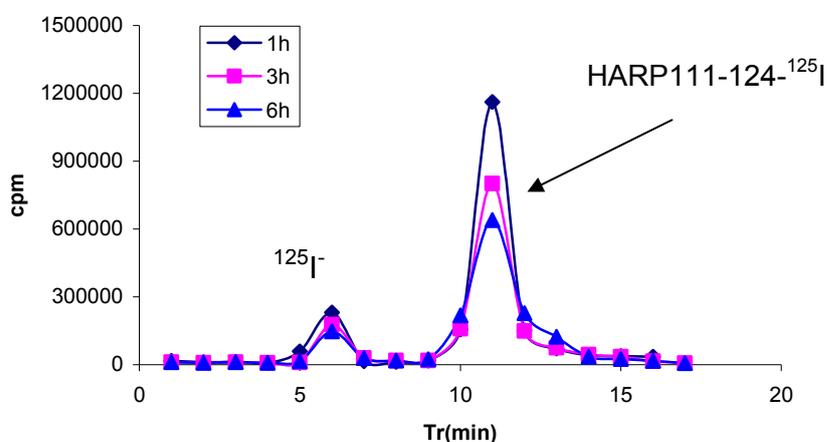


Figure 67 : Analyse CLHP du peptide HARP111-124-¹²⁵I, à 1,3 et 6 heures après incubation en présence du sang humain total à 37°C.

Fixation sur les globules sanguins et les protéines plasmatiques :

La proportion de traceur fixé sur les globules sanguins et les protéines plasmatiques est de l'ordre 10% et 10-15%, respectivement. 75% du traceur est donc sous forme libre dans le sang.

II-3-Etude de biodistribution, imagerie et stabilité *in vivo*

Etude de Biodistribution

La biodistribution du traceur déterminée post-mortem par prélèvement d'organes 30 min ou 6 heures après l'injection intraveineuse du traceur est indiquée dans la figure 68.

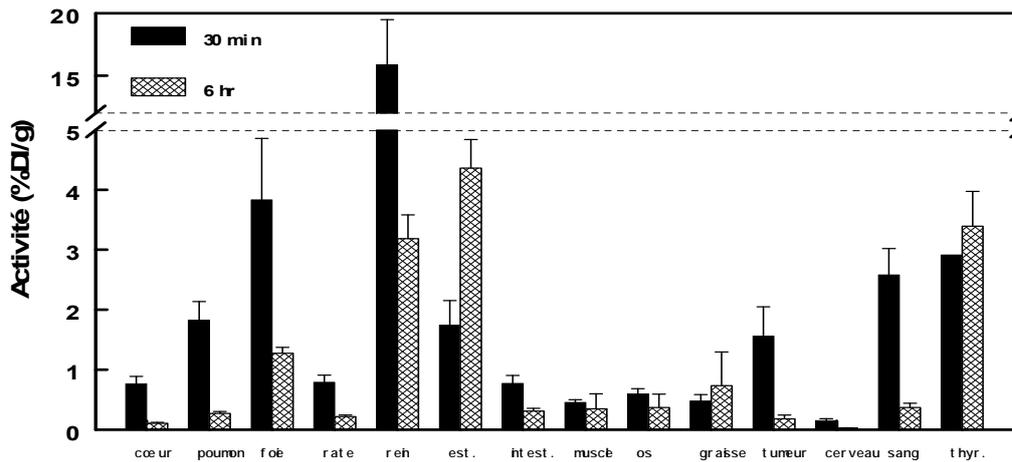


Figure 68 : Biodistribution de HARP111-124-¹²⁵I à 30 min et 6 heures après injection du traceur.

Les résultats indiquent une élimination rénale importante et rapide avec ~15% DI/g dès la 30^{ème} minute suivant l'injection, et une élimination hépatique de moindre importance mais également rapide. L'activité tumorale représente 1.6 ± 0.5 %DI/g 30 minutes après l'injection. Cette valeur diminue au cours du temps pour atteindre 0.18 ± 0.07 %DI/g 6 heures après l'injection.

Imagerie scintigraphique

Des images représentatives de la répartition du traceur évaluée par imagerie scintigraphique 30 min, 1 h, 3 h, et 6 heures après l'injection sont présentées dans la figure 69 ci-dessous. Les reins, la vessie, le foie, la thyroïde, et les muscles des membres postérieurs sont visibles sur ces images. La tumeur n'a pu être identifiée malgré une activité précoce en traceur relativement élevée, probablement en raison de leur petite taille.

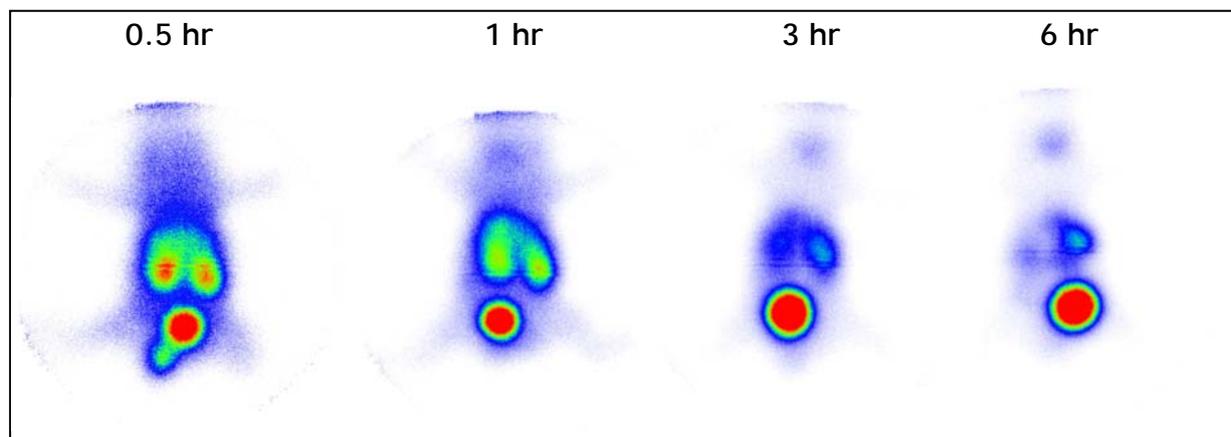


Figure 69 : Images scintigraphique représentatives de la répartition de HARP111-124-¹²⁵I, 30 min, 1 heure, 3 heures, et 6 heures après injection.

La quantification des images scintigraphique réalisées *in vivo* indiquent une très faible activité musculaire. L'activité thyroïdienne, constituée d'iode-125 libre, est stable au cours du temps. L'activité hépatique décroît lentement et est inférieure à l'activité rénale.

Etude de stabilité *in vivo* du traceur chez la souris

Analyse sanguine : l'activité en traceur dans l'échantillon de sang prélevé aux souris 30 min et 6 heures après injection est trop faible pour permettre l'analyse de la pureté radiochimique de la molécule par CLHP.

Analyse urinaire : L'analyse de la pureté radiochimique du traceur retrouvé dans les urines 30 min et 6 heures après l'injection indique que 90% et 75% de la radioactivité correspond à HARP111-124-¹²⁵I, respectivement (figure 70). De façon similaire aux résultats observés après incubation en présence de sang total humain, l'activité restante correspond à de l'iode-125 libre et le peptide modifié n'est pas observé.

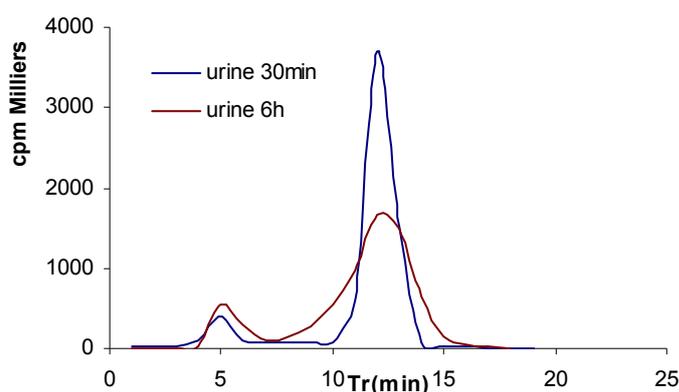


Figure 70 : Analyse urinaire du peptide HARP111-124-¹²⁵I

III- Marqueurs de la plaque d'athérome

III-1- Radiomarquage de B2702 et de ses dix dérivés peptidiques au technétium-99m

11 peptides ont été marqués : B2702 et ses dix dérivés, PB1 à PB10. Afin de réaliser un marquage au technétium-99m à l'aide d'un synthon bifonctionnel tricarbonyle, une histidine a été fixée à l'extrémité N- terminal de chaque peptide.

- **Préparation de B2702 technétié**

En premier lieu, nous avons marqué 50 µg de B2702 avec 550 MBq de l'intermédiaire technétié et incubé à 50°C et 80°C pendant 30 minutes. Toutes les 10 minutes une goutte de préparation est analysée par CCM en condition décrite. Lorsque le mélange réactionnel est maintenu à 50°C, les résultats de CCM montrent que la pureté radiochimique croit de 70% après 20 minutes d'incubation à 95% à 40 minutes d'incubation. L'analyse CLHP après 20 minutes montre la présence d'un pic large à 28 minutes, la même analyse après 40 minutes présente un pic à 28 minutes qui indique que la réaction est complète. A 80°C, la réaction est complète après 20 minutes d'incubation avec une pureté radiochimique supérieure à 95%.

L'analyse CLHP démontre l'absence de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et sa diminution progressive au cours du temps. Aucun produit de dégradation n'est observé.

Activité spécifique de B2702

Par l'exercice précédent, nous avons mis au point un marquage de bon rendement. Mais afin d'augmenter la qualité d'imagerie et de diminuer le dose injectée aux animaux, l'étude de l'augmentation de l'activité spécifique est réalisée : 50 µg du peptide est incubé avec 1110 MBq (30 mCi), 1500 MBq (~40 mCi) et 1850 MBq (50 mCi) de l'intermédiaire technétié. Après incubation à 80°C pendant 20 minutes, l'analyse CLHP montre les résultats indiqués dans le tableau 12.

50µg de B2702 en présence de complexe technétié:	1110MBq (30mCi)	1500MBq (~40mCi)	1850 MBq (50 mCi)
La pureté radiochimique (%) déterminé par CLHP	92	90	79
Activité spécifique	33 GBq/µmol	45 GBq/µmol	55 GBq/µmol

Tableau 12 : Etude de l'activité spécifique de 50 µg du B2702 en présence de différentes activités de l'intermédiaire technétié.

D'après ces résultats l'activité spécifique la plus élevée obtenue dans des conditions de marquage correctes est de 45 GBq/µmol.

- **Radiomarquage des dix dérivés de B2702 au technétium-99m**

50 µg de chaque peptide sont incubés avec 1100 MBq de l'intermédiaire technétié à 80°C pendant 20 minutes. La pureté radiochimique atteinte est présentée dans le tableau 13.

Peptide	Pureté radiochimique mesuré par CLHP (%)	Temps de rétention (min)
PB1	>92	21
PB2	>95	23
PB3	>97	23
PB4	>95	22
PB5	<50	6, 19, 23 et 27
PB6	>93	21
PB7	>95	23
PB8	~80	21
PB9	>95	24
PB10	>95	21

Tableau 13 : Pureté radiochimique des dix dérivés B2702, déterminée par CLHP.

Les expériences réalisées avec les dix dérivés de B2702 ont montré que le radiomarquage peut être réalisé avec la méthode de l'intermédiaire tricarbonyle avec une activité spécifique de 33 GBq/µmol pour une pureté radiochimique supérieure à 90%.

- Afin d'améliorer le marquage du PB5, nous avons choisi de marquer 100 µg du peptide par 1500 MBq de solution tricarbonyle technétié. La préparation est incubée à 80°C pendant 30 minutes ou 60°C pendant 20 minutes. L'analyse CLHP du complexe présente un pic de TcO_4^- à 6 minutes et 3 autres pics à 20, 23 et 27 minutes. Ceci indique que des variations de la durée et de la température d'incubation ainsi que de l'activité spécifique ne modifient pas la pureté radiochimique obtenue pour le peptide PB5. La pureté chimique du peptide et la présence de l'histidine à l'extrémité N- terminale doivent donc être vérifiées.

Mesure de la stabilité :

La complexation de chaque échantillon est réalisée dans une solution de NaCl 0,9% (éluat et solvant de dilution).

- Les complexes technétiés du peptide B2702 et/ou de ses dérivés (sauf PB5 dont le marquage n'est pas faisable) peuvent être conservés pendant 3 heures à température ambiante sans que leur pureté radiochimique ne soit modifiée. Après 6 heures d'incubation, la pureté radiochimique est toujours supérieure à 90%. les produits sont toujours injectables.

- L'analyse CLHP du complexe technétié de B2702, PB3, PB4, PB7, PB9 et PB10, après 24 heures de conservation à 4°C, montre une stabilité plus de 90%, tandis que la même analyse pour PB1, PB2, PB6 et PB8 montre le peptide marqué majoritairement (70%), le pertechnétate (10%), et un métabolite.

Mesure du coefficient de partage :

La molécule B2702-^{99m}Tc est hydrophile avec un log P= -1.5 à pH physiologique. Le coefficient de partage des dérivés technétiés est presque identique (tableau 14).

Peptide	Log P	peptide	Log P
B2702- ^{99m} Tc	-1.5	PB6- ^{99m} Tc	-1.6
PB1- ^{99m} Tc	-1.2	PB7- ^{99m} Tc	-1.8
PB2- ^{99m} Tc	-1.3	PB8- ^{99m} Tc	-1.2
PB3- ^{99m} Tc	-1.7	PB9- ^{99m} Tc	-1.02
PB4- ^{99m} Tc	-1.1	PB10- ^{99m} Tc	-0.9

Tableau 14 : Log P pour le complexe B2702-^{99m}Tc et ses dérivés

Mesure de la fixation aux cellules sanguines et aux protéines plasmatiques :

- B2702-^{99m}Tc est incubé en présence de sang total humain sous agitation à 37°C pendant un temps déterminé. L'analyse d'un échantillon prélevé après 1 heure montre une fixation cellulaire de 15% augmentant progressivement au cours du temps pour atteindre 18% à 3 heures.

La fixation aux protéines plasmatiques est étudiée par électrophorèse sur hydragel K20. Après 1 heure d'incubation du peptide technétié dans du sang humain total, les

résultats montrent 5% de fixation sur l'albumine et 65% sur les globulines. 30% du peptide reste libre dans le sérum (figure71).

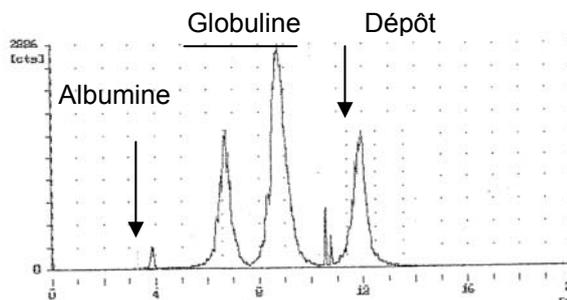


Figure 71 : Détermination de la fixation protéique du peptide B2702-^{99m}Tc par électrophorèse.

La fixation des dérivés aux protéines plasmatiques est mesurée par précipitation des protéines sériques et confirmée par filtration. Le tableau 15 présente ces valeurs.

peptide	Déterminé par précipitation	Déterminé par filtration
PB1- ^{99m} Tc	57±4%	59±4%
PB2- ^{99m} Tc	60±6%	61±3%
PB3- ^{99m} Tc	67±3%	69±1%
PB4- ^{99m} Tc	61±2%	66±3%
PB6- ^{99m} Tc	53±2%	57±5%
PB7- ^{99m} Tc	57±3%	59±4%
PB8- ^{99m} Tc	59±5%	61±1%
PB9- ^{99m} Tc	71±3%	73±2%
PB10- ^{99m} Tc	62±4%	71±2%

Tableau 15 : Fixation des dérivés de B2702 aux protéines plasmatiques, mesurée par précipitation des protéines sanguines par TCA10% et confirmée par filtration à l'aide de Nanosep®.

Les résultats montrent une fixation comprise entre 53% et 71% par la méthode de précipitation et 57% à 73% par filtration. Le filtrage des peptides froids indique que 5-6% de chaque peptide reste fixé sur le filtre Nanosep®, expliquant ainsi les valeurs plus élevées que celles observées par la filtration.

Mesure de la stabilité sanguine de B2702-^{99m}Tc, *in vitro*

L'analyse CLHP après incubation de B2702-^{99m}Tc dans le sang humain total est présentée dans la figure 72.

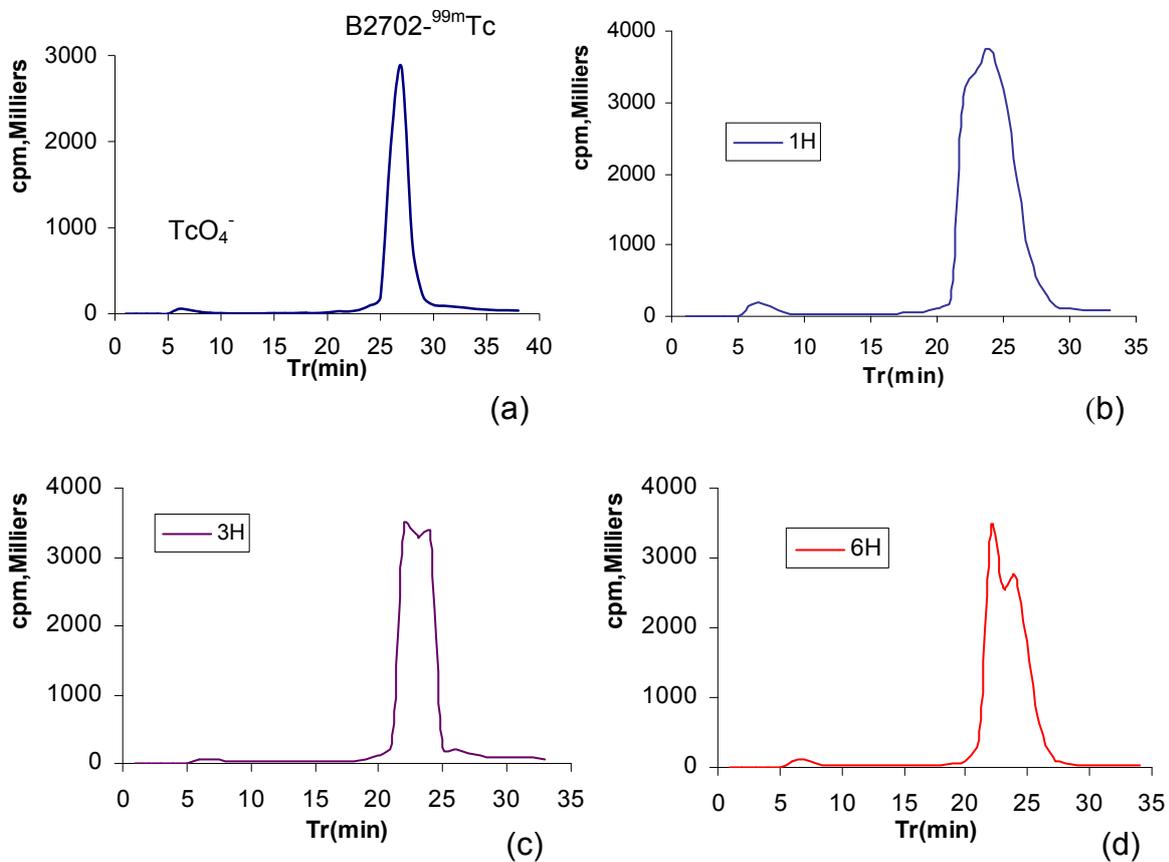


Figure 72 : Analyse CLHP de B2702-^{99m}Tc (a) après incubation dans le sang humain à 37°C sous agitation pendant 1h (b), 3h (c) et 6h (d)

Après 1 heure d'incubation, le complexe est retrouvé sous un pic principal qui commence à s'élargir. A 3 heures, on observe l'apparition d'un métabolite plus hydrophile que la molécule principale qui augmente au cours du temps. Le pic à 6 minutes correspond au TcO₄⁻ et reste stable à 5-10%.

Etudes de Biodistribution

Les biodistributions de B2702-^{99m}Tc et PB₍₁₋₁₀₎-^{99m}Tc réalisées 3 heures après injection du radiotracer chez les animaux contrôles (C57) et hypercholestérolémiques (Apo E), indiquent une très forte élimination rénale et dans une moindre mesure hépatique. La clairance sanguine du peptide B2702 est

relativement lente Au niveau de la carotide gauche ligaturée, une fixation a été observée pour le B2702 et PB1.

Imagerie scintigraphique :

Parmi tous les dérivés B2702 étudiés, les images obtenues mettent en évidence, une fixation pour le PB1 au niveau de la carotide gauche ligaturée. (Figure 73).

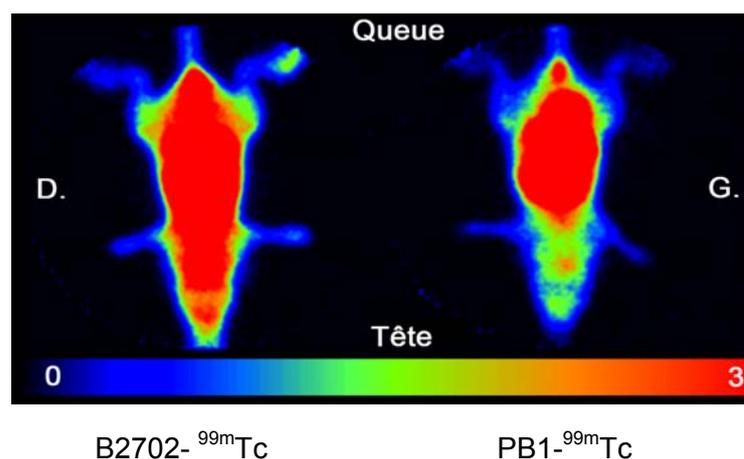


Figure 73 : Imagerie planaire des souris ApoE^{-/-} ligaturées au niveau de la carotide gauche, injectées avec B2702-^{99m}Tc et PB1-^{99m}Tc.

- **Etude du métabolisme *in vivo* de B2702-^{99m}Tc**

Les analyses *in vivo* ont été effectuées chez la souris C57Bl/6 contrôle et C57Bl/6 ApoE^{-/-} hypercholestérolémique. Trois heures après injection du traceur, des échantillons de sang et d'urine des souris ont été prélevés et analysés par CLHP.

- Analyse CLHP du filtrat de sérum de souris :

Sur un échantillon de sérum de souris prélevé 3 heures après administration du traceur (n=3), on retrouve la molécule sous sa forme initiale mais avec un pic plus large que le pic du produit principal. Le TcO₄⁻ est toujours présent à hauteur de 5% (figure 74-a).

Analyse d'urine : 3 heures après injection, on trouve un pic de 10% de métabolite intermédiaire, à côté du pic initial du peptide. Le TcO₄⁻ reste inférieur à 5% (figure 74-b).

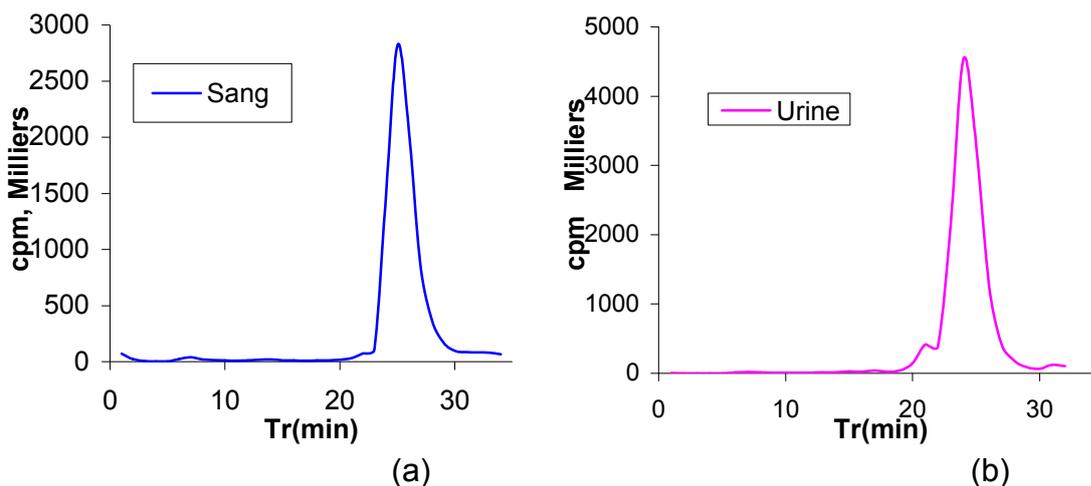


Figure 74 : Chromatogramme CLHP de B2702-^{99m}Tc dans le sang (a) et l'urine (b), 3 heures après injection aux souris.

Analyse du foie et des reins :

L'analyse chromatographique des échantillons de foie et de rein 3 heures après injection et après préparation d'une solution homogène de ces organes puis filtration par Nanosep[®] 10 komega, détecte essentiellement le peptide technétié sous sa forme initiale. Le TcO_4^- est présent avec une faible activité (figure 75).

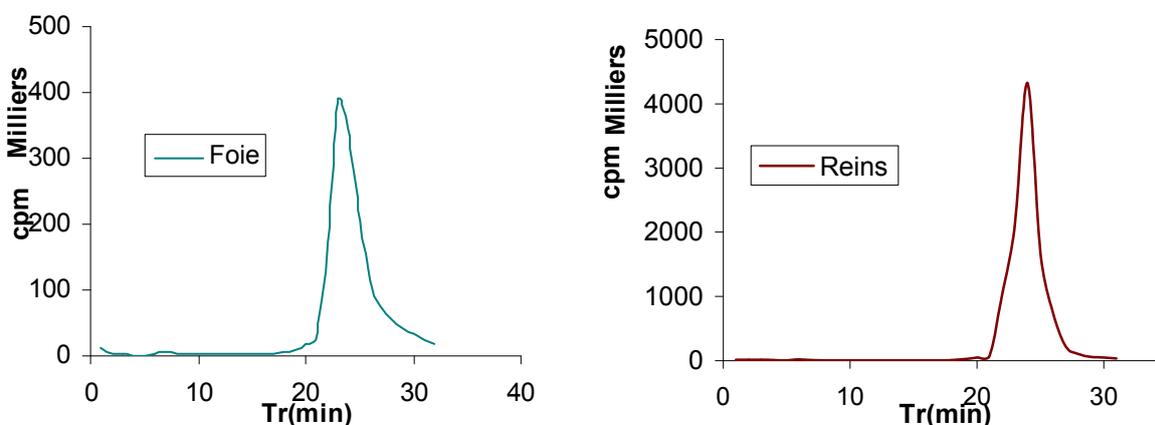


Figure 75 : Chromatogramme CLHP du B2702-^{99m}Tc dans le foie et les reins, 3 heures après l'injection aux souris.

- **Etude du métabolisme *in vivo* PB1-PB10 ; analyses urinaires**

Chaque peptide PB1-PB10 technétié (sauf PB5) est injecté aux souris Apo E -/-. Cette injection est réalisée au niveau d'une veine latérale de la queue. A la fin de l'expérience, des échantillons d'urine sont prélevés et analysés par CLHP.

PB1 et PB2:

L'analyse de PB1 par CLHP en utilisant une colonne C4 et un gradient de solvant de H₂O-TFA 0,1%(A) / (acétonitrile- TFA 0,1%)-(H₂O-TFA 0,1%) (90/10)(B) de 0 à 5 mn 5 % de B, de 5 à 20 mn de 5% à 60 % de B, et de 20 à 30 mn 60% de B ; débit 0,7 ml/mn, montre la présence de 15-20% de technétium sous forme TcO₄⁻ ainsi que sous forme de peptide technétié sans aucun métabolite intermédiaire (figure 76). Dans les mêmes conditions, l'analyse de PB2 n'indique pas la présence de TcO₄⁻ ni de métabolite intermédiaire.

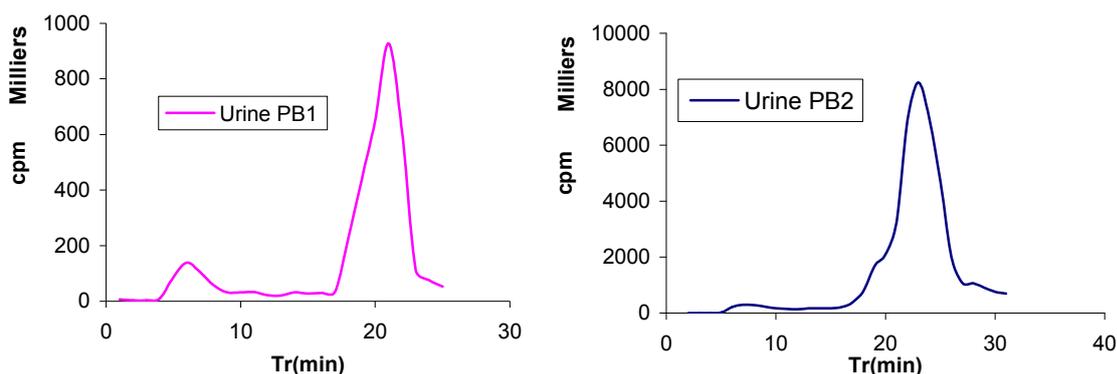


Figure 76 : Chromatogramme CLHP de PB1-^{99m}Tc et PB2-^{99m}Tc, dans l'urine, 3 heures après l'injection chez la souris.

PB3 et PB4 :

Les peptides PB3 et PB4 dans l'urine sont trouvés avec une stabilité supérieure à 80%. Un pic chromatogramme CLHP de 15-20% de TcO₄⁻ est détecté 3 heures après injection du traceur aux souris.

PB7 :

Dans l'urine recueillie 3 heures après injection du traceur, le peptide technétié sous forme non métabolisée et plusieurs molécules technétiés (métabolite du peptide marqué) ainsi que le TcO₄⁻ sont détectés.

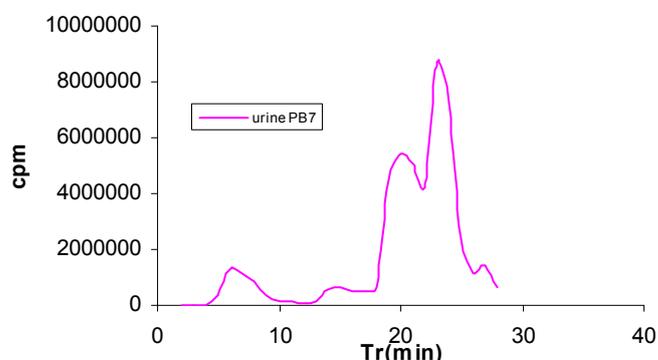


Figure 77 : Chromatogramme CLHP du PB7-^{99m}Tc dans l'urine, 3 heures p.i. chez la souris.

PB6, PB8, PB9 et PB10

Les dérivés PB6, PB8, PB9 et PB10 sont très stables et aucun métabolisme *in vivo* n'est détecté via la présence de TcO_4^- ou de métabolite intermédiaire.

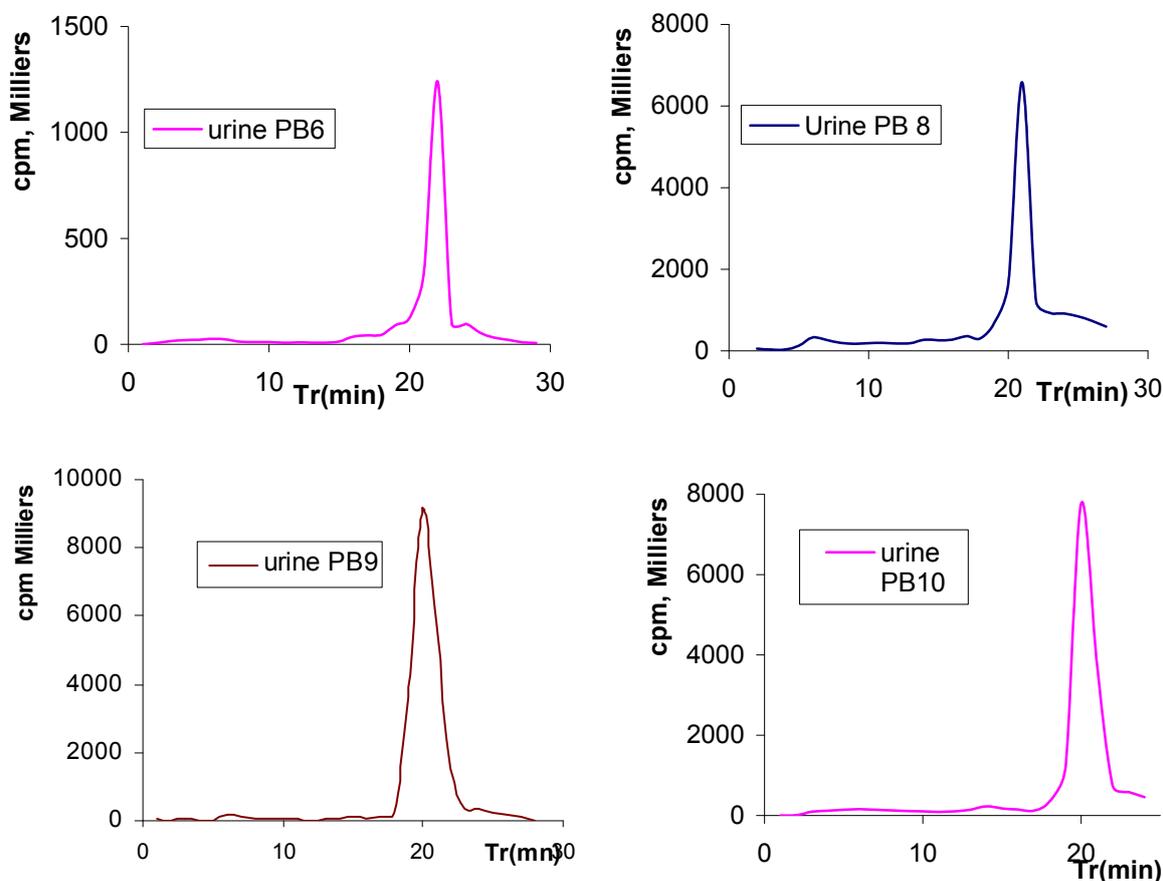


Figure 78 : Stabilité *in vivo* des peptides PB6- ^{99m}Tc , PB8- ^{99m}Tc , PB9- ^{99m}Tc et PB10- ^{99m}Tc dans l'urine 3 h p.i. chez la souris.

En conclusion, on peut noter le marquage avec une pureté radiochimique supérieure à 90% pour tous les dérivés de B2702 sauf PB5. Les 9 autres peuvent être injectés aux souris, avec une stabilité *in vivo* importante.

III- 2- Les peptides BOT 321, BOT337 et EP070946

Les peptides BOT 321, BOT 337 et EP070946 sont de nouveaux traceurs potentiels de la plaque d'athérome vulnérable. Le BOT 321 et le BOT 337 appartiennent à la protéine VLA-4, ligand naturel de VCAM. Ces deux peptides sont synthétisés par l'équipe du LEDSS V (ingénierie moléculaire - UMR CNRS 5616, Pr. Dumy), et EP070946 par EUROGENTEC. Notre objectif est de les marquer au ^{99m}Tc et d'évaluer le comportement biologique de ces complexes sur un modèle murin d'athérosclérose.

Comme tous les peptides testés, la résistance à la chaleur ainsi que la stabilité *in vitro* et *in vivo* ont été étudiées.

- Les peptides ont été incubés à la température de 50, 80 et 100°C pendant 30 minutes. Le résultat montre qu'ils commencent à se dégrader à 100°C.

L'analyse CLHP de ces peptides est effectuée avec une colonne C4. En effet, l'utilisation d'une colonne C18 ne permet de recueillir que moins de 20% de l'activité, et cette colonne n'est donc pas adaptée. En changeant les solvants d'élution ainsi que le gradient, on observe le passage de 30% du peptide à travers la colonne. La condition utilisée est de prendre une colonne C4 avec un gradient des solvants H₂O-TFA 0,1% (A) / acétonitrile-TFA 0,1% (B) ; de 0 à 5 mn 5 % de B, de 5 à 20 mn de 5% à 80 % de B, et de 20 à 30 mn 80% de B ; un débit 0,7 ml/mn et un détecteur UV ont été utilisés.

- 740 MBq de l'intermédiaire technétié préalablement préparé est mis en présence avec un échantillon de 100 µg de chaque peptide et incubé à 80 °C pendant 20 minutes. La préparation est analysée par CLHP. La pureté radiochimique est supérieure à 95%.

- Un échantillon de 100 µg de chaque peptide est incubé avec 1100 MBq (~30 mCi), 1850 MBq (50 mCi), 3700 MBq (100 mCi) d'intermédiaire technétié. L'activité spécifique correspondant à ces activités est 18 GBq/µmol, 30 GBq/µmol et 61 GBq/µmol, respectivement. Le meilleur résultat pour les deux peptides est 1850 MBq/100 µg (30 GBq/µmol). Le tableau 16 présente tous les résultats obtenus.

	BOT 321-^{99m}Tc	BOT 337-^{99m}Tc	EP070946-^{99m}Tc
Activité spécifique	Pureté radiochimique		
18GBq/µmol	>95%	>95%	>95
30GBq/µmol	>95%	>95%	<80
61GBq/µmol	< 85%	<80%	<70

Tableau 16 : Activité spécifique atteint pour les peptides BOT 321-^{99m}Tc, BOT337-^{99m}Tc et EP070946-^{99m}Tc

- le coefficient de partage de ces peptides technétiés est mesuré à pH 7. La valeur de Log P pour BOT 321-^{99m}Tc, BOT 337-^{99m}Tc et EP070946-^{99m}Tc est -1.8, -1.5 et -2.4 respectivement. Les trois complexes sont donc hydrophiles.

Stabilité des traceurs dans le temps et dans le sang humain total

- Après leur préparation, les traceurs technétiés ont été incubés pendant 24 heures à température ambiante dans le milieu de marquage. L'analyse montre qu'ils sont stables jusqu'à 24 heures avec une pureté radiochimique > 95%.
- Afin de déterminer la stabilité du peptide technétié dans le sang humain, chaque complexe est préparé avec une pureté radiochimique plus de 95% et incubé dans le sang total. Des prélèvements ont été effectués après 1, 3 et 6 heures d'incubation et analysés par CLHP. Le chromatogramme montre que 10-15% du technétium est sous forme TcO_4^- tandis que le reste sous forme de complexe qui est élué à 22 minutes. Le chromatogramme de BOT 321- ^{99m}Tc est présenté dans la figure 79.

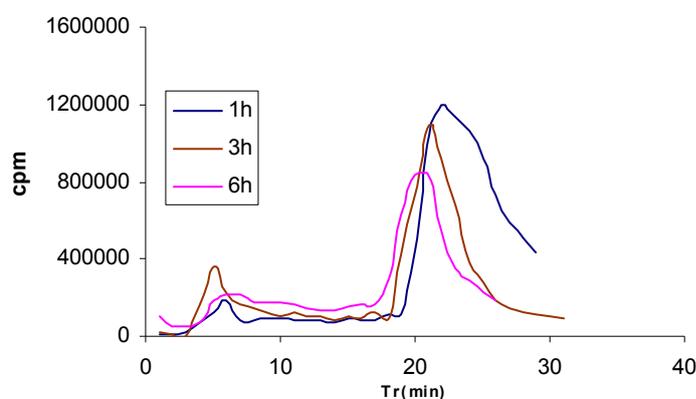


Figure 79 : Stabilité *in vitro* de peptide BOT321- ^{99m}Tc , 1h, 3h et 6h après incubation dans le sang humain total.

Répartition sanguine :

- La fixation des peptides technétiés sur les cellules sanguine est 10-12% à 1 heure d'incubation et n'augmente pas au cours du temps jusqu'à 6 heures.
- La fixation protéique est déterminée par précipitation des protéines plasmatiques par le TCA 10% après incubation des traceurs technétiés. La fixation protéique pour BOT 321- ^{99m}Tc est de 25-30%, de 20-30% pour BOT 337- ^{99m}Tc et de 15-20% pour EP070946- ^{99m}Tc .

Etude du métabolisme *in vivo*

Les biodistributions de BOT321- ^{99m}Tc (contrôle positif) et de BOT337- ^{99m}Tc (contrôle négatif) réalisées 3 heures après injection du radiotracer chez les animaux contrôles (C57) et hypercholestérolémiques (Apo E), ne sont significativement pas différentes.

On observe une très forte élimination rénale et dans une moindre mesure hépatique. L'activité des traceurs n'est pas significativement différente entre les carotides gauches et droites dans les deux groupes expérimentaux.

Imagerie planaire *in vivo* :

Conformément aux résultats observés en biodistribution, les images obtenues mettent en évidence une forte captation rénale et hépatique. Le traceur BOT321-^{99m}Tc ne semble pas sensible à l'athérogénèse induite par la ligature puisque sa fixation dans la carotide droite non ligaturée est similaire à celle observé dans la carotide gauche ligaturée.

Stabilité des traceurs technétié dans le sang et l'urine après injection *in vivo*

Analyse sanguine du BOT321-^{99m}Tc :

Le chromatogramme CLHP d'analyse du sang, 3 heures après injection, montre un pic correspondant au produit principal, non dégradé, ainsi qu'un pic large correspondant au TcO_4^- (figure 80-a) .

Analyse urinaire du BOT321-^{99m}Tc :

L'analyse sur un échantillon de 3 heures montre une forte présence (20-30%) de technétium libre (Tr = 5 min) et un pic très large du traceur principal (figure 80 - b).

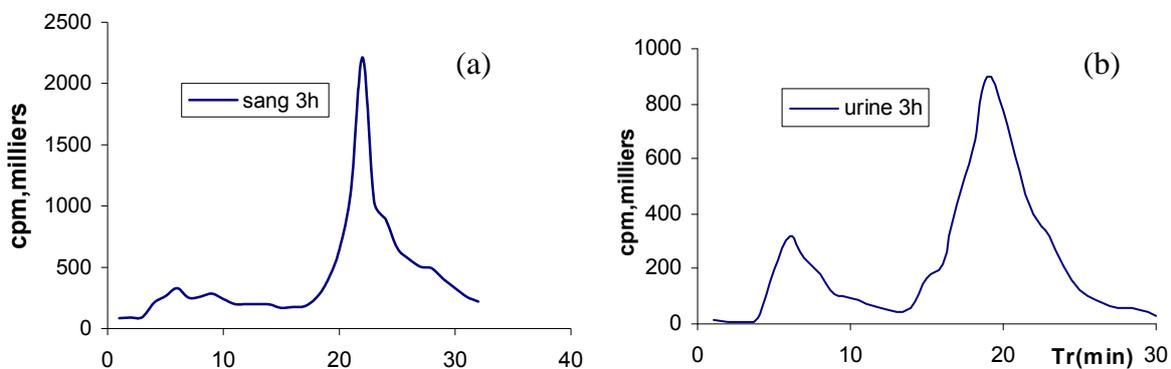


Figure 80 : Analyses CLHP des échantillons du sang(a) et de l'urine(b), 3 heures après injection de BOT321-^{99m}Tc chez la souris C57 et Apo E-/- ligaturées au niveau de la carotide gauche.

Les analyses sanguines et urinaires de BOT337-^{99m}Tc et EP070946-^{99m}Tc montrent des résultats presque identiques à ceux de BOT321-^{99m}Tc.

Conclusion :

Le faible taux de fixation de BOT321-^{99m}Tc et de EP070946-^{99m}Tc dans les plaques d'athérome induites par ligature de l'artère carotide gauche ne permet pas de mettre en évidence une différence de fixation significative entre les deux carotides quel que soit le modèle de souris utilisé.

IV- Radiomarquage du peptide P140, un agent thérapeutique pour le lupus érythémateux

Le peptide P140 possède 3 tyrosines dans sa structure peptidique. Ces tyrosines permettent de réaliser une iodation par substitution électrophile.

• Analyse CLHP du peptide P140

• 20 μ l (1 mg/ml) du peptide P140 est injecté sur colonne C18 lichrosorb[®]; le gradient utilisé est H₂O-TFA 0,1 % (A) / (acétonitile-TFA 0,1,) (B) : de 0 à 5 mn 5 % de B, de 5 à 20 mn de 5 à 60 % de B, de 20 à 28 mn de 60% à 80% de B et de 28 à 30 mn de 80%; débit 0,7 ml/mn , et détecté par détecteur UV. Dans ces conditions, les solvants ne sont pas capables d'éluer le peptide P140. Nous avons donc décidé de changer le gradient de solvants par un gradient de 0 à 5 mn 5 % de B, de 5 à 20 mn de 5 à 80 % de B, de 20 à 40 mn de 80% de B. Cependant, la proportion de peptide recueilli dans ces conditions reste < 50% et le temps de rétention est élevé (37 minutes).

• 20 μ l (1 mg/ml) du peptide P140 sont injectés sur une colonne C4 Waters[®]; le gradient utilisé est H₂O-TFA 0,1 % (A) / (acétonitile / H₂O (90/10)-TFA 0,1,) (B) : de 0 à 5 mn 5 % de B, de 5 à 20 mn de 5 à 60 % de B, de 20 à 30 mn de 60% à 80% de B ; débit 0,7 ml/mn ; détection UV. Dans ces conditions, le temps de rétention du peptide P140 est de 22 minutes.

IV -1-Préparation du traceur iodé

IV -1-1-Radioiodation de P140 par l'Iodobeads[®]

La technique d'oxydation par l'Iodobeads[®] (correspondant à de la chloramine-T liée sur un support solide) est utilisée pour marquer de petites quantités de peptide ; l'agent oxydant greffé sur les billes de polystyrène est éliminé à la fin de la réaction par simple filtration et aucun réducteur n'est nécessaire.

• 1 mCi d'une solution d'Iode-125 dilué dans 100 μ l de PBS est mis en contact avec une bille d'Iodobeads[®]. Après 5 minutes, 30 μ g d'une solution aqueuse à 1 mg/ml de P140 est ajouté et incubé pendant 15 minutes à température ambiante.

A la fin de la réaction, l'oxydant (Iodobeads[®]) est éliminé et le peptide P140 marqué est analysé par CLHP, sur colonne C4 Waters[®] dans les conditions décrites. 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. La pureté radiochimique de P140-¹²⁵I est supérieure à 90%, mais la quantité du peptide iodé qui reste collé sur la bille d'Iodobeads[®] est importante (30% du peptide). De plus, si la quantité demandée de P140 iodé dépasse 2 mCi, cet oxydant n'est plus capable de finir la réaction d'oxydation (la pureté radiochimique final reste alors inférieure à 60%) et on doit augmenter sa quantité, ce qui entraîne des pertes importantes de peptide iodé. De ce fait nous avons employé la solution de la chloramine-T.

IV -1-2-Radioiodation de P140 par la chloramine-T en solution

La pureté radiochimique de la préparation de P140-¹²⁵I en présence de 37 MBq d'iode est supérieure à 95% pour 30 µg, 50 µg et 100 µg de peptide (figure 81).

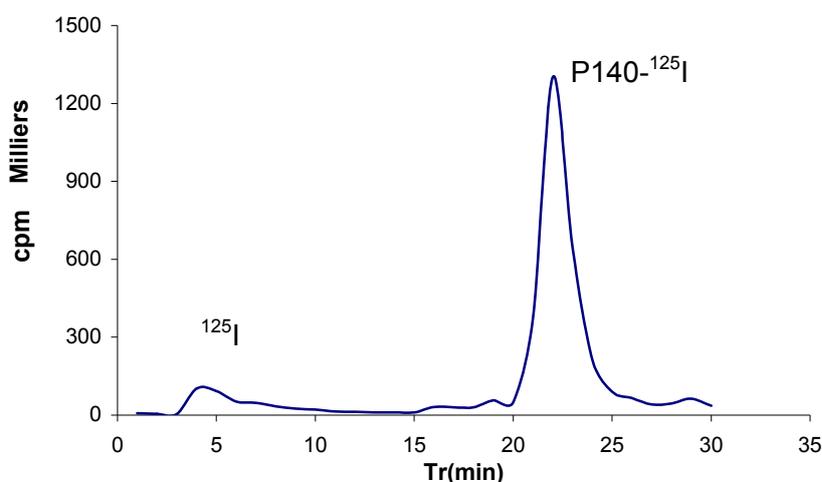


Figure 81 : Chromatogramme CLHP de peptide P140 après marquage à l'iode-125 par la méthode d'oxydation à l'aide de chloramine-T en solution.

Chloramine-T et temps de réaction optimal

L'ensemble des résultats montrent que la cinétique de la réaction dépend du temps de réaction et de la concentration en chloramine-T ajoutée à la solution. Si 30 µg de P140 sont incubés en présence d'une solution d'iodure de sodium à 37 MBq et en présence de 30 nmoles de chloramine-T (dilution à 1mg/ml), la pureté radiochimique, après 5 minutes d'incubation est 80% et est supérieure à 95% après 15 minutes.

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. Afin d'obtenir une pureté radiochimique supérieure à 95%, 30 µg de peptide sont marqués par 37 MBq d'iode 125 en présence de 30 nmoles de chloramine-T pendant 15 minutes.

Peptide (30µg)	Temps d'incubation en minutes	Pureté radiochimique
P140	5	80%
	10	93%
	20	>95%

Tableau 17 : Influence du temps d'incubation sur la pureté radiochimique de P140 lors du marquage à l'iode-125.

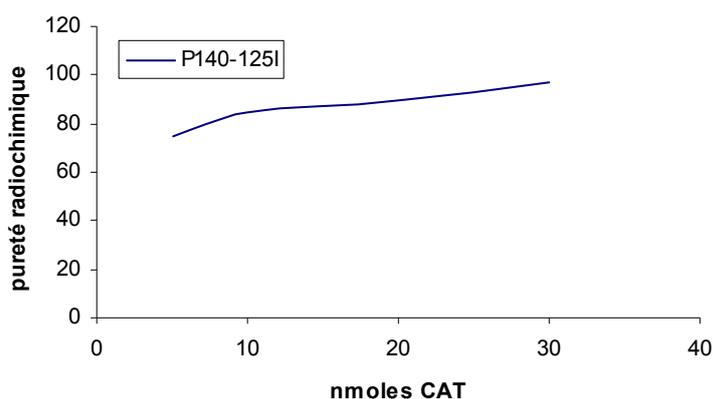


Figure 82 : Influence de la quantité de chloramine-T sur la pureté radiochimique de P140-¹²⁵I

IV -2-Propriétés physico chimiques et étude *in vitro* du traceur iodé

- **Stabilité du peptide iodé dans le temps**

Le peptide P140-¹²⁵I reste stable pendant 24 heures à température ambiante dans l'eau purifiée et dans NaCl 0.9%. La pureté radiochimique est toujours supérieure à 97%.

Après 48 heures d'incubation, le chromatogramme CLHP révèle le peptide iodé sans aucune dégradation.

- **Stabilité du peptide iodé dans le sang humain total**

Le produit natif présente un rendement de marquage de 97,5% par CLHP. Il est incubé pendant 1 et 3 heures en présence de sang total humain à 37°C sous agitation. Le sang est centrifugé pendant 15 minutes et le sérum est analysé par CLHP. Les résultats montrent que 85% et 75% de l'activité sérique est retrouvée sous forme de P140-¹²⁵I. Un pic large avec un temps de rétention de 5-7 minutes a été détecté (figure 83) qui correspond non seulement à l'iodure libre mais aussi à un autre composé marqué très hydrophile (n=3). (Ce petit composé hydrophile est identifié par l'équipe de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR CNRS 9021, Strasbourg et correspond à la position 148 à 151 du peptide).

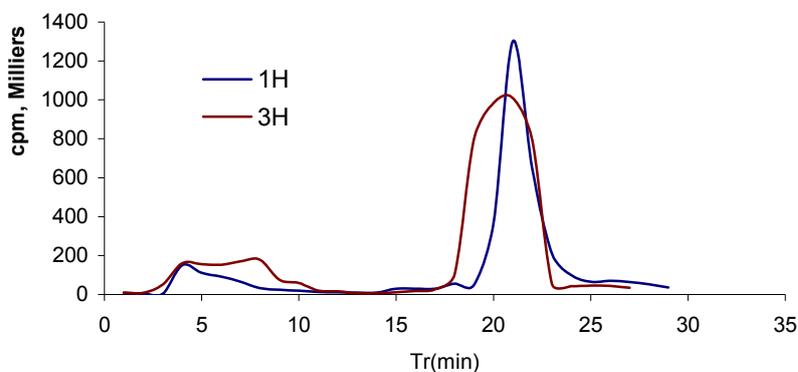


Figure 83 : Analyse de stabilité du complexe P140-¹²⁵I dans le sang total humain.

IV -3-Etudes *In-vivo*

Biodistribution et imagerie

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange kétamine / xylazine et l'injection de P140-¹²⁵I (0.63 ± 0.04 MBq/g poids corporel [17.0 ± 1.1 μ Ci/g]) est réalisée dans une veine caudale. Une heure après l'injection, les animaux étaient sacrifiés par dislocation cervicale, et la biodistribution du traceur était évaluée après prélèvement, rinçage, et comptage de la radioactivité dans les organes principaux. La biodistribution et l'imagerie sont effectués par Pascale Perret. Les résultats de biodistribution du traceur sont exprimés en % dose injectée / g d'organe (%DI/g).

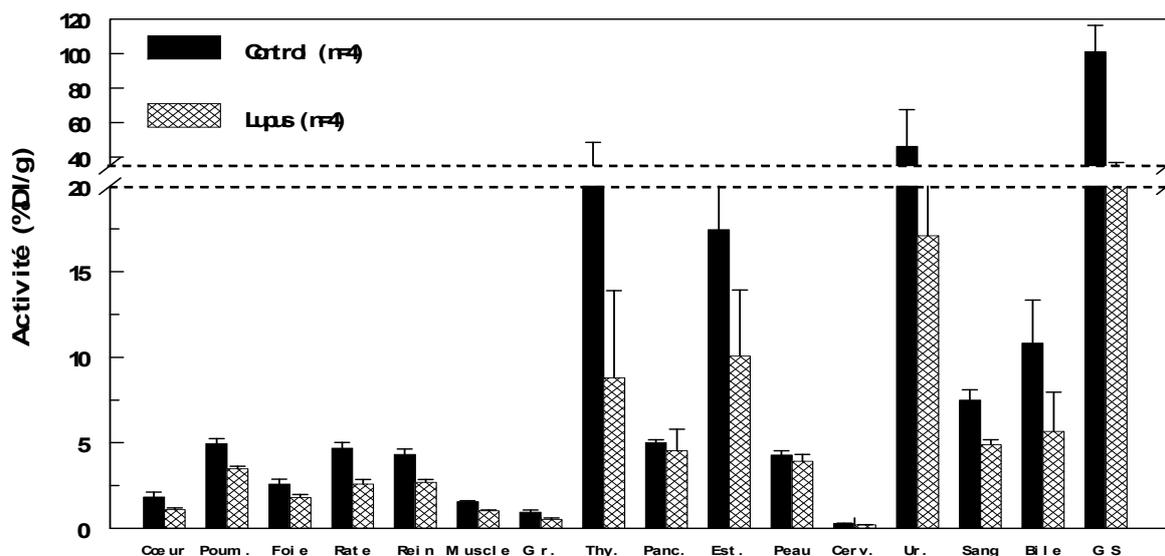


Figure 84 : Biodistribution du P140-¹²⁵I, chez les souris contrôle et lupique, 30 minutes après l'administration du radioligand.

Le profil général de la biodistribution du traceur dans les organes des animaux contrôles et lupiques est similaire. L'activité par organe exprimée en %DI/g de tissu est de manière générale légèrement supérieure chez les animaux contrôles. La voie d'élimination principale du traceur est rénale, avec une très forte activité urinaire post-injection dans les 2 groupes. La plus forte activité est retrouvée dans les glandes salivaires. Le prélèvement de cet organe a été décidé afin d'identifier la source de la forte activité observée sur les images planaires. Les muqueuses de l'estomac sont également le lieu d'une forte activité en ¹²⁵I. La très faible activité cérébrale indique que le traceur ne passe pas la barrière hématoencéphalique. L'activité circulante reste élevée. Au final, la forte activité observée dans la thyroïde et la muqueuse de l'estomac semble indiquer une déiodation du traceur *in vivo*, qui est alors confirmée par les profils HPLC sanguin et urinaire présentés ci-dessous. Cependant, dans ce contexte, la très forte activité observée dans les glandes salivaires ne peut être entièrement attribuée à la fixation d'¹²⁵I libre, puisque cet organe est décrit pour fixer l'iode de manière nettement inférieure à la thyroïde.

- **Etude de P140-¹²⁵I dans le sang et l'urine *in vivo***

Les échantillons d'urine et de sang sont analysés en CLHP. L'analyse de l'urine est réalisée directement tandis que celle du sang est effectuée après élimination des globules et filtration des protéines plasmatiques.

Les profils CLHP des activités sanguines et urinaires en P140-¹²⁵I- sont identiques chez la souris lupique et chez la souris contrôle. La figure 84 représente les profils CLHP des activités urinaires et sanguines en P140-¹²⁵I chez la souris contrôle.

Les résultats indiquent la présence d'un seul composé éliminé par voie urinaire. Les études CLHP ne permettent pas de déterminer si ce composé correspond à de l'¹²⁵I libre ou au fragment FIEY¹⁵¹ (composition 148-151) de P140 marqué à l'iode-125.

- L'analyse CLHP d'échantillons sanguins indique la présence de 2 composés radioactifs en proportion égales. Le composé élué à 22 minutes correspond au traceur P140-¹²⁵I issu du marquage. Comme indiqué ci-dessus, la nature exacte du composé élué à 5 minutes ne peut être déterminée par CLHP (FIEY¹⁵¹⁻¹²⁵I ou ¹²⁵I libre).

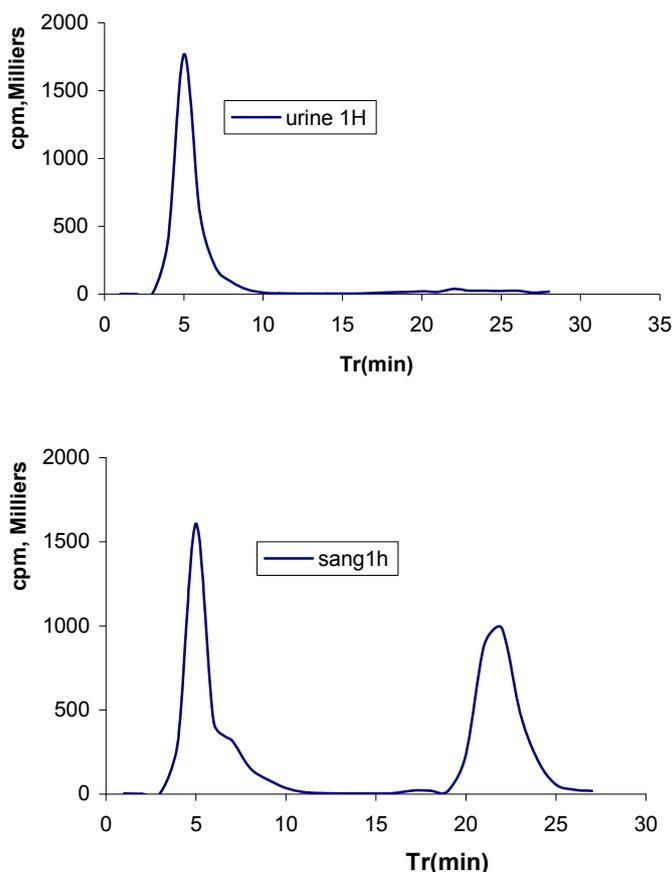


Figure 85 : Analyses des urines et du sang des souris 30 minutes après injection du complexe P140-¹²⁵I.

Partie III :
Discussion, Conclusion

Discussion

La médecine nucléaire est une technique d'imagerie diagnostique non-invasive utilisée dans de nombreuses pathologies. Ses principales applications sont l'oncologie, l'étude de la perfusion myocardique et les pathologies ostéo-articulaires. Les objectifs de notre recherche sont de mettre au point et d'évaluer de nouveaux radiopharmaceutiques permettant :

- le diagnostic de processus impliqués dans des pathologies représentant un problème de santé publique : la néoangiogenèse tumorale et la plaque d'athérome vulnérable.
- l'évaluation de l'efficacité de traitement du lupus érythémateux disséminé.

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 grâce à leurs propriétés biologiques et physiques, notamment leur absence de pouvoir antigénique, leur clairance sanguine rapide et leur unique site de reconnaissance aux récepteurs.

Depuis le début des années 1970, le radiomarquage d'anticorps monoclonaux a débuté, permettant 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 que ceux des traceurs iodés en raison d'une meilleure stabilité du marquage.

Excepté pour les isotopes utilisés en tant que tels, 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 stables, 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 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 toute étape de purification supplémentaire difficilement réalisable en routine au laboratoire.

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 est 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. C'est pourquoi on étudie la stabilité de marquage en présence de cystéine pour les structures peptidiques marquées par le technétium 99m.

Le métabolisme des molécules radiomarquées regroupe différents phénomènes : la catalyse enzymatique des peptides, l'agrégation de petits peptides sous forme de grosses molécules, l'acétylation ou la glucurono-conjugaison 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.

I- les marqueurs de l'angiogenèse

I-1- les ligands de $\alpha_v\beta_3$

Les traceurs évalués sont des molécules contenant le motif peptidique arginine, glycine, acide aspartique (RGD) qui est un des nombreux ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est surexprimée par les cellules endothéliales activées; il s'agit donc d'une cible potentielle pour les agents anti-angiogéniques et les traceurs de la néoangiogenèse tumorale. Les traceurs utilisés sont des ligands radiomarqués possédant ce motif RGD : une molécule cyclique contenant un motif RGD et une constituée de 4 cyclo-RGD fixés sur un gabarit RAFT.

Nous avons choisi de marquer les ligands au technétium-99m ou à l'indium-111. Le marquage au technétium-99m s'effectue par l'intermédiaire d'un petit synthon bifonctionnel, le tricarbonyle technétié. Ce petit synthon bifonctionnel réagit avec de nombreux acides aminés et plus particulièrement avec l'histidine qui fournit trois sites de liaison susceptibles de s'échanger avec les 3 sites de coordination labiles du complexe ; l'adjonction d'une histidine comme site de liaison permet de constituer un complexe stable *in vitro* et *in vivo*. Le synthon réagit à une extrémité avec le technétium et à l'autre extrémité avec une histidine. L'histidine est fixée soit sur le cyclo-RGD (cRGD) soit au niveau du RAFT sur la face fonctionnalisée (face opposée à la face de ciblage). Le marquage à l'indium-111 est effectué à l'aide d'un groupement intermédiaire DOTA, ce qui permet un radiomarquage très stable.

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

- 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 (Schibli R. 1999). Le marquage doit être réalisé à une température maximale de 80°C afin d'éviter la dégradation du peptide par la chaleur. La durée de la réaction est de 20 minutes au bain-marie. Les conditions de pH sont définies entre pH 7 et pH 9. On obtient alors des complexes radiomarqués d'une bonne pureté radiochimique (>95%) avec une activité spécifique importante. Tous les complexes sont stables dans le milieu de marquage pendant au moins 24 heures. Les études de stabilité *in vitro* montrent une légère décomplexation pour le peptide RAFT-RGD-^{99m}Tc à partir de 3 heures d'incubation.
- Le marquage à l'indium est réalisé par l'intermédiaire du DOTA à 80°C maximum, en milieu d'acide (pH = 5) afin d'éviter la réduction de l'indium-111. Le

marquage est obtenu avec un rendement et une pureté radiochimique supérieure à 95%. La molécule marquée est stable pendant plus de 48 heures dans le milieu de marquage mais aussi dans le sérum physiologique. Les études de stabilité en milieu biologique réalisées *in vitro* ne montrent aucune décomplexation au cours du temps.

I-1-2-Propriétés physico-chimiques des peptides technétiés :

Des expériences de stabilité en présence de cystéine ou d'histidine ont été réalisées afin de vérifier l'absence de décomplexation du peptide radiomarqué en condition biologique. Malgré la présence d'un large excès de cystéine ou d'histidine, le radiomarquage est stable; seule une faible quantité de technétium libre a été observée.

I-1-3-Propriétés pharmacologiques

Le marquage de biomolécules spécifiques par des isotopes organométalliques est en développement. Ce type de marquage nécessite la présence d'un chélate possédant un encombrement stérique parfois important pouvant conduire à des modifications physico-chimiques et biologiques de la biomolécule.

- Les peptides technétiés :

L'aquaion tricarbonyle est un complexe relativement hydrophile qui favorise l'élimination rénale et urinaire du radiopharmaceutique. La présence du gabarit RAFT sur lequel sont fixés les quatre pentacycles RGD augmente le poids moléculaire du radioligand, entraînant son élimination par voie hépatobiliaire.

In vitro, la fixation du RAFT-RGD-^{99m}Tc aux protéines plasmatiques est importante ; cette fixation a été observée après précipitation du sérum au TCA, et électrophorèse. Le pourcentage de molécules libres susceptibles d'atteindre le site récepteur est d'environ 40% à 50%. Ce faible pourcentage pourrait entraîner la diminution de l'intensité du signal observé. Cette fixation aux protéines plasmatiques n'a pas été observée avec la molécule non-spécifique RAFT-RAD-^{99m}Tc, ce qui explique son élimination sanguine très rapide. On note que les résultats de coefficient de partage indiquent que le peptide RAFT-RAD-^{99m}Tc est plus hydrophile que le RAFT-RGD-^{99m}Tc.

In vivo chez la souris, on observe l'élimination rénale mais également hépatobiliaire des radioligands. Hormis dans les organes d'élimination, la captation des traceurs est faible. La clairance sanguine du peptide RAFT-RAD-^{99m}Tc est plus rapide que celle du RAFT-RGD-^{99m}Tc. L'analyse de certains organes et liquides biologiques montre une stabilité des traceurs technétiés *in vivo* forte pour le cRGD-^{99m}Tc et le RAFT-RAD-^{99m}Tc et une stabilité relative pour le RAFT-RGD-^{99m}Tc.

- RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In

In vitro, la fixation protéique étudié par électrophorèse est très faible (moins de 1%) pour cette molécule hydrophile.

In vivo, chez la souris, le RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In est très rapidement éliminé de l'ensemble des organes par les reins ; par ailleurs, l'activité rénale reste supérieure à 30% jusqu'à 48h post-injection. En revanche, les très faibles captations hépatique et musculaire et la clairance sanguine rapide sont favorables à de bons rapports tumeur/bruit de fond en imagerie.

Le complexe RAFT-RGD-DOTA-¹¹¹In est stable dans l'urine et le foie tandis que dans les reins un produit inconnu est détecté. Afin d'identifier ce produit, le chromatogramme d'extraits de reins a été comparé avec celui du complexe DOTA-¹¹¹In. Cette expérience a confirmé la présence de ce complexe chargé positivement dans les reins. Le complexe peut être dégradé dans les reins au niveau de la liaison RAFT / DOTA : le DOTA-¹¹¹In capté par réabsorption tubulaire peut se fixer sur les protéines mégalines (chargées négativement et ayant une grande affinité pour les particule à charge positive) (Dejong M. 2005, Gotthardt M. 2007, Melis M. 2005). Le reste du complexe correspondant au peptide non marqué est éliminé et non détecté par notre CLHP. En conséquence, le chromatogramme CLHP de l'urine et du foie ne montre que le peptide marqué et l'indium-111 libre tandis que le chromatogramme des reins montre un troisième produit, le DOTA-¹¹¹In.

I-1-4-Etude biologique et efficacité clinique

Le choix d'un ligand possédant le motif peptidique RGD semble donc pertinent dans le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. L'originalité de la molécule RAFT-RGD par rapport au

cRGD est le couplage de 4 cyclo-RGD sur un vecteur, le RAFT, qui pourrait faciliter l'internalisation cellulaire.

Cette construction originale RAFT-RGD s'est révélée particulièrement efficace *in vitro* : les études de captation cellulaire réalisées par L. Sancey (Sancey L. 2006) ont montré que le RAFT-RGD est davantage capté par les cellules $\alpha_v\beta_3$ positives que le cRGD, et ceci de manière significative. Les études précliniques montrent que la captation tumorale du RAFT-RGD- ^{99m}Tc est significativement supérieure à celle du cRGD- ^{99m}Tc et de la molécule non-spécifique contenant le motif RAD.

Les études réalisées avec le RAFT-RGD-DOTA- ^{111}In montrent une captation tumorale plus faible qu'avec le traceur technétié tandis qu'en imagerie gamma toutes les tumeurs positives sont visibles.

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 réalisée avec le RAFT-RGD-DOTA- ^{111}In est préliminaire à la radiothérapie puisqu'un groupement DOTA est nécessaire au marquage du RAFT-RGD à l'indium-111, émetteur γ , ainsi qu'à l'yttrium-90, émetteur β^- . Les biodistributions du RAFT-RGD- ^{111}In ont soulevé un problème d'important : la forte captation rénale pourrait entraîner d'importants effets secondaires lors d'essais radiothérapeutiques. Des modifications du RAFT-RGD, sans doute nécessaires, pourraient permettre de limiter l'activité rénale du composé et d'augmenter sa rétention tumorale. Dans le groupe de R. Haubner, qui a produit des images de peptides dérivés du RGD (Haubner R. 2001⁽¹⁾ ; 2004), leur traceur a été couplé à un sucre (galactose) augmentant ainsi son caractère hydrophile et facilitant par là même son élimination (et le marquage de la molécule au fluor). Cette opération est bénéfique dans leur cas puisque la clairance sanguine est accélérée et la rétention rénale très faible chez l'homme (Beer AJ. 2005 ; Haubner R. 2005). L'administration d'agents diurétiques ou le blocage rénal par administration préalable de peptides (Béhé M. 2005) ou de gélatine (gelofusine) (Van Eerd JE. 2006, Gotthardt M. 2007) pourrait également faciliter l'élimination rénale du radioligand et limiter ainsi l'irradiation des reins.

I-2- le peptide HARP

I-2-1-Réaction de marquage et propriétés physico-chimiques :

Le marquage du peptide HARP111-124 est réalisé par une méthode simple et rapide : la substitution électrophile d'un résidu tyrosine. La présence de chloramine-T peut induire une dégradation du peptide, donc nous avons effectué le marquage par utilisation de Iodobeads[®]. La pureté radiochimique obtenue est inférieure à 90%, ce qui nécessite la purification du traceur avant l'injection. Parmi les trois méthodes de purification étudiées, la chromatographie de partage sur colonne Sep-Pak C18 a été choisi, car le pourcentage de récupération du peptide et la pureté radiochimique obtenus étaient acceptables (>90%).

La molécule marquée est stable pendant 24 heures dans une solution de NaCl 0.9% 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 du peptide iodé au cours du temps, la libération d'iode libre étant observée après 3 heures d'incubation.

1-2-2- pharmacocinétique :

La fixation du HARP111-124 iodé aux protéines plasmatiques est faible (10-15%). Cette fixation a été observée après précipitation du sérum par le TCA. Le pourcentage de molécules disponibles pour atteindre à leur cible est donc important. *In vivo* chez la souris, l'élimination rénale et en moindre mesure l'élimination hépatobiliaire a été observée. La clairance sanguine est très rapide. La fixation du peptide dans la tumeur est faible et diminue au cours du temps. En imagerie, la tumeur n'a pas pu être identifiée, probablement en raison de sa petite taille.

Les études analytiques des urines 30 min et 6 heures après l'injection ont indiqué que 90% et 75% de la radioactivité correspond à P111-124-¹²⁵I, respectivement. À cause de l'élimination sanguine très rapide, l'activité présente dans le sang est faible et ne permet pas d'être analysée par CLHP.

Le comportement biologique du peptide HARP111-124 ne permet pas à ce jour son utilisation pour la détection de l'angiogenèse tumorale.

II- Les marqueurs de la plaque d'athérome

Les traceurs évalués sont des dérivés de la molécule HLA B2702, 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 au technétium-99m par la méthode susceptible d'être utilisée en routine, et qui permet la formation de complexes 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) ; afin de faciliter le radiomarquage un groupement HG est fixé sur chaque peptide.

II-1-1-Optimisation de la réaction de marquage

Le marquage du peptide B2702 et ses dix dérivés au technétium-99m est réalisé 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. 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 la durée d'incubation, la concentration du peptide et l'activité spécifique afin d'obtenir une pureté radiochimique supérieure à 90%.

Propriétés physico-chimiques des peptides technétiés :

En dépit de la présence de trois sites carbonyles (de petit synthon bifonctionnel) au sein de la molécule marquée, les traceurs technétiés de B2702 et ses dix dérivés (sauf PB5) sont tous hydrophiles et donc solubles dans les solvants aqueux.

Tous les traceurs marqués de cette famille sont stables jusqu'à 3 heures dans le milieu de marquage, ce qui est indispensable pour les essais *in vivo*. Certains d'entre eux sont stables jusqu'à 24 heures (B2702, PB3, PB4, PB7, PB9 et PB10).

II-1-2-Propriétés pharmacologiques :

In vitro la fixation des traceurs technétiés aux protéines plasmatiques, déterminée par précipitation et électrophorèse, est comprise entre 50-70%. Le pourcentage de la molécule disponible pour l'imagerie est donc faible.

In vivo chez la souris, on observe l'élimination rénale mais aussi hépatobiliaire du traceur. La clairance sanguine du peptide B2702 est relativement lente. L'analyse des organes d'élimination et des liquides biologiques ne montre aucune dégradation du B2702 jusqu'à 3 heures post-injection. La même analyse des dérivés, 3 heures après l'injection, montre que les peptides marqués PB1, PB2, PB6, PB8, PB9, PB10 sont très stables tandis que les complexes PB3, PB4 sont un peu moins stables comme le montre la présence de 10 à 20% de TcO_4^- . Le PB7 présente non seulement du TcO_4^- mais aussi un métabolite plus hydrophile que le peptide injecté.

In vivo en imagerie, chez la souris Apo E^{-/-} au niveau des plaques d'athérome qui expriment VCAM-1, une fixation a été observée pour le B2702 et PB1.

La fixation du PB1 est plus forte que le B2702 donc parmi tous les dérivés B2702, l'étude biologique sera poursuivie avec ce traceur.

II-2- Les homologues de VLA-4 (BOT321 et BOT337) et le peptide EP070946

Le choix des ligands BOT321 et BOT337 a été orienté par les recherches de Kelly KA. (2005). Le peptide identifié par cette équipe présente une forte homologie avec le ligand naturel de VCAM-1 nommé VLA-4. En effet, les études effectuées ont montrés une forte affinité de ce peptide pour la molécule cible.

Le peptide EP070946 a été choisi par les recherches de Nahrendorf M. (2006). Egalement ils ont montré une affinité considérable de ce peptide pour sa cible.

Réaction de marquage et propriétés physico-chimiques :

Les peptides sont radiomarqués au technétium-99m avec une pureté radiochimique supérieure à 95% et une activité spécifique de 37 MBq/ μ g. Ils sont stables en milieu de marquage pendant 24 heures.

In vitro dans le sang humain les complexes sont stables et aucune dégradation n'a été observée.

II-2-1-Propriétés pharmacologiques :

In vivo chez la souris, l'élimination des complexes est essentiellement effectuée par la voie rénale (Les trois peptides sont relativement hydrophiles ce qui favorise l'élimination rénale) mais aussi plus modestement par la voie hépatique.

La fixation sur les protéines plasmatiques n'est pas très forte (20-30%) et la clairance sanguine est rapide : la disponibilité de la molécule pour sa cible est donc favorable. L'analyse des liquides biologiques montre 20-30% de décomplexation.

II-2-2-Etude biologique et efficacité préclinique.

Les expérimentations ont montré que le BOT321-^{99m}Tc ne semble pas posséder les caractéristiques nécessaires au marquage de VCAM-1 donc à la détection des plaques d'athérome vulnérables. La fixation de ce peptide dans les plaques d'athérome induites par la ligation de l'artère carotide est faible. De plus, les études *in vivo* ne montrent pas de différence significative entre la fixation de BOT321-^{99m}Tc (témoin positif) et BOT337-^{99m}Tc (témoin négatif). De plus, les faibles rapports signal/bruit observés s'ajoutent aux éléments qui indiquent que le peptide BOT321-^{99m}Tc ne permet pas le dépistage des plaques d'athérome *in vivo*.

Cependant, Kelly et al. (Kelly 2005) ont étudié ce même peptide, et ont obtenu des résultats contraires, c'est-à-dire une fixation spécifique sur sa cible naturelle, VCAM-1. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que leurs études ont été réalisées avec un peptide marqué par un fluorochrome et non par du technétium, qui a une activité spécifique beaucoup plus faible que le fluorochrome.

III- le peptide P140 et la thérapie du lupus érythémateux disséminé

III-1-Optimisation de la réaction de marquage et caractéristiques physico-chimiques

Le marquage à l'iode du peptide P140 est réalisé par substitution électrophile sur les résidus tyrosines (AA 136,146 et 151) présents dans la molécule biologiquement active. 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 à une solution de NaI en 5 minutes, à température ambiante. La réaction est stoppée par adjonction d'un réducteur, le pyrosulfite de sodium. La réaction est courte (10-15 minutes). Les paramètres de la réaction d'iodation étudiés afin d'obtenir une réaction complète et un marquage avec une bonne activité spécifique sont la concentration en peptide, le taux de chloramine-T et le temps de réaction. La réaction est réalisée en milieu 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 par Iodobeads® ont été étudiés et les paramètres de la réaction optimisés afin d'obtenir un produit avec une pureté radiochimique supérieure à 95%. Mais, dans ce cas, la quantité du peptide iodé qui reste collée sur l'agent oxydant est importante (30% du peptide). Pour cette raison, le marquage final a été réalisé par utilisation de chloramine-T en solution.

Le peptide iodé reste stable pendant 48 heures en milieu de marquage et à 4°C puisqu' aucune décomplexation par libération de l'iode-125 n'a été observée.

III-2-Etude pharmacocinétiques

In vivo chez la souris : La voie d'élimination principale du traceur est rénale, avec une très forte activité urinaire post-injection. On observe une désiodation rapide du peptide radioiodé. Trente minutes après l'administration du peptide P140, une fixation sur la thyroïde et les glandes salivaires est observée sur les images scintigraphiques. Ces fixations sont importantes 2 heures après l'injection.

En biodistribution, la plus forte activité est retrouvée dans les glandes salivaires. Le prélèvement de cet organe a été décidé afin d'identifier la source de la forte activité observée sur les images planaires. Les muqueuses de l'estomac sont également le lieu d'une forte activité en ¹²⁵I. La très faible activité cérébrale indique que le traceur ne passe pas la barrière hémato-encéphalique. L'activité circulante reste élevée. Au final, la forte activité observée dans la thyroïde et la muqueuse de l'estomac semble indiquer une désiodation du traceur *in vivo*, hypothèse confirmée par les profils CLHP sanguins et urinaires. Cependant, dans ce contexte, la très forte activité observée dans les glandes salivaires ne peut être entièrement attribuée à la fixation

d'¹²⁵I libre, puisque cet organe est décrit pour fixer l'iode de manière nettement inférieure à la thyroïde.

Les études analytiques de l'urine ne montrent que la présence d'iodure libre alors que dans le sang, 50% du peptide iodé est retrouvé.

Dans les études *in vitro* effectuées par l'équipe de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR 6021, CNRS Strasbourg, le peptide est rapidement clivé en position 148 dans le sérum de souris lupique (riche en protéase) et une faible quantité de FIEY¹⁵¹ circule dans le sang. Puisque notre marquage a été réalisé avec ce fragment, l'activité présente dans l'urine peut correspondre à FIEY¹⁵¹⁻¹²⁵I.

III-3-Etude biologique et efficacité préclinique

Cette étude est basée sur la protéine splicéosomale U1-70K, un antigène majeur reconnu par les anticorps de patients lupiques et de souris BW et MRL/ lpr, modèle murin de la maladie. Le peptide 131-151 de la protéine U1-70K et son homologue phosphorylé en position 140 (peptide 140) sont reconnus par les cellules T CD4+ de souris lupiques. L'administration à des souris pré-autoimmunes du peptide P140 retarde de manière très significative l'apparition de la maladie.

Plus récemment, la réactivité des lymphocytes T humain vis-à-vis du peptide a été étudiée. Il a été démontré que le peptide induit la sécrétion de cytokines régulatrices par les cellules issues du sang de patients lupiques, en absence de prolifération, suggérant que le peptide possède une activité immunorégulatrice. Depuis 2005, une série d'essais cliniques avec le peptide synthétisé, a été engagée. La phase de toxicologie et la phase I (chez des individus sains) sont terminées et la phase II (chez les patients lupiques) est actuellement en cours.

Conclusion Générale

I- Les marqueurs de la néoangiogenèse

Les études radiochimiques ont permis de valider la mise au point de marquage au technetium-99m et à l'indium-111 des dérivés RGD. Le marquage au technetium-99m réalisé par intermédiaire tricarbonyle, et à l'indium-111 en utilisant la macromolécule DOTA, sont simples et reproductibles. Tous les dérivés radiomarqués ont été obtenus avec une bonne pureté radiochimique, la stabilité du marquage *in vitro* pendant plusieurs heures est compatible avec une utilisation en routine.

Les études *in vitro* ont montré que le peptide RAFT-RGD technétié est peu hydrophile et proportionnellement fixé aux protéines plasmatiques ce qui explique *in vivo* la clairance sanguine faible ainsi que l'élimination hépatobiliaire du traceur.

In vivo, la captation tumorale du RAFT-RGD, marqué par différent émetteur gamma (technetium-99m ou indium-111), permet la visualisation de tumeurs $\alpha_v\beta_3$ positives.

In vivo RAFT-RGD-¹¹¹In présente plusieurs avantages par rapport à RAFT-RGD-^{99m}Tc. Une stabilité d'environ 24 heures mais surtout une clairance sanguine très rapide ; par contre la molécule a une très forte rétention rénale. Cette captation pourrait engendrer des insuffisances rénales importantes lors d'essais thérapeutiques par le même peptide marqué à un émetteur β^- (comme l'yttrium-90). Donc une modification de la structure chimique de RAFT-RGD-DOTA afin d'améliorer les propriétés pharmacologiques est nécessaire.

La préparation du traceur iodé de HARP111-124 est effectuée par substitution électrophile avec utilisation d'un réactif oxydant : Iodobeads[®]. La pureté radiochimique, ainsi que la stabilité *in vitro* et *in vivo* de peptide iodé, est supérieure à 90%. *In vivo* la clairance sanguine est très rapide mais la fixation du peptide dans la tumeur est faible et diminue au cours du temps. En imagerie, la tumeur n'a pu être identifiée. Le comportement biologique observé de HARP111-124 ne permet pas son utilisation pour la détection de l'angiogenèse tumorale.

II- Les marqueurs de la plaque d'athérome

Différents peptides, ont été utilisés. Le but de ce travail était de mettre au point le radiomarquage des ligand présumé de VCAM-1, molécule d'adhésion surexprimée précocément au niveau des plaques d'athérome vulnérables.

Le B2702 et ses dix dérivés, le BOT321 et le BOT337, ainsi que EP070946 ont été marqués au technétium-99m par la méthode simple et reproductible de synthon tricarbonyle. La préparation technétiée est stable sur plusieurs heures permettant la constitution de solutions multi-doses et donc à moindre coût.

Les études *in vitro* complétées par les études *in vivo* ont démontré que tous les peptides technétiés sont hydrophiles. La fixation aux protéines plasmatiques pour B2702 est supérieure à 50% ce qui explique *in vivo* la clairance sanguine faible ainsi que l'élimination hépatobiliaire du traceur qui n'est pas favorable à l'imagerie. La fixation protéique pour les autres peptides est plus faible que B2702, donc la clairance sanguine est beaucoup plus rapide.

La stabilité *in vivo* de tous les peptides pendant 3 heures (le temps nécessaire pour l'imagerie) est supérieure à 80%, donc la présence de TcO_4^- est faible.

En imagerie, une fixation a été observée pour B2702 et PB1 au niveau des plaques d'athérome qui expriment VCAM-1. La fixation de PB1 étant plus élevée que celle de B2702 les images obtenues avec PB1 sont de meilleure qualité.

La fixation du BOT321, BOT337 et EP070946 est trop faible pour être observé *in vivo* par l'imagerie.

Les études seront poursuivies avec les traceurs B2702 et PB1 technétiés. Puisque la clairance sanguine n'est pas très rapide et afin d'augmenter le rapport signal/sang, un marquage à l'indium 111 pourrait permettre de réaliser des images à des temps plus longs après l'élimination de l'activité sanguine, urinaire et hépato- biliaire.

III- Lupus érythémateux disséminé

Le peptide P140 a été marqué à l'iode-125 par substitution électrophile par la technique d'oxydation par chloramine-T. Le marquage a été réalisé avec une pureté radiochimique et une stabilité *in vitro* supérieure à 95%.

In vitro dans le sang humain le peptide P140 iodé se dégrade au cours du temps à partir de 1 heure d'incubation. La fixation protéique est faible, ce qui favorise une élimination urinaire.

Après injection chez les souris contrôle et lupique P140-¹²⁵I est rapidement dégradé *In vivo* à hauteur de 50%, probablement par désiodation ainsi que le suggèrent les fortes activité thyroïdienne et stomacale observées chez les animaux contrôles et lupiques. L'activité sanguine reste élevée jusqu'à 120 minutes après injection. L'élimination du traceur est très largement urinaire. Enfin, l'organe présentant la plus

forte activité en P140-¹²⁵I sont les glandes salivaires. Les études seront poursuivies avec la biodistribution et l'imagerie à des temps plus longs : à 24 heures après l'élimination de l'iodure libre présente dans le sang et l'urine.

Références
Bibliographiques

References Bibliographiques

Abrams MJ., Juweid M, tenKate CI, Schwartz DA, Hauser MM, Gaul FE, Fuccello AJ, Rubin RH, Strauss HW, Fischman AJ. 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):2022-8.

Ajjan RA. & Grant PJ. Role of clotting factors and fibrin structure in predisposition to atherothrombotic disease. Expert Rev. Cardiovasc. 2005 ; Ther 3, 1047–1059.

Alberto R., Schlibi R., Egli A., Schubiger APA. Novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-]$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. J. Am. Chem. Soc. 1998 ; 120:7987 –8.

Alberto R., Schlibi R., Schubiger AP. First application of fac- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ in bioorganometallic chemistry: design, structure, and in vitro affinity of a 5-HT1A receptor ligand labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$. J. Am. Chem. Soc. 1999; 121:6076– 7.

Alberto R., Ortner K., Wheatley N., Schlibi R., Schubiger AP. Synthesis and properties of boranocarbonate: a convenient in situ co source for the aqueous preparation of $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. J. Am. Chem. Soc. 2001 ; 123:3135– 6.

Amann A., Decristoforo C., Ott I., Wenger M., Bader D., Alberto R., Putz G. Surfactant protein B labeled with $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ retains biological activity in vitro. Nucl. Med. Biol. 2001; 28:243–50.

Ardisson V., Evaluation de nouveaux radiopharmaceutiques. Synthèse, évaluation, et biodistribution de nouveaux radioligands peptidiques de VCAM-1 et $\alpha_v\beta_3$. Thèse de doctorat Méthode de recherche sur l'environnement et la santé de l'Université Joseph Fourier. Grenoble I, 6 juillet 2006.

Arnaut MA. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$. Science 2001, 294, 339-345.

Bandoli G., Dolmella A., Porchea M., Refosco F., Tisato F. Structural overview of technetium compounds. Coord. Chem. Rev. 2001; 214:43– 90.

Banerjee SR., Maresca K., Francesconi L., Valliant J., Babich J., Zubieta J. New directions in the coordination chemistry of $^{99\text{m}}\text{Tc}$: a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. Nucl. Med. Biol. 2005; 32: 1-20.

Beer AJ., Haubner R., Goebel M., Luderschmidt S., Spilker M. E., Wester H-J., Weber W. A., Schwaiger M. "Biodistribution and pharmacokinetics of the $\alpha_v\beta_3$ -selective tracer ^{18}F -galacto-RGD in cancer patients." J Nucl Med 2005; 46(8): 1333-41.

Béhé M., Kluge G., Becker W., Gotthardt M., Behr TM. Use of polyglutamic acids to reduce uptake of radiometal-labeled minigastrin in the kidneys. J. Nucl. Med. 2005; 46:1012-5.

Behrendt D., Ganz P., Endothelial function. From vascular biology to clinical applications Am. J. Cardiol. 2002 ; 90, 40L-48L.

Bender J.R. Detection of injury-induced vascular remodeling by targeting activated alphavbeta3 integrin *in vivo*. Circulation. 2004 ; 110, 84-90.

Berliner JA. & Heinecke JW. The role of oxidised lipoproteins in atherogenesis. Free. Radic. Biol. Med. 1996 ; 20, 707-727.

Bernard-Pierrot I., Delbe J., Rouet V., Vigny M., Kerros ME., Caruelle D., Raulais D., Barritault D., Courty J., Milhiet PE. Dominant negative effectors of heparin affinity regulatory peptide (HARP) angiogenic and transforming activities. J. Biol. Chem. 2002 ; 277:32071-32077.

Blankenberg S., Barbaux S., Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. Atherosclerosis 2003 ;170 :191-203.

Bleeker-Rovers CP., Bredie SJ., van der Meer JW., Corstens FH., Oyen WJ. F-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in diagnosis and follow-up of patients with different types of vasculitis. Neth. J. Med. 2003 ; 61:323-9.

Blower PJ., Prakash S., The chemistry of rhenium in nuclear medicine, Perspect. Bioinorg. Chem. 1999; 4, 91-143.

Blum J., Hirsch Handmaker and Neal A. Rinne. Technetium Labeled Small Peptide Radiopharmaceuticals in the Identification of Lung Cancer Curr. Pharm. Des. 2002,1827-1836

Bolton AE. & Hunter WM, The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent. Application to the radioimmunoassay. Biochem. J.,1973; 133: 529-538

Bolton AE. Comparative methods for the radiolabeling of peptides. Methods. Enzymol. 1986; 124: 18-29.

Boturyn D., Coll JL., Garanger E., Favrot MC., Dumy P. Template Assembled Cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. J. Am. Chem. Soc. 2004 ; 126: 5730-9.

Bouck N., STELLMACH V., HSU S.C. How tumors become angiogenic. Adv.Cancer Res., 1996 ; 69 : 135-174.

Breeman WP., van Hagen PM., Kwekkeboom DJ.,Visser TJ., and Krenning EP. Somatostatin receptor scintigraphy using [¹¹¹In-DTPA]RC 160 in humans: a comparison with [¹¹¹In-DTPA]octreotide. Eur. J. Nucl. Med. 1998 ; 25, 182-186.

Brinkley M. A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. Bioconjug Chem. 1992 ; 3(1):2-13.

Brooks PC.; Montgomery. A MP., Rosenfeld M., Reisfeld R., Hu TH., Klier G., Cheresh DA. Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. Cell. 1994 ; 79, 1157-1164.

Burke PA., DeNardo SJ. Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2001 ; 39, 155-171.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nat. Med. 2003; 9(6): 653-660.

Casscells W., Naghavi M. & Willerson JT. Vulnerable atherosclerotic plaque: a multifocal disease. Circulation. 2003 ; 107, 2072-2075.

Caveliers V., Goodbody AE., Tran LL., Peers SH., Thornback JR., Bossuyt A. Evaluation of ^{99m}Tc -RP128 as a potential inflammation imaging agent ; human dosimetry and first clinical results. J. Nucl. Med. 2001 ; 42:154- 61.

Cahbannes E., BERNARDINI S., WALLERAND H, BITTARD H. L'angiogenèse dans les tumeurs vésicales : indicateur pronostique et cible thérapeutique. Progrès en Urologie 2001; 11: 417-427

Chapman MJ., From pathophysiology to targeted therapy for atherothrombosis: a role for the combination of statin and aspirin in secondary prevention., Pharmacol. Ther. 2007 ; 113(1):184-96.

Chen J., Strand SE., Sjögren HO. Optimization of radioiodination and biotinylation of monoclonal antibody chimeric BR96: an indirect labeling using N-succinimidyl-3-(tri-n-butylstannyl)benzoate conjugate. Cancer. Biother. Radiopharm. 1996 ; 11(3):217-26.

Chen X⁽¹⁾, Park R., Shahinian AH., Bading JR., Conti PS. Pharmacokinetics and tumor retention of ^{125}I -labeled RGD peptide are improved by PEGylation. Nucl. Med. Biol. 2004 ; 31, 11-19.

Chen X⁽²⁾, Park R., Shahinian AH., Tohme M., Khankaldyyan V., Bozorgzadeh MH., Bading JR., Moats R., Laug WE., Conti PS. ^{18}F -labeled RGD peptide: initial evaluation for imaging brain tumor angiogenesis. Nucl. Med. Biol. 2004 ; 31, 179-189.

Chen X., Sievers E., Hou Y., Park R., Tohme M., Bart R., Bremner R., Bading JR., Conti PS. Integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted imaging of lung cancer. Neoplasia. 2005 ; 7, 271-279.

Chen X. Multimodality imaging of tumor integrin $\alpha_v\beta_3$ expression. Mini-Rev. Med. Chem. 2006 ; 6, 227-234.

Choudhuri R., Zhang HT., Donnini S., Ziche M., Bicknell R. An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. Cancer. Res. 1997 ; 1;57(9):1814-9.

Ciavolella M., Tavolaro R., Taurino M., Di Loreto M., Greco C., Sbarigia E. Immunoscintigraphy of atherosclerotic uncomplicated lesions in vivo with a monoclonal antibody against D-dimers of insoluble fibrin. Atherosclerosis. 1999 ; 143:171-5.

Clarke ET., Martell AE. Stabilities of the Fe(III), Ga(III) and In(III) chelates of N,N',N"-triazacyclononanetriacetic acid. Inorg. Chim. Acta. 1991 ; 181, 273-280.

Clarke ET., Martell AE. Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13- and 14-membered tetraazamacrocycles. Inorg. Chim. Acta. 1992 ; 190, 37-46.

Coenen H.H., Mertens J., Mazière B. Radioionidation reactions for pharmaceuticals, compendium for effective synthesis strategies. Cost. Netherlands : Springer 2006.

Comet M. et Vidal M. Radiopharmaceutiques, chimie des radiotraceurs et application biologiques. 1998, P 144-147.

Corti R., Hutter R., Badimon JJ. & Fuster V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. J. Thromb. Thrombolysis. 2004 ; 17, 35-44.

Cotsyfakis C., Varvarigou A.D., Papadopoulos M., Stathaki S., Stassinopoulou C.I., Chiotellis E., Indium-111-labelled cationic complexes of aminothiols: structure-activity correlation, Eur. J. Nucl. Med. 1993, 302- 307.

Courty J., Dauchel MC., Caruelle D., Perderiset M., Barritault D. Mitogenic properties of a new endothelial cell growth factor related to pleiotrophin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991 ; 180 :145-51.

Courty J. Développement d'une nouvelle stratégie anti-cancéreuse basée sur l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité de HARP (concept et pharmacodistribution par imagerie nucléaire). Projet de recherche de Laboratoire CRRET, université Paris XII, 2006 (travaux non publiés).

Cybulsky MI., Iiyama K., Li H., Zhu S., Chen M., Iiyama M., Davis V., Gutierrez-Ramos JC., Connelly PW., Milstone DS., A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. J. Clin. Invest. 2001 ; 107,1255-62

Dams E., Oyen WJG., Boerman OC., Storm G., Laverman P., Koenders EB. Technetium-99m labeled liposomes to image experimental colitis in rabbits: comparison with technetium-99m- HMPAO-granulocytes and technetium-99m-HYNIC-IgG. J. Nucl. Med. 1998 ; 39:2172- 78.

Davies JR., Rudd JH., Weissberg PL. Molecular and metabolic imaging of atherosclerosis. J. Nucl. Med. 2004 ; 45,1898-1907.

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: 3033-040

Decristoforo C., Mather SJ., Cholewinski W., Donnemiller E., Riccabone G., Moncayo R. ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC: a new ^{99m}Tc -labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor- positive tumors: first clinical results and inpatient comparison with ^{111}In -labelled octreotide derivatives. Eur. J. Nucl. Med. 2000; 27: 1318–25.

DeJong M., Bakker WH., Krenning EP., Breeman WA. P., van der Pluijm ME., Bernard BF., Visser TJ., Jermann E., Behe M., Powell P., and Maecke HR.. Yttrium-90 and indium-111 labeling, receptor binding and biodistribution of [DOTA, D-Phe1,Tyr3]octreotide, a promising somatostatin analogue for radionuclide therapy. Eur. J. Nucl. Med. 1997 ; 24, 368-371

DeJong M., Barone R., Krenning E., Bernard B., Melis M, Visser T., Gekle M., Willnow T., Walrand S., Jamar F., Pauwels S. Megalin Is Essential for Renal Proximal Tubule Reabsorption of ^{111}In -DTPA-Octreotide. J Nucl Med 2005 ; 46: 1696-1700

Delbe J., Vacherot F., Laaroubi K., Barritault D., Courty J. Effect of heparin on bovine epithelial lens cell proliferation induced by heparin affin regulatory peptide. J. Cell. Physiol. 1995, 164:47-54.

Dijkgraaf I., Kruijtzter JA., Liu S., Soede AC., Oyen W.J., Corstens FH., Liskamp RM., Boerman OC. Improved targeting of the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin by multimerisation of RGD peptides. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2007 ; 34(2):267-73.

Dobrucki LW., Sinusas AJ. cardiovascular molecular imaging. Semin. Nucl. Med. 2005 ; 35 :73-81

Egli A., Alberto R., Tannahill L., Schibli R., Abram U., Schaffland A. Organometallic ^{99m}Tc -aquation labels peptide to an unprecedented high specific activity. J. Nucl. Med. 1999; 40:1913–7.

Feng X., Pak RH., Kroger LA., Moran JK., DeNardo DG., Meares CF., DeNardo GL., DeNardo SJ. New anti-Cu-TETA and anti-Y-DOTA monoclonal antibodies for potential use in the pre-targeted delivery of radiopharmaceuticals to tumor. Hybridoma. 1998, 17,125-132

Fichna J., Janecka A. synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging. Bioconjugat. chem. 2003 ; 14,3-17

Folkman J., Merler E., Abernathy C., Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J. Exp. Med. 1971 ; 133 : 275-288.

Folkman J., shing Y. angiogenesis, J. Biol. Chem. 1992 ; 267, 10931- 934

Folkman J. : Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid and other disease. Nat. Med.1995 ; 1, 27-31.

Fournel S., Muller S. Synthetic peptides in the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Curr. Protein. Pept. Sci. 2003 ; 4:261–74.

Fritzberg AR., Kasina S., Eshima D., Johnson DL. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG3 as a hippuran replacement. J. Nucl. Med. 1986 ; 27:111 – 6.

Fuster V., Fallon JT, Nemerson Y. Coronary thrombosis. Lancet. 1996 ; 348(suppl 1): 7-10.

Garanger E., Conception, Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Systèmes de Guidage et de Vectorisation pour la Cancérologie. Thèse présentée à l'Université Joseph Fourier, Grenoble I, 25 Juin 2005.

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

Glaser M., Collingridge DR, Aboagye EO, Bouchier-Hayes L, Hutchinson OC, Martin SJ, Price P, Brady F, Luthra SK. Iodine-124 labelled annexin-V as a potential radiotracer to study apoptosis using positron emission tomography. Appl. Radiat. Isot. 2003 ; 58(1):55-62.

Gotthardt M., van Eerd-Vismale J., Oyen WJ., de Jong M., Zhang H., Rolleman E., Maecke HR., Béhé M., Boerman O. Indication for different mechanisms of kidney uptake of radiolabeled peptides. J. Nucl. Med. 2007 ; 48(4):596-601.

Gottschalk KE., Kessler H. The structures of integrins and integrin-ligand complexes: Implications for drug design and signal transduction. Angew. Chem., Int. Ed. 2002, 41,3767-3774.

Hafeli U., Yu J., Farudi F., Yuhua L., Tapolsky G. Radiolabeling of magnetic targeted carriers (MTC) with indium-111. Nucl. Med. Biol. 2003; 30: 761-769.

Hamma-Kourbali Y., Bernard-Pierrot I., Heroult M., Dalle S., Caruelle D., Milhiet PE., Fernig DG., Delbé J., Courty J. Inhibition of the mitogenic, angiogenic and tumorigenic activities of pleiotrophin by a synthetic peptide corresponding to its C-thrombospondin repeat-I domain. J. Cell. Physiol. 2008 ; 214, 250-9

Hampton BS., Marshak DR. and Burgess WH. Structural and functional characterization of full-length heparin-binding growth associated molecule. Mol. Biol. Cell. 1992 ; 3, 85-90

Hanahan D., Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell. 1996 ; 86 : 353-364.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. New. Engl. J. Med. 2005 ; 352, 1185–1195.

Hardoff R., Zanzonico P., Braegelmann F., Herrold EM., Lees RS., Lees AM., Dean RT et al. Localization of (99m)Tc-Labeled ApoB Synthetic Peptide in Arterial Lesions of an Experimental Model of Spontaneous Atherosclerosis. Am J Ther. 1995; (2),88-99.

Harris TD., Kalogeropoulos S., Nguyen T., Liu S., Bartis J., Ellars CE., Edwards D S., Onthinks D., Yalamanchili P., Robinson SP., Lazewatsky J., Barrett JA. Design, synthesis and evaluation of radiolabeled integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists for tumor imaging and radiotherapy. Cancer. Biother. Radiopharm. 2003 ; 18, 627-641.

Harris WR., Chen Y., Wein K. Equilibrium Constants for the Binding of Indium(III) to Human Serum Transferrin. inorg. Chem. 1994 ; 33,4991 – 4998

Harris W.R., Messori L., A comparative study of aluminum(III), gallium(III), indium(III), and thallium(III) binding to human serum transferrin, Coord. Chem. Rev. 2002 ; 228, 237-262

Haubner R., Finsinger D., 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. Ed. Engl. 1997 ; 36, 1374- 1389.

Haubner R., Wester HJ., 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

Haubner R. ⁽¹⁾, Wester HJ., Burkhart F., Senekowitsch-Schmidtke R., Weber W., Goodman SL., Kessler H., Schwaiger M. Glycolated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics. J. Nucl. Med. 2001, 42, 326-336.

Haubner R. ⁽²⁾; Wester, HJ., Weber WA., Mang C., Ziegler SI., Goodman SL., Senekowitsch-Schmidtke R., Kessler, H., Schwaiger M. Noninvasive imaging of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression using ¹⁸F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. Cancer. Res. 2001 ; 61, 1781-1785.

Haubner R., Weber W A., Beer A., Vabuliene E., Reim D., Sarbia M. noninvasive visualization of the activated $\alpha_v\beta_3$ Integrin in Cancer Patients by Positron Emission Tomography and [¹⁸F]Galacto-RGD, PLoS MEDICINE 2005, (2) , 70

Hayman EG., Pierschbacher M. D., Ruoslahti E. "Detachment of cells from culture substrate by soluble fibronectin peptides." J Cell Biol 1985, 100(6): 1948-1954.

Heeg MJ., Jurisson SS. The Role of Inorganic Chemistry in the Development of Radiometal Agents for Cancer Therapy. Acc. Chem. Res. 1999 ; 32, 1053-1060.

Heroult M., Bernard-Pierrot I., Delbé J., Hamma-Kourbali Y., Katsoris P., Papadimitriou E., Plouet J. and Courty J. Heparin affin regulatory peptide binds to vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. Oncogene 2004, 23, 1745-53.

Hnatowich DJ., Mardirossen A., Ruscowski M., Fargarasi M., Virji F., Winnard Jr P. Directly and indirectly technetium-99m-labeled antibodies — a comparison of in vitro and animal in vivo properties. Nucl. Med. Chem. 1993, 34,109– 19.

Hoepping A., Babich J., Zubieta J., Johnson KM., Machill S., Kozikowski AP. Synthesis and biological evaluation of two novel DAT-binding technetium complexes containing a piperidine based analogue of cocaine. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999 ; 9:3211 – 4.

Hoffman RW., T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Clin. Immunol. 2004 ; 113, 4–13.

Huo Y., Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. Acta Physiol Scand. 2001;173(1):35-43.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 2002, 110:673-687.

Iuliano L., Signore A., Vallabajosula S., Colavita AR., Camastra C., Ronga G., et al. Preparation and biodistribution of 99m-technetium labelled oxidized LDL in man. Atherosclerosis. 1996 ; 126:131-41.

James JA., Harley JB. B-cell epitope spreading in auto-immunity. Immunol. Rev. 1998 ; 164:185–200.

Janssen ML., Oyen WJ., Dijkgraaf I., Massuger LF.J., Frielink C., Edwards DS., Rajopadyhe M., Corstenand F., Boerman OC., Tumor targeting with radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin binding peptides in a nude mouse model. Cancer. Res. 2002 ; 62, 6146-51.

Jin H., Varner, J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. Br. J. Cancer. 2004 ; 90, 561-565.

Jones-Wilson TM., Motekaitis RJ., Sun Y., Anderson CJ., Martell AE., Welch MJ. New hydroxybenzyl and hydroxypyridylmethyl substituted triazacyclononane ligands for use with gallium (III) and indium (III). Nucl. Med. Biol. 1995 ; 22, 859-868.

Kaliyaperumal A., Michaels MA., Datta SK. Antigen-specific therapy of murine lupus nephritis using nucleosomal peptides: tolerance spreading impairs pathogenic function of auto-immune T and B cells. J. Immunol. 1999 ; 162:5775–83.

Kang HK., Michaels MA., Berner BR., Datta SK. Very low-dose tolerance with nucleosomal peptides controls lupus and induces potent regulatory T cell subsets. J. Immunol. 2005; 174:3247–55.

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.

Karonen SL. Developments in techniques for radioiodination of peptide hormones and other proteins. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 1990; 201:135-8.

Keire DA. and Kobayashi M. NMR studies of the metal-loading kinetics and acid-base chemistry of DOTA and butylamide-DOTA. Bioconjugate. Chem. 1999 ; 10, 454-463.

Keire DA., Jang YH., Li L., Dasgupta S., Goddard WA. and Shively JE. Chelators for radioimmunotherapy: I. NMR and ab initio calculation studies on 1,4,7,10-tetra(carboxyethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DO4Pr) and 1,4,7-tris(carboxymethyl)-10-(carboxyethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DO3A1Pr). Inorg. Chem. 2001 ; 40, 4310- 4318.

Kelly KA., Allport JR., Tsourkas A., Shinde-Patil VR., Josephson L., Weissleder R. Detection of vascular adhesion molecule-1 expression using a novel multimodal nanoparticle Circ. Res. 2005 ; 96(3):327-36.

Kietselaer BL., Reutelingsperger CP., Heidendal GA., Daemen MJ., Mess WH., Hofstra L. Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis. N. Engl. J. Med. 2004 ; 350:1472-3.

Kokubo T., Uchida H., Choi ET. Integrin $\alpha_v\beta_3$ as a target in the prevention of neointimal hyperplasia J. vascular. surgery. 2007 ; 45(6) suppl1, 33-38.

Kolodgie FD., Petrov A., Virmani R., Narula N., Verjans JW., Weber DK. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque. Circulation. 2003; 108(25):3134-9.

Kopka K., Breyholz HJ., Wagner S., Law MP., Riemann B., Schroer S. Synthesis and preliminary biological evaluation of new radioiodinated MMP inhibitors for imaging MMP activity *in vivo*. Nucl. Med. Biol. 2004; 31:257-67.

Kumar CC., Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor induced angiogenesis. Curr. Drug. Targets. 2003 ; 4:123–131.

Kung HF., Liu BL., Mankoff D., Kung MP., Billings JJ., Francesconi L., Alavi A. A new myocardial imaging agent: synthesis, characterization, and biodistribution of gallium-68-BAT-TECH. J. Nucl. Med. 1990,31, 1635-40.

Kwekkeboom DJ., Bakker WH., Kooj PP.M., Erion J., Srinivasan A., Reubi JC. and Krenning EP. Cholecystokinin receptor imaging using an octapeptide DTPA-CCK analogue in patients with medullary thyroid carcinoma., Eur. J. Nucl. Med. 2000 ; 27, 1312-17.

Laaroubi K., Delbe J., Vacherot F., Desgranges P., Tardieu M., Jaye M., Barritault D. and Courty J. Mitogenic and in vitro angiogenic activity of human recombinant heparin affinal regulatory peptide. Growth. Factors. 1994 ; 10:89-98.

Lau EY., Lightstone FC., Colvin ME. Environmental Effects on the Structure of Metal Ion-DOTA Complexes: An ab Initio Study of Radiopharmaceutical Metals Inorganic Chemistry, 2006, 45, 9225-9232

Leal J., Luengo-Fernandez R., Gray A., Petersen S. & Rayner M. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. Eur. Heart. J. 2006 ; 27,1610–1619.

Leonard JP., Novotnik DP., Nierinckx RD. Technetium-99m-d,1-HMPAO: a new radiopharmaceutical for imaging regional brain perfusion using SPECT- a comparison with iodine-123 HIPDM. J. Nucl. Med. 1986; 27:1819-23.

Libby, P. & Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. Circulation. 2005 ; 111, 3481–88.

Ling X., Tamaki T., Xiao Y., Kamangar S., Clayberger C., Lewis DB., Krensky AM. An immunosuppressive and anti-inflammatory HLA class I-derived peptide binds vascular cell adhesion molecule-1., Transplantation. 2000 ; 70 :662-7.

Lister-James J., Knight LC, Mauer AH, Bush LR, Moyer BR, Dean RT. Thrombus imaging with a technetium-99m-labeled, activated platelet receptor-binding peptide. J. Nucl. Med. 1996; 37:775–81.

Liu S., Edwards DS., Harris AR. A novel ternary ligand system for ^{99m}Tc-labeling of hydrazino nicotinamide-modified biologically active molecules using imine-containing heterocycles as coligands. Bioconjug. Chem. 1998; 9:583–95.

Liu S., Edwards DS. Synthesis and Characterization of Two ¹¹¹In-Labeled DTPA-Peptide Conjugates. Bioconjug. Chem. 2001 ;12, 630-634.

Liu S.⁽¹⁾, Edwards DS. Fundamentals of receptor-based diagnostic metalloradiopharmaceuticals. Top. Curr. Chem. 2002 ; 222, 259- 278.

Liu S.⁽²⁾, Harris AR., Williams NE., Edwards DS. ^{99m}Tc-labeling of a hydrazinonicotinamide-conjugated LTB4 receptor antagonist useful for imaging infection and inflammation. Bioconjug. Chem. 2002; 13: 881– 6.

Liu S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals Chem. Soc. Rev. 2004 ; 33,445-461

Liu S., Robinson SP., Edwards DS., Radiolabeled integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists as radiopharmaceuticals for tumor radiotherapy. Top. Curr. Chem. 2005, 252, 117-153.

Liu S., Radiolabeled Multimeric Cyclic RGD Peptides as Integrin $\alpha_v\beta_3$ Targeted Radiotracers for Tumor Imaging. molecular pharmaceuticals. 2006 ; 3 : 472-487.

Lusis, A J. Atherosclerosis, Nature. 2000 ; 407, 233–240.

Ma R., Welch MJ., Reibenspies J. and Martell AE. Stability of metal ion complexes of 1,4,7-tris(2-mercaptoethyl)-1,4,7-triazacyclonane (TACN-TM) and molecular structure of In(C₁₂H₂₄N₃S₃). Inorg. Chim. Acta. 1995 ; 236,75-82

Mallat Z. & Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. Br. J. Pharmacol. 2000 ; 130, 947–962.

Mallat Z., Tedgui A., current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. Circ. Res. 2001; 88 ; 998-1003.

Mark W., Konijnenberg, Is the Renal Dosimetry for [90Y-DOTA0, Tyr3]Octreotide Accurate Enough to Predict Thresholds for Individual Patients? Cancer. Biother. Radiopharm. 2003 ; 18, 619-625.

Melis M., Krenning EP, Bernard BF, Barone R, Visser TJ, Dejong M, Localisation and metabolism of retention of radiolabeled somatostatin analogs. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2005; 32 1136-1143

Merenmies J. and Rauvala H. Molecular cloning of the 18-kDa growth associated protein of developing brain. J. Biol. Chem. 1990 ; 265:16721-4.

Mitchel J., Waters D., Lai T., White M., Alberghini T., Salloum A., et al. Identification of coronary thrombus with a IIb/IIIa platelet inhibitor radiopharmaceutical, technetium-99m DMP-444: a canine model. Circulation. 2000; 101:1643-6.

Mitjans F., Meyer T., Fittschen C., Goodman S., Jonczyk A., Marshall JF., Reyes G., Piulats J. In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alphav integrins. Int. J. Cancer. 2000; 87, 716-23.

Monneaux F., Briand JP., Muller SB. T cell immune response to small nuclear ribonucleoprotein particles in lupus mice: autoreactive CD4(+) T cells recognize a T cell epitope located within the RNP80 motif of the 70K protein. Eur. J. Immunol. 2000; 30: 2191–2200.

Monneaux F.⁽¹⁾, Dumortier H., Steiner G., Briand JP., Muller S. Murine models of systemic lupus erythematosus: B and T cell responses to spliceosomal ribonucleoproteins in MRL/Fas(lpr) and (NZB × NZW)F(1) lupus mice. Int. Immunol. 2001; 13:1155–63.

Monneaux F.⁽²⁾, Muller S. Key sequences involved in the spreading of the systemic auto-immune response to spliceosomal proteins. Scand. J. Immunol. 2001; 54 : 45–54.

Monneaux F., Muller S. Epitope spreading in systemic lupus erythematosus: identification of triggering peptide sequences. Arthritis. Rheum. 2002; 46:1430–8.

Monneaux F., Lozano JM, Patarroyo ME, Briand JP, Muller S. T cell recognition and therapeutic effect of a phosphorylated synthetic peptide of the 70K snRNP protein administered in MR/lpr mice. Eur. J. Immunol. 2003; 33:287–96.

Monneaux F., Parietti V., Briand JP., Muller S. Intramolecular T cell spreading in unprimed MRL/lpr mice: importance of the U1-70k protein sequence 131–151. Arthritis. Rheum. 2004; 50:3232–8.

Monneaux F., Hoebeke J., Sordet C., Nonn C., Briand JP., Maillère B., et al. Selective modulation of CD4+ T cells from lupus patients by a promiscuous, protective peptide analog. J. Immunol. 2005; 175:5839–47.

Monneaux F., Muller S. / La Revue de médecine interne 2007 ; 28, 725–728

Montgomery AM., Reisfeld RA., Cheresh DA. Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1994 ; 91, 8856-8860.

Moriwaki H., Matsumoto M., Handa N., Hashikawa K., Hori M., Nishimura T. Effect of E5510, a novel antiplatelet agent, on platelet deposition in atherothrombotic lesions: evaluation by ¹¹¹In platelet scintigraphy. Nucl. Med. Commun. 2000; 21:1051-8.

Moriwaki H., Matsumoto M., Handa N., Isaka Y., Hashikawa K., Oku N. Functional and anatomic evaluation of carotid atherothrombosis. A combined study of indium 111 platelet scintigraphy and B-mode ultrasonography. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1995; 15:2234-40.

Motekaitis RJ., Martell AE., Welch MJ. Stabilities of trivalent metal complexes of phenolic ligands related to N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid (HBED). Inorg. Chem. 1990 ; 29, 1463-67.

Motekaitis RJ., Sun Y, Martell AE., Welch MJ. Stabilities of gallium(III), iron(III), and indium(III) chelates of hydroxyaromatic ligands with different overall charges. Inorg. Chem. 1991, 30 2737-2740.

Mousa SA. Cell adhesion molecules and extracellular matrix proteins: potential therapeutic applications , Drugs Future. 1998 ; 23, 51-60

Muramatsu T., Midkine (MK): a retinoic acid-responsive, heparin-binding growth factor in relationship with differentiation, development, cancer and neural function. Seikagaku 1993,1494-1504.

Muto Y., Pomeranz Krummel D., Oubridge C., Hernandez H., Robinson CV., Neuhaus D., The structure and biochemical properties of the human spliceosomal protein U1. Nagai K. J Mol Biol. 2004 ; 341(1):185-98.

Naghavi M., Libby P., Falk E., Casscells SW., Litovosky S., Rumberger J. From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies: part I. Circulation. 2003 ; 108, 1664–1672.

Nahrendorf M., Jaffer FA., Kelly KA., Sosnovik DE., Aikawa E., Libby P., Weissleder R. Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. Circulation 2006 ; 114, 1504-11

Narula J., Strauss HW., Imaging of unstable atherosclerotic lesions, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2005 ; 32(1),1-5.

Nissen SE. Who is at risk for atherosclerotic disease? Lessons from intravascular ultrasound. Am. J. Med. 2002 ; 112(suppl 8A), 27S–33S.

Okrój M., Dobrzańska-Paprocka Z., Rolka K., Bigda J. In vitro and in vivo analyses of the biological activity of RGD peptides towards Ab Bomirski melanoma. Cell. Mol. Biol. Lett. 2003 ; 8(4):873-84.

OMS. Rapport annuel 2003 chapitres 1&6, centre de surveillance des maladies cardiovasculaires pour l'OMS. <http://www.who.int>

Onthank DC., Liu S., Silva PJ., Barrett JA., Harris TD., Simon P., Robinson SP., Edwards DS. ^{90}Y and ^{111}In complexes of A DOTA-conjugated integrin $\alpha_v\beta_3$ receptor antagonist: different but biologically equivalent. Bioconjug. Chem. 2004 ; 15, 235-241.

Otte A., Jermann E., Behe M., Goetze M., Bucher HC., Roser HW., Heppeler A., Mueller-Brand J., and Maecke HR. DOTATOC: a powerful new tool for receptor mediated radionuclide therapy. Eur. J. Nucl. Med. 1997 ; 24, 792-795.

Otte A., Mueller-Brand J., Dellas S., Nitzsche EU., Herrmann R., and Maecke HR. Yttrium-90-labeled somatostatin-analogue for cancer treatment. Lancet. 1998 ; 351,417-418.

Pak JK., Benny P., Spingler B., Ortner K., Alberto R. N(epsilon) functionalization of metal and organic protected l-histidine for a highly efficient, direct labeling of biomolecules with $[\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. Chem-Eur. J. 2003; 9:2053– 61.

Pearson DA & Lister-James J., McBride WJ, Wilson DM, Martel LJ, Civitello ER, Taylor JE, Moyer BR, Dean RT. Somatostatin receptor-binding peptides labeled with technetium-99m: chemistry and initial biological studies. J Med Chem. 1996 ; 39(7):1361-71.

Petersen S., Peto V., Rayner M., Leal J., Luengo-Fernandez R., & Gray A. European Cardiovascular Disease Statistics British Heart Foundation website. University of Oxford. www.heartstats.org 2005 edition.

Poethko T., Thumshirn G, Hersel U., Rau F., Haubner R., Schwaiger M., Kessler H., Wester HJ. Improved tumor uptake, tumor retention and tumor/background ratios of pegylated RGD multimers. J. Nucl. Med. 2003, 44, 46.

Prats E., Aisa F., Abos MD., Villavieja L., Garcia-Lopez F., Asenjo MJ. Mammography and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI scintimammography in suspected breast cancer. J. Nucl. Med. 1999; 40:296 – 301

Presta M., Dell'Era P., Mitola S., Moroni E., Ronca R., Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. Cytokine. Growth. Factor. Rev. 2005 ; 16,159-178.

Purohit A., Liu S., Casebier D. and Edwards DS., Phosphine-containing HYNIC derivatives as potential bifunctional chelators for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeling of small biomolecules Bioconjug. Chem. 2003 ; 14, 720-7.

Purohit A., Liu S., Ellars CE., Casebier D., Haber SB. and Edwards DS., Pyridine-containing 6-hydrazinonicotinamide derivatives as potential bifunctional chelators for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeling of small biomolecules Bioconjug. Chem., 2004 ; 15, 728–737.

Qiao RL., Yan WH., Lum H., Malik AB. Arg-Gly-Asp peptide increases endothelial hydraulic conductivity: comparison with thrombin response. Am. J. Physiol. 1995 ; 269, 110-117.

Rajopadhye M., Harris AR., Nguyen HM., Overoye KL., Bartis J., Liu S., Edwards DS., Barrett JA, RP593, a ^{99m}Tc-labeled $\alpha v \beta 3$ antagonist, rapidly detects spontaneous tumors in mice and dogs. 47th Annual Meeting of SNM, St. Louis, Missouri. J. Nucl. Med. 2000 ; 41, 34P.

Ram S., Buchsbaum DJ. A peptide-based bifunctional chelating agent for ^{99m}Tc- and ¹⁸⁶Re-labeling of monoclonal antibodies. Cancer. 1994; 73(3 Suppl):769– 73.

Rauvala H., An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. EMBO J. 1989 ; 8, 2933.

Reichert DE., Lewis Jason S. and Anderson Carolyn J. Metal complexes as diagnostic tools coord. Chem. Rev.1999 ; 184, 3–66

Reubi, JC., Waser, B., Schaer, J. C., Laederach, U., Erion, J., Srinivasan, A., Schmidt, M. A., and Bugaj, J. E. Unsulfated DTPA- and DOTA-CCK analogues as specific highaffinity ligands for CCK-B receptor- expressing human and rat tissues *in vitro* and *in vivo*. Eur. J. Nucl. Med. 1998 ; 25, 481-490.

Rini BI., Small EJ., Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma, J. Clin. Oncol. 2005 ; 23, 1028–1043

Risau W., Mechanisms of angiogenesis, Nature 1997 ; 386, 671-674

Routsias JG., Tzioufas AG., Moutsopoulos HM. The clinical value of intracellular autoantigens B-cell epitopes in systemic rheumatic diseases. Clin. Chim. Acta. 2004; 340:1–25.

Ruegg C., Mariotti A., Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis, Cell. Mol. Life. Sci. 2003 ; 60, 1135–1157.

Rusckowski M., Qu T., Gupta S., Ley A., Hnatowich DJ. A comparison in monkeys of ^{99m}Tc labeled to a peptide by 4 methods. J. Nucl. Med. 2001 ; 42:1870–7.

Russell J. O'Donoghue JA., Finn R., Kozirowski J., Ruan S., Humm JL., Ling CC. Iodination of annexin V for imaging apoptosis. J. Nucl. Med. 2002 ; 43, 671-7.

Sadeghi MM., Krassilnikova S., Zhang J., Gharaei AA., Fassaei HR., Esmailzadeh L., Kooshkabadi A., Edwards S., Yalamanchili P., Harris TD., Sinusas AJ., Zaret BL. Detection of injury-induced vascular remodeling by targeting activated $\alpha v \beta 3$ integrin *in vivo*. Circulation. 2004 ; 110, 84-90.

Safavy A., Smith DC., Bazooband A., and Buchsbaum DJ. synthesis of a new diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) bifunctional chelating agent. Bioconjug. Chem. 2002 ; 13, 317-326.

Salven P., Lymboussaki A., Heikkila P., Jaaskela-Saari H., Enholm B., Aase K., von Euler G., Eriksson U., Alitalo K., and Joensuu H. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. Am. J. Pathol. 1998 ; 153, 103–108.

Sancey L., Evaluation d'un radioligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, le Raft RGD, par l'imagerie moléculaire de l'angiogénèse tumorale. Thèse de doctorat Génie Biologique et Médical de l'Université Joseph Fourier. Grenoble I, 1 juin 2006.

Sancey L., Ardisson V., Riou LM., Ahmadi M., Marti-Batlle D., Boturyn D., Dumy P., Fagret D., Ghezzi C., Vuillez JP. *In vivo* imaging of tumour angiogenesis in mice with the $\alpha_v\beta_3$ integrin-targeted tracer ^{99m}Tc -RAFT-RGD. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2007; 34, 2037-47.

Satpati D., Bapat K., Mukherjee A., Banerjee Sh., Kothari K., Venkatesh M. Preparation and bioevaluation of ^{99m}Tc -Carbonyl complex of 5-hydroxy tryptamine derivative. Appl. Radiat. Isot. 2006; 64: 888-892.

Schafers M., Riemann B, Kopka K, Breyholz HJ, Wagner S, Schafers KP, et al. Scintigraphic imaging of matrix metalloproteinase activity in the arterial wall *in vivo*. Circulation. 2004; 109: 2554-9.

Schibli R., Katti KV., Higginbotham C., Volkert WA., Alberto R. *In vitro* and *in vivo* evaluation of bidentate, Water-soluble phosphine ligands as anchor groups for the organometallic *fac*-[Tc(CO)₃]⁺-core. Nucl. Med. Biol. 1999 ;26(6):711– 716.

Schibli R., LaBella R., Alberto R., Garcia-Garayoa L., Ortner K., Abram U., et al. 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; 11:345– 51.

Schibli R., Schwartzbach R., Alberto R., Ortner K., Schmalte H., Dumas C., et al. Steps toward high specific activity labeling of biomolecules for therapeutic application: preparation of precursor [$^{188}\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$]⁺ and synthesis of tailor-made bifunctional ligand systems. Bioconjug. Chem. 2002 ;13:750– 6.

Schwartz DA., Abrams MJ., Hauser MM., Gaul FE., Larsen SK., Rauh D., et al. Preparation of hydrazino-modified proteins and their use of the synthesis of technetium-99m-protein conjugates. Bioconjug. Chem. 1991; 2:333–6.

Schwochau K. Technetium radiopharmaceuticals: fundamentals, synthesis, structure and development. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1994; 33:2258– 67.

Shimaoka M., Springer TA. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. Nat. Rev. Drug. Discov. 2003 ; 2:703-716.

Signore A., Annovazzi A., Chianelli M., Corsetti F., Van de Wiele C., Watherhouse RN. Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy. Eur J Nucl Med. 2001, 28(10):1555-65.

Sivolapenko GB., Skarlos D., Pectasides D., Stathopoulou E., Milonakis A., Sirmalis G., Stuttle A., Courtenay-Luck NS., Konstantinides K., Epenetos AA. Imaging of metastatic melanoma utilizing a technetium-99m labeled RGD-containing synthetic peptide. Eur. J. Nucl. Med. 1998, 25,1383-1389.

Smith JW. Cilengitide Merck. Curr. Opin. Investig. Drugs. 2003 ; 4, 741-745.

Soulie P., Heroult M., Bernard I., Kerros ME., Milhiet PE., Delbe J., Barritault D., Caruelle D., Courty J. Immunoassay for measuring the heparin-binding growth factors HARP and MK in biological fluids. J Immunoassay Immunochem. 2002 ; 23:33-48

Sposito AC. & Chapman MJ. Statin therapy in acute coronary syndromes. Mechanistic insight into clinical benefit. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002 ; 22, 1524-1534.

Steinhubl S. & Moliterno DJ. The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. Am. J. Cardiovasc. Drugs. 2005 ; 5, 399-408

Stimmel JB., Kull FC Jr. Samarium-153 and lutetium-177 chelation properties of selected macrocyclic and acyclic ligands. Nucl. Med. Biol. 1998 ; 25,117-125.

Stoica GE., Kuo A., Aigner A., Sunitha I., Souttou B., Malerczyk C., Caughey DJ., Wen D., Karavanov A., Riegel AT., Wellstein A. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. J. Biol. Chem. 2001 ; 276:16772-779.

Su ZF., Liu G., Gupta S., Zhu Z., Rusckowski M., Hnatowich DJ. In vitro and in vivo evaluation of a technetium-99m-labeled cyclic RGD peptide as a specific marker of $\alpha_v\beta_3$ integrin for tumor imaging. Bioconjug. Chem. 2002 ;13:561- 70.

Suen JL., Chuang YH., Tsai BY., Yau PM., Chiang BL. Treatment of murine lupus using nucleosomal T cell epitopes identified by bone marrow-derived dendritic cells. Arthritis Rheum. 2004; 50:3250-9.

Sutcliffe-Goulden JL., O'Doherty MJ., Marsden PK. Hart IR., Marshall JF., Bansal SS. Rapid solid-phase synthesis and biodistribution of ¹⁸F-labeled linear peptides. Eur. J. Nucl. Med. 2002 ; 29,754-759.

Takagi J. Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. Biochem. Soc. Trans. 2004 ; 32(Pt3):403-6.

Tedgui A., Mallat Z. Atherosclérose et Inflammation. Med. Sci. 2001 ; 14, 162-169.

Toussaint JF., Jacob MP., Lagrost L., Chapman J. L'athérosclérose: Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques. 2003 ; P245-256.

Tricot O., Mallat Z., Heymes C., Belmin J., Lesèche G., Tedgui A. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. Circulation. 2000 ; 101, 2450-3.

Trop HS., Davison A., Jones AG., Davis MA., Szalda DJ., Lippard SJ. Synthesis and physical properties of hexakis(isothiocyanato)technetate(III) and - (IV) complexes. Structure of the $[Tc(NCS)_6]_3^-$ ion. Inorg. Chem. 1980 ;19,1105– 10.

Tsimikas S. Noninvasive imaging of oxidized low-density lipoprotein in atherosclerotic plaques with tagged oxidation-specific antibodies. Am. J. Cardiol. 2002; 90: 22L-27L

Tucker GC. Alpha v integrin inhibitors and cancer therapy. Curr. Opin. Investig. Drugs 2003 ; 4, 722-731.

Vacherot F., Caruelle D., Chopin D., Gil-Diez S., Barritault D., Caruelle JP., Courty J. Involvement of heparin affin regulatory peptide in human prostate cancer. Prostate. 1999 ; 38:126-136

Van de Wiele C., Dumont F., Dierckx RA., Peers SH., Thornback JR., Slegers G., et al. Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc -RP527, a gastrin-releasing peptide (GRP) agonist for the visualization of GRP receptor-expressing malignancies. J. Nucl. Med. 2001; 42:1722–7.

Van Eerd JE., Vegt E., Wetzels JF., Russel FG., Masereeuw R., Corstens FH., Oyen WJ., Boerman OC. Gelatin-based plasma expander effectively reduces renal uptake of ^{111}In -octreotide in mice and rats. J. Nucl. Med. 2006 ; 47(3):528-33.

Van Hagen PM., Breeman WA., Bernard HF., Schaar M., Mooij CM., Srinivasan A., Schmidt MA., Krenning EP., de Jong M. Evaluation of a radiolabelled cyclic DTPA-RGD Analogue for tumor imaging and radionuclide therapy. Int. J. Cancer. 2000 ; 8: 186-198

Vegt E., Wetzels JF, Russel FG, Masereeuw R, Boerman OC, van Eerd JE, Corstens FH, Oyen WJ. Renal uptake of radiolabeled octreotide in human subjects is efficiently inhibited by succinylated gelatin. J. Nucl. Med. 2006 ; 47(3):432-6.

Virgolini I., Müller C, Fitscha P, Chiba P, Sinzinger H. Radiolabelling autologous monocytes with ^{111}In -indium-oxine for reinjection in patients with atherosclerosis. Prog Clin Biol Res. 1990; 355, 271-80.

Virgolini I. ⁽¹⁾, Angelberger P., O'Grady J., Sinzinger H. Low density lipoprotein labelling characterizes experimentally induced atherosclerotic lesions in rabbits *in vivo* as to presence of foam cells and endothelial coverage. Eur. J. Nucl. Med. 1991; 18:944-7.

Virgolini I. ⁽²⁾, Rauscha F., Lupattelli G., Angelberger P., Ventura A., O'Grady J., et al. Autologous low-density lipoprotein labelling allows characterization of human atherosclerotic lesions *in vivo* as to presence of foam cells and endothelial coverage. Eur. J. Nucl. Med. 1991 ; 18:948-51.

Virgolini I., Szilvasi I., Kurtaran A., Angelberger P., Raderer M., Havlik E., Vorbeck F., Bischof C., Leimer M., Dorner G., Kletter K., Niederle B., Scheithauer W., and Smith-

Jones P. Indium-111-Dota-lanreotide: biodistribution, safety and radiation absorbed dose in tumour patients. J. Nucl. Med. 1998 ; 39, 1928-1936.

Visser GW., Klok RP, Gebbinck JW., ter Linden T., van Dongen GA., Molthoff CF. Optimal quality ¹³¹I-monoclonal antibodies on high-dose labeling in a large reaction volume and temporarily coating the antibody with IODO-GEN. J. Nucl. Med. 2001 ; 42(3):509-19.

Waibel R., Alberto R., Willude J., Finnern R., Schibli R., Stichelberger A., et al. Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex. Nat. Biotechnol. 1999 ; 17:897-901.

Weiner RE., Thakur ML. Radiolabeled peptides in oncology: role in diagnosis and treatment. BioDrugs. 2005; 19(3): 145-163.

Weiner RE., Thakur ML. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. Appl. Radiat. Isot. 2002 ; 57, 749-763.

Will CL., Lührmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. Curr. Opin. Cell. Biol. 2001; 13:290-301.

Wittekindt C., Bottger M., Holtje H. D., Schafer-Korting M., Cartier R., Haberland A. "Integrin specificity of the cyclic Arg-Gly-Asp motif and its role in integrin-targeted gene transfer." Biotechnol Appl Biochem 2004, 40(Pt 3): 281-290.

Woppmann A., Will CL., Kornstädt U., Zuo P., Manley JL., Lührmann R. Identification of an snRNP-associated kinase activity that phosphorylates arginine/serine rich domains typical of splicing factors. Nucleic Acids Res. 1993; 21:2815-22.

Wu, Y., Zhang XZ., Xiong ZM., Cheng Z., Fisher DR., Liu S., Gambhir SS., Chen XY. MicroPET imaging of glioma Rv-integrin expression using ⁶⁴Cu-labeled tetrameric RGD peptide. J. Nucl. Med. 2005 ; 46,1707-1718.

Xiong JP., Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. Science 2001, 294 :339-45.

Xiong JP., Stehle T., Zhang R., Joachimiak A., Frech M., Goodman SL., Arnaout MA. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_V\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. Science. 2002 ; 296, 151-155

Zaher KO., Mahfouz Rami AR., Makarem JA., Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms, Blood. Cells. Mol. Dis. 2007 ; 39(2):212-20.

Zaidi H. Recent developments and future trends in nuclear medicine instrumentation Med. Phys. 2006; 16: 5-17.

Zalutsky MR., Reardon DA., Pozzi OR., Vaidyanathan G., Bigner DD., Targeted alpha-particle radiotherapy with (211)At-labeled monoclonal antibodies, Nucl. Med. Biol. 2007 ; 34, 779-85

Zetter, B. R. Angiogenesis and tumor metastasis, Annu. Rev. Med. 1998 ; 49, 407-424.

Zhang M., Gumerov DR., Kaltashov IA., Mason AB. Indirect detection of protein-Metal binding: Interaction of serum transferrin with In^{3+} and Bi^{3+} . J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2004 ; 15(11):1658-64

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de décroissance du Molybdène 99.....	22
Figure 2: Le générateur molybdène 99 –technétium 99m	22
Figure 3 : Structure du complexe HMPAO- ^{99m} Tc à cœur de technétium [TcO] ³⁺	29
Figure 4 : 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).	30
Figure 5: Schéma général d'un chélate bifonctionnel	32
Figure 6 : Schéma de structure de [TcO(MAG ₃ H)] ⁻ (Mertiatide).....	33
Figure 7 : Structure du complexe ^{99m} Tc-HYNIC- biomolécule (Liu 2004)	34
Figure 8: Production de CO par boranocarbonate (a) et production de [Tc (CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺ (b) (Alberto R. 2001)	39
Figure 9 : Réaction de l'histidine avec le complexe [^{99m} Tc (CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺ (Alberto R. 1998)	40
Figure 10 : les ligands polyaminopolycarboxylates.....	46
Figure 11 : La structure possible de In ³⁺ -DTPA- Peptide.....	47
Figure 12: Structure des dérivés de DTPA ;	47
Figure 13 : Pyridoxyle éthylène diamine pour complexation de l'Indium	48
Figure 14 : Les ligands hydroxybenzyléthylène diamide pour la complexation d'Indium-111.....	49
Figure 15 : Les ligands hydroxybenzyléthylène diamide avec des groupements carboxylique situés sur la chaîne hydrocarbonée à la place des amines.	49
Figure 16 : Les ligands macrocycliques formant des complexes stables avec ¹¹¹ In ³⁺	50
Figure 17 : Triazacyclononane et ses dérivés utilisés comme ligand de l'Indium ³⁺ ..	50
Figure 18 : Les ligands amino-thiol complexant l'indium-111	51
Figure 19 : Le ligand dicarboxylate dithiol diamine	51
Figure 21: Schéma de l'indium-oxine TM	54
Figure 22 : Indium- DTPA (a) et OctreoScan® (indium In-111 pentétréotide) (b).....	54
Figure 23 : Exemples des oxydants N-chloramide	63
Figure 24 : Schéma de radioiodation d'une protéine sur le groupement tyrosine à l'aide d'un oxydant.....	66
Figure 25 : Radioiodation par la methode Bolton-Hunter.....	69
Figure 26 : Représentation schématique des principales étapes de l'angiogenèse (exemple de l'angiogenèse tumorale) (Chabannes E. 2002).....	79
Figure 27 : Représentation en ruban de la partie extracellulaire cristallisée de l'intégrine α _v β ₃ (sous-unité α _v en bleu, sous-unité β ₃ en rouge). B/ Structure cristalline du récepteur, C/ Modèle du récepteur déployé (Xiong J. P2001).	83
Figure 28 : Les structures optimisées des RGD cycliques en tant que ligands de l'intégrine α _v β ₃ . Les flèches indiquent les emplacements possibles pour la fixation directe d'un radio-isotope ou pour former un chélate avec un radio-isotope (Liu S. 2006).	86
Figure 29 : Structure de E[c(RGDfK)] ₂	87
Figure 30 : Structure de ¹⁸ F-Asp3-RGD et de ¹⁸ F- Ser3-RGD (Haubner R. 2005). ..	88
Figure 31: Exemples de dérivés de cyclo-RGD radiomarqués (Liu S. 2006).....	89
Figure 32 : Structure moléculaire du peptide HARP (Courty J. 2006)	92
Figure 33 : Mécanisme d'action de HARP(Courty J. 2006).	92
Figure 34 : Représentation des séquences de HARP possédant une activité biologique (Courty J. 2006).	93

Figure 35 : Effet du peptide P111-136 sur la croissance tumorale de PC-3 injectées en s.c. chez la souris Nude. Après développement tumoral, les souris sont traitées avec une solution de PBS (groupe contrôle), du Taxol (15 mg / kg) ou avec le peptide P111 - 136 (5mg/kg) (Courty J. 2006).	94
Figure 36 : Interactions cellulaires pendant le développement et la progression de l'athérosclérose (Davies JR. 2004).	97
Figure 37: Représentation schématique de l'interaction des leucocytes et des cellules endothéliales pendant l'athérosclérose et rôle des différentes molécules d'adhésions dans ce processus (Blankenberg S. 2003).	101
Figure 38: Structure de VCAM-1. VCAM-1 possède deux sites de liaison pour VLA-4 au niveau des domaines extracellulaires 1 et 4 (Cybulsky MI. 2001).	102
Figure 39 : Schéma représentatif de la molécule U1 SnRNP (Muto Y. 2004).	111
Figure 40 : Schéma d'un pentacycle contenant la séquence peptidique RGD.	120
Figure 41 : Structure de (a) RAFT-RGD contenant une histidine pour le marquage au ^{99m}Tc et (b) RAFT-RGD-DOTA contenant un cycle DOTA pour le marquage à ^{111}In .	121
Figure 42 : Structure du gabarit RAFT. A : fonctionnarisation du RAFT permettant la liaison de 4 structures identiques. B : structure tridimensionnelle dans l'espace (Garanger E. 2005).	122
Figure 43 : Structure de la molécule RAFT-RAD. Une histidine est fixée sur le cycle RAFT afin d'avoir la possibilité de marquage au ^{99m}Tc .	123
Figure 44 : Séquence peptidique de HARP 111-124.	123
Figure 45 : Structure des peptides BOT321 (a), BOT337 (b) et EP070946 (c). L'histidine fixée sur la lysine en position 13 de BOT321 et BOT337 et en position 12 de EP070946 permet le radiomarquage au ^{99m}Tc .	125
Figure 46: Chromatogrammes de cRGD- ^{99m}Tc après incubation à 80°C pendant 20 minutes (a) et 25°C pendant 2h (b).	154
Figure 47 : Influence de la durée d'incubation sur la pureté radiochimique	156
Figure 48 : Détermination de l'activité spécifique de RAFT-RGD- ^{99m}Tc	156
Figure 49 : Profil électrophorétique du sérum humain.	158
Figure 50 : Electrophorèse du peptide (a) : RAFT-RGD- ^{99m}Tc et (b) RAFT-RAD- ^{99m}Tc . Chromatogramme du gel d'agarose effectué par le détecteur Bertold®	159
Figure 51 : Chromatogrammes CLHP après incubation du peptide ; RAFT-RGD- ^{99m}Tc (a), RAFT-RAD- ^{99m}Tc (b) et cRGD- ^{99m}Tc (c) en présence du sang humain total.	160
Figure 52 : Trans-chélation du RAFT-RGD- ^{99m}Tc en présence de (a) histidine et (b) cystéine.	161
Figure 53 : Exemples d'imagerie planaire corps entier de souris greffées avec le mélanome B16F0, réalisés 1 heure après injection de (A) ^{99m}Tc -cRGD, (B) ^{99m}Tc -RAFT-RGD et (C) ^{99m}Tc -RAFT-RAD. Les tumeurs ont été greffées sur le membre inférieur situé à gauche de l'image (flèche).	162
Figure 54 : Stabilité du peptide RAFT-RGD- ^{99m}Tc , 1 et 4 heures après injection chez la souris : (a) dans le sang, (b) dans l'urine, (c) dans le foie et (d) dans les reins.	163
Figure 55 : Stabilité du peptide RAFT-RAD- ^{99m}Tc , 1 et 4 heures après injection chez la souris : (a) dans le sang, (b) dans l'urine, (c) dans le foie et (d) dans les reins.	164
Figure 56 : Stabilité sanguine du peptide cRGD- ^{99m}Tc , 4 heures après injection chez la souris.	165
Figure 57 : Chromatogramme CLHP du RAFT-RGD-DOTA- ^{111}In	166

Figure 58 : Influence de la température et de la durée d'incubation sur la pureté radiochimique du RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In	167
Figure 59 : Influence du solvant sur la pureté radiochimique du marquage du RAFT-RGD-DOTA à l'indium-111	167
Figure 60 : Incubation du RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In en présence de sang humain total. La pureté radiochimique du complexe après incubation (a), chromatogramme CLHP (b).	168
Figure 61 : Electrophorèse du peptide RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In. Chromatogramme du gel d'agarose effectué par le détecteur Bertold®	169
Figure 62 : Biodistribution du RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In chez la souris Balb/c greffée avec le carcinoma TS/A-pc.....	170
Figure 63 : Exemple d'imagerie planaire du RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In obtenue avec gamma caméra humaine.....	170
Figure 64 : Analyse CLHP des reins et détection de produit radioactif inconnu.	172
Figure 65 : Comparaison de chromatogramme de l'activité retrouvée dans les reins et celle du DOTA- ¹¹¹ In.....	172
Figure 67 : Analyse CLHP du peptide HARP111-124- ¹²⁵ I, à 1,3 et 6 heures après incubation en présence du sang humain total à 37°C.	175
Figure 68 : Biodistribution de HARP111-124- ¹²⁵ I à 30 min et 6 heures après injection du traceur.	176
Figure 69 : Images scintigraphique représentatives de la répartition de HARP111-124- ¹²⁵ I, 30 min, 1 heure, 3 heures, et 6 heures après injection.....	176
Figure 70 : Analyse urinaire du peptide HARP111-124- ¹²⁵ I.....	177
Figure 71 : Détermination de la fixation protéique du peptide B2702- ^{99m} Tc par électrophorèse.....	181
Figure 72 : Analyse CLHP de B2702- ^{99m} Tc (a) après incubation dans le sang humain à 37°C sous agitation pendant 1h (b), 3h (c) et 6h (d).....	182
Figure 73 : Imagerie planaire des souris ApoE-/- ligaturées au niveau de la carotide gauche, injectées avec B2702- ^{99m} Tc et PB1- ^{99m} Tc.	183
Figure 74 : Chromatogramme CLHP de B2702- ^{99m} Tc dans le sang (a) et l'urine (b), 3 heures après injection aux souris.	184
Figure 75 : Chromatogramme CLHP du B2702- ^{99m} Tc dans le foie et les reins, 3heures après l'injection aux souris.	184
Figure 76 : Chromatogramme CLHP de PB1- ^{99m} Tc et PB2- ^{99m} Tc, dans l'urine, 3 heures après l'injection chez la souris.	185
Figure 77 : Chromatogramme CLHP du PB7- ^{99m} Tc dans l'urine, 3 heures p.i. chez la souris.....	185
Figure 78 : Stabilité <i>in vivo</i> des peptides PB6- ^{99m} Tc, PB8- ^{99m} Tc, PB9- ^{99m} Tc et PB10- ^{99m} Tc dans l'urine 3 h p.i. chez la souris.	186
Figure 79 : Stabilité <i>in vitro</i> de peptide BOT321- ^{99m} Tc, 1h, 3h et 6h après incubation dans le sang humain total.....	188
Figure 80 : Analyses CLHP des échantillons du sang(a) et de l'urine(b), 3 heures après injection de BOT321- ^{99m} Tc chez la souris C57 et Apo E-/- ligaturées au niveaux de la carotide gauche.....	189
Figure 81 : Chromatogramme CLHP de peptide P140 après marquage à l'iode-125 par la méthode d'oxydation à l'aide de chloramine-T en solution.	191
Figure 82 : Influence de la quantité de chloramine-T sur la pureté radiochimique de P140- ¹²⁵ I.....	192
Figure 83 : Analyse de stabilité du complexe P140- ¹²⁵ I dans le sang total humain.	193

Figure 84 : Biodistribution du P140- ¹²⁵ I, chez les souris contrôle et lupique, 30 minutes après l'administration du radioligand.....	194
Figure 85 : Analyses des urines et du sang des souris 30 minutes après injection du complexe P140- ¹²⁵ I.....	195

Liste des tableaux

Tableau 1: Valeurs des constantes de stabilité des complexes de l'Indium-111 (Reichert DE. 1999).....	44
Tableau 2: Propriétés nucléaires et domaines d'application de quelques radioiodes (CE : capture électronique) (coenen HH. 2006).	57
Tableau 3 : Activité spécifique maximale des radionucléides d'iode d'intérêt biologique (coenen 2006).....	58
Tableau 4: Modalités d'imageries utilisées pour l'évaluation des plaques d'athérome humaines (Davies J. 2005).....	104
Tableau 5 : Schéma des séquences peptidiques des dérivés de B2702. Chaque peptide est dénommé PBn (1-10).....	124
Tableau 6: Valeurs de Log ([Oct]/[H ₂ O]) pour les dérivés RGD.....	157
Tableau 7 : Conditions d'analyses CCM du peptide RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In, ¹¹¹ In ³⁺ et DOTA- ¹¹¹ In.	166
Tableau 8 : Coefficient de partage du RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In à pH 7.4.	169
Tableau 9 : Etude de la stabilité de RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In dans les organes d'élimination et les liquides biologiques. Les résultats sont exprimés en : % ¹¹¹ In ³⁺ (A), % RAFT-RGD-DOTA- ¹¹¹ In (B) et % produit inconnu : Tr=9 minutes (C).	171
Tableau 10 : La valeur de Log P du DOTA- ¹¹¹ In.....	173
Tableau 11 : Détermination de la charge électrique du complexe DOTA- ¹¹¹ In.....	173
Tableau 12 : Etude de l'activité spécifique de 50 µg du B2702 en présence de différentes activités de l'intermédiaire technétié.	178
Tableau 13 : Pureté radiochimique des dix dérivés B2702, déterminée par CLHP.	179
Tableau 14 : Log P pour le complexe B2702- ^{99m} Tc et ses dérivés.....	180
Tableau 15 : Fixation des dérivés de B2702 aux protéines plasmatiques, mesurée par précipitation des protéines sanguines par TCA10% et confirmée par filtration a l'aide de Nanosep®.	181
Tableau 16 : Activité spécifique atteint pour les peptides BOT 321- ^{99m} Tc, BOT337- ^{99m} Tc et EP070946- ^{99m} Tc.....	187
Tableau 17 : Influence du temps d'incubation sur la pureté radiochimique de P140 lors du marquage à l'iode-125.	192

NOUVEAUX RADIOTRACEURS PEPTIDIQUES POUR L'IMAGERIE NUCLEAIRE. Radiomarquage, évaluations physico-chimiques et pharmacologiques

Résumé : Au cours de la dernière décennie, les radiotraceurs peptidiques sont devenus importants en Médecine Nucléaire pour le diagnostic et/ou la thérapie. Le développement de ces radiopharmaceutiques nécessite la recherche de nouveaux vecteurs spécifiques mais aussi leur évaluation physico-chimique et pharmacologique après radiomarquage. Ces travaux concernent la mise au point et l'optimisation du radiomarquage au technetium-99m, à l'indium-111 et à l'iode-125 de nouveaux radiotraceurs peptidiques, destinés à l'imagerie *in vivo* de deux processus pathologiques : la néoangiogenèse tumorale et la plaque d'athérome vulnérable, et au suivi de la thérapie d'une maladie auto-immune : le lupus érythémateux disséminé. Le radiomarquage au technétium a été effectué par l'intermédiaire d'un petit synthon tricarbonyle (Isolink), l'indium a été fixé par une macromolécule DOTA et la radioiodation a été réalisée par substitution électrophile. Les paramètres de chaque réaction ont été définis afin que la réaction de marquage présente un haut rendement et une haute activité spécifique. Les réactions sont rapides et reproductibles et la mise en forme compatible avec une utilisation *in vivo*. Les propriétés physico-chimiques et pharmacologiques (lipophilie, stabilité de marquage *in vitro* et *in vivo*, fixation protéique, métabolisation et biodistribution) ont été mesurées. Ces études ont permis de sélectionner les radioligands présentant les meilleurs critères pour une utilisation *in vivo* en imagerie.

Mots clés : radiopharmaceutiques, radiomarquage, technétium, indium, iode.

NEW PEPTIDIC RADIOTRACERS FOR NUCLEAR IMAGING. Radiolabeling, physico-chemical and pharmacological evaluations

Abstract: During the past decade, radiolabeled peptides have emerged as an important class of radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy in nuclear medicine. The concept of using radiolabeled peptides *in vivo* stimulates a large body of research for new peptidic vectors but also for radiochemical and radiopharmaceutical evaluations of these peptides after labeling.

We studied and optimized the 99m-technetium, 125-iodine and 111-indium radiolabeling of a serie of peptides in order to allow the *in vivo* use of these tracers for imaging studies of three pathologies: tumoral angiogenesis, atherosclerosis and systemic lupus erythematosus. The radiolabeling with technetium was carried out using a tricarbonyl agent (IsoLink) and Indium was linked by DOTA macromolecule. Radioiodination was realized by electrophilic substitution.

The reaction parameters were defined so that the labeling reaction presents a high radiochemical purity (>95%) and a high specific activity. The reactions were fast and reproducible. Various physicochemical and pharmacokinetic properties (lipophily, stability of labeling *in vitro* and *in vivo*, non-specific fixation, metabolization and organ biodistribution of peptides) were studied. These results permitted to select the best peptide for *in vivo* imaging.

Key words: radiopharmaceuticals, radiolabelled, technetium, indium, iodine.

Thèse préparée au sein de l'équipe INSERM U877 – Radiopharmaceutiques Biocliniques – Faculté de Médecine de Grenoble – UJF – Grenoble I