



HAL
open science

Elaboration d'une nouvelle plateforme de développement de traceurs in vivo : application à l'imagerie de la néoangiogenèse tumorale

Olivier Martinage

► **To cite this version:**

Olivier Martinage. Elaboration d'une nouvelle plateforme de développement de traceurs in vivo : application à l'imagerie de la néoangiogenèse tumorale. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114841 . tel-00765925

HAL Id: tel-00765925

<https://theses.hal.science/tel-00765925>

Submitted on 17 Dec 2012

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

DISCIPLINE : Biochimie

ANNÉE 2008 - 2011

SÉRIE DOCTORAT N° 1195

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 08/10/2012

par

Olivier Martinage

**Elaboration d'une nouvelle plateforme pour le développement de traceurs *in vivo* :
application à l'imagerie de la néoangiogenèse tumorale.**

Directeur de thèse : Christophe Dugave Dr HDR, CEA Saclay

Composition du jury :

Président du jury :

Jean-Pierre Mahy

Professeur, Université Paris XI, Orsay

Rapporteurs :

Eric Benoist

Dr HDR, Université Paul Sabatier, Toulouse

Nicolas Noiret

Dr HDR, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes

Directeur de thèse :

Christophe Dugave

Dr HDR, CEA Saclay

Ces travaux ont été réalisés sous la direction du Docteur Christophe Dugave
au sein du Laboratoire de Chimie du Vivant (CEA / DSV / iBiTec-S / SIMOPRO)

CEA Saclay

Direction des Sciences du Vivant (DSV)

Institut de Biologie et de Technologie de Saclay (iBiTec-S)

Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO)

Laboratoire de Chimie pour le Vivant (LCV)

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO) dirigé par le docteur Vincent Dive. Je le remercie de m'avoir accueilli dans ses locaux et de m'avoir permis d'y effectuer mes travaux de thèse. Je remercie également le CEA et la Direction des Sciences du Vivant qui les ont financé dans le cadre du programme IRTELIS.

Je tiens à remercier le docteur Christophe Dugave qui m'a encadré durant ses trois années et a su me faire partager son expertise en matière de synthèse organique et de traceurs pour l'imagerie moléculaire. Je le remercie également pour le temps qu'il a su me consacrer, tant pour les discussions scientifiques que pour la relecture de ce manuscrit. Je tiens à lui témoigner toute mon estime et ma reconnaissance.

Je remercie également les Professeurs Eric Benoist et Nicolas Noiret d'avoir accepté la charge d'être rapporteurs de ce travail ainsi que Le Professeur Jean-Pierre Mahy d'avoir bien voulu en être l'examineur.

Je tiens également à remercier tous ceux qui, de près ou de loin ont participé aux travaux que j'ai réalisés en trois années. En premier lieu, un grand merci à Loïc Leclainche, alias Tech-man, sans qui ce travail n'aurait pu être mené à son terme. Il a su me transmettre une partie de son précieux savoir en matière de technétium et de HPLC, et nos discussions lorsque je m'interrogeais sur l'après thèse m'ont fait beaucoup de bien. Je remercie également Bertrand Czarny qui a su trouver un peu de temps dans son emploi du temps de ministre pour s'occuper des souris lors des études *in vivo*. Merci aussi à Fanelly Berthon et Laëtitia Da Costa pour les prélèvements sanguins et la préparation du plasma murin ainsi qu'à Robert Thaï et Steven Dubois qui ont toujours su me trouver des créneaux MS souvent dans l'urgence. Enfin, je remercie Marie-Anne Lelait pour l'aide apportée lors de certaines synthèses ou purifications.

Merci également à tous les chimistes du service : Alain, Pascal, Guillaume, Matthieu, Laurent, Sarah, Catherine, Isabelle, Matthieu, Karine et Medhi, pour les discussions scientifiques entre deux portes, souvent celles qui débloquent une situation ! Ne soyons pas sectaires, alors merci également aux

biologistes : Elodie, Carole, Morgane, Yan, Guillaume, Nicolas, Hervé. Cela fait du bien parfois de ne pas parler que de chimie.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement la « palanquée Simoproise ». Merci à Carole, Bertrand, et Laura pour les séances de plongée du mercredi soir et cette superbe sortie d'application de Juin. Cette activité m'aura fait beaucoup de bien, et gare aux mangues !

Merci également à celles et ceux dont la présence est indispensable au fonctionnement de ce service : Eliane (merci pour les gâteaux !), Françoise, Patrick, Jean.

Enfin un grand merci à tous ces amis qui ont su être là au long de ces trois années, pour les bons moments mais aussi les moins bons. Merci donc à Perrine, Jeremy, Jean-Christophe, Marjolaine, Antoine,
...

à mes parents,

à mes grand-parents,

Table des matières

Introduction générale	13
Chapitre I : Introduction bibliographique	15
<u>I.1. Médecine nucléaire</u>	15
I.1.1. Définitions	15
I.1.2. Imagerie et thérapie	17
I.1.2.a. Les différents types de rayonnements	17
I.1.2.b. Les différents types d'imagerie	21
I.1.2.c. Utilisation thérapeutique	24
I.1.2. Caractéristiques des radionucléides utilisés en médecine nucléaire	25
I.1.2.a. Les caractéristiques physiques des radionucléides	25
I.1.2.b. Le radionucléide idéal	27
I.1.3. Du radionucléide au radiopharmaceutique	28
I.1.3.a. Marquage covalent	29
I.1.3.b. Marquage par complexation du radionucléide	30
<u>I.2. Technétium et rhénium</u>	41
I.2.1. Le technétium	41
I.2.1.a. Généralités, découverte, production	41
I.2.1.b. ^{99m}Tc	43
I.2.1.c. ^{99g}Tc	44
I.2.2. Le rhénium	45
I.2.2.a. Généralités	45
I.2.2.b. Technétium et Rhéniums, deux éléments de la même famille	46
I.2.2.c. Les isotopes radioactifs du rhénium	47
I.2.3. Les différents cœurs technétiés et leurs motifs de complexation	48
I.2.2.a. Le degré d'oxydation +I	49
I.2.2.b. Le degré d'oxydation +V	51
<u>I.3. Présentation du projet</u>	56
<u>I.4. Références bibliographiques</u>	63

Chapitre II : Préparation d'une famille de ligands triazoles	75
<u>II.1. Choix d'une famille de ligands</u>	75
II.1.1. Cahier des charges, propriétés désirées	75
II.1.2. De complexes références à une structure de base	77
<u>II.2. La réaction de cycloaddition de Huisgen</u>	82
II.2.1. Formation de triazole par cycloaddition	82
II.2.2. Cycloaddition de Huisgen catalysée	83
II.2.3. Les conditions expérimentales employées dans cette synthèse	87
<u>II.3. Synthèse des 12 ligands et 2 références</u>	88
II.3.1. Synthèse des ligands de la série A	88
II.3.2. Synthèse des 3 ligands de la série B1	92
II.3.3. Synthèse des 3 ligands de la série B2	93
II.3.4. Synthèse des deux ligands références	95
II.3.5. Conclusion	96
<u>II.4. Références bibliographiques</u>	99
Chapitre IIe : Partie expérimentale	103
<u>IIe.1. Procédures de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen</u>	103
<u>IIe.2. Synthèse des 12 ligands et 2 références</u>	104
Chapitre III : Marquage des ligands et étude des complexes	125
<u>III.1. Complexation de ^{99m}Tc par les ligands</u>	125
III.1.1. Complexation par voie indirecte	126
III.1.2. Complexation par voie directe	127
III.1.3. Protocole employé pour le marquage des ligands	128
III.1.4. Problème de l'asymétrie des complexes	129
III.1.5. Résultats et conclusions	131
<u>III.2. Etude <i>in vitro</i> des ligands retenus</u>	137
III.2.1. Protocole et résultats des études cinétiques	138
III.2.2. Etude du palier	142
III.2.3. Etude de la compétition par la cystéine	145
<u>III.3. Caractérisation de TriaS-^{99g}Tc</u>	146

<u>III.4. Etude in vivo de TriaS-^{99m}Tc</u>	150
III.4.1. Biodistribution	150
III.4.2. Analyse des urines	154
III.4.3. Etude de stabilité de TriaS- ^{99m} Tc dans le sang	157
<u>III.5. Bilan</u>	159
<u>III.6. Références bibliographiques</u>	161

Chapitre IIIe : Partie expérimentale **165**

<u>IIIe.1. Préparation des complexes ^{99m}Tc-1 à ^{99m}Tc-14</u>	165
<u>IIIe.2. Etude in vitro des complexes</u>	165
IIIe.2.1. Etude cinétique	165
IIIe.2.2. Effet de la concentration en TriaS- ^{99m} Tc sur le palier cinétique	166
IIIe.2.3. Etude de la compétition par la cystéine	167
<u>IIIe.3. Préparation et caractérisation du complexe TriaS-^{99g}Tc</u>	167
<u>IIIe.4. Etude in vivo de TriaS-^{99m}Tc</u>	168
IIIe.4.1. Biodistribution	168
IIIe.4.2. Analyse des urines	168
IIIe.4.3. Etude de stabilité de TriaS- ^{99(m+g)} Tc dans le sang de souris saine	169

Chapitre IV : Illustration du potentiel de TriaS pour la préparation de traceurs **171**

<u>IV.1. Cancer et angiogénèse</u>	171
IV.1.1. Le cancer en chiffres	171
IV.1.2. Développement des cancers	173
IV.1.2.a. Les grandes étapes du développement d'un cancer	173
IV.1.2.b. La cellule tumorale	175
IV.1.2.c. L'angiogénèse tumorale	177
<u>IV.2. Les intégrines</u>	178
IV.2.1. Structure	178
IV.2.2. Rôle des intégrines	180
IV.2.3. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$	182

<u>IV.3. L'angiogenèse au cœur des recherches antitumorales</u>	184
IV.3.1. L'angiogenèse tumorale : une cible thérapeutique	184
IV.3.2. Ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	186
<u>IV.4. Application de la plateforme TriaS pour le développement de traceurs de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$</u>	194
IV.4.1. Le potentiel de TriaS pour l'imagerie in vivo	194
IV.4.2. Développement de traceurs intégrés de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	198
IV.4.3. Développement de traceurs bifonctionnels de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	207
<u>IV.5. Conclusion</u>	217
<u>IV.6. Références bibliographiques</u>	219
Chapitre IVe : Partie expérimentale	227
<u>IVe.1. Développement de traceurs intégrés de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$</u>	227
<u>IVe.2. Développement de traceurs bifonctionnels de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$</u>	232
Conclusion et perspectives	239
Annexe	247

Lexique

°C	Degrés Celcius
Ac	Acétyle
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
BFCA	BiFonctional Chelating Agent
Bn	Benzyle
Boc	tert-butyloxycarbonyle
CCM	Chromatographie sur couche mince
CT	Computed Tomography
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DCU	Dicyclohexylurée
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
equiv.	Equivalent
EtOH	Ethanol
eV	Electron-volt
FDG	Fluorodesoxyglucose
Fmoc	9-Fluorénylméthoxyloxy-carbonyl
GSH	Glutathion réduit
HATU	(2-(7-Aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)
HCl	Acide chlorhydrique
HEPES	acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N-2-éthane-sulfonique
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
Hz	Hertz
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
MeOH	Méthanol
mmol	millimole
MW	mégawatt
NMM	N-méthylmorpholine
NMP	N-méthylpyrrolidone
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl

PEG	Polyéthylène glycol
PET	Tomographie par émission de positrons
Ph	Phényle
Rdt	Rendement
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RP-HPLC	Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse
RT	Room température (température ambiante)
SPECT	Spectroscopie par emission monophotonique
t _{1/2}	période
tBu	tert-butyle
TEL	Transfert d'énergie linéique
TEMP	Spectroscopie par emission monophotonique
TEP	Tomographie par émission de positrons
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TIPS	Triisopropylsilane
Trt	Trityle
UV	Ultra-Violet
W	Watt
Z	Benzyloxycarbonyl

Introduction générale

« *Nous saurons la physiologie lorsque nous pourrons suivre pas à pas une molécule de carbone ou d'azote, faire son histoire, raconter son voyage dans le corps d'un chien, depuis son entrée jusqu'à sa sortie...* » (Claude Bernard, XIXe siècle).

Au XIXe siècle déjà, les physiologistes étaient convaincus que la connaissance en profondeur du fonctionnement des organismes vivants était conditionnée par le développement de méthodes d'exploration non invasives. La radioactivité artificielle découverte par Frédéric et Irène Joliot-Curie (Prix Nobel de chimie en 1933) leur fournira les outils d'imagerie médicale permettant de visualiser les phénomènes chimiques et biologiques au sein même des organismes. Dès lors, le développement de radiopharmaceutiques est devenu un domaine très étudié de la recherche médicale. Il s'agit d'après la définition officielle de médicaments contenant un ou plusieurs isotopes radioactifs, les radionucléides, incorporés à des fins médicales. Ces composés sont utilisés dans de nombreuses applications telles que la radio-immunologie *in vitro*, la scintigraphie (imagerie fonctionnelle et diagnostic *in vivo*), et la radiothérapie.

Chaque domaine d'application requiert des radionucléides aux propriétés physicochimiques différentes. En particulier pour les applications de diagnostique et d'imagerie fonctionnelle par scintigraphie, le radionucléide le plus utilisé est le ^{99m}Tc (plus de 85% des examens de routine actuels) qui regroupe toutes les caractéristiques du radionucléide idéal en terme de coût, de disponibilité, de demie vie et d'énergie. Le développement de radiopharmaceutiques technétiés est devenu un domaine de recherche très actif et un grand nombre de composés ont été mis au point pour imager des cibles biologiques très variées.

Durant ces trois années de thèse, nous avons souhaité nous intéresser à de nouveaux radiopharmaceutiques technétiés. L'objectif de ce travail était de déterminer une ou plusieurs nouvelles structures complexant le ^{99m}Tc et présentant une stabilité optimale dans le plasma. Ainsi identifiées, ces structures constituent des plateformes pour le développement de traceurs ayant une prédisposition à être stable en plasma.

Ce manuscrit décrit l'étude réalisée durant ces trois années et s'articulera en quatre parties.

La première partie nous permettra de replacer ce travail dans son contexte bibliographique et de préciser diverses informations essentielles concernant les radiopharmaceutiques et le technétium.

Dans une seconde partie nous présenterons la synthèse d'un ensemble de ligands potentiels du technétium effectuée durant la thèse.

Une troisième partie présentera les résultats du criblage de cette série de molécules selon leur aptitude à former quantitativement un complexe stable en plasma murin. Les complexes retenus seront alors étudiés *in vivo* chez la souris.

Une dernière partie nous permettra d'appliquer notre approche au développement de traceurs radiomarqués de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, impliquée dans la néoangiogenèse tumorale. Nous procéderons alors selon deux approches distinctes : une approche bifonctionnelle et une approche intégrée.

Enfin, nous synthétiserons l'ensemble des résultats obtenus durant ces trois années et nous nous intéresserons aux perspectives offertes par ce sujet.

Chapitre I

Introduction bibliographique

I.1 Médecine nucléaire

I.1.1 Définitions

Reconnue spécialité médicale depuis 1970, la médecine nucléaire regroupe l'ensemble des techniques médicales utilisant les radiopharmaceutiques. Un radiopharmaceutique est un médicament contenant dans sa structure un ou plusieurs isotopes radioactifs appelés radionucléides. Ces composés sont conçus de manière à s'accumuler au niveau d'une cible thérapeutique. Ils permettent ainsi d'obtenir des informations par imagerie ou peuvent avoir un effet thérapeutique sur cette cible selon la nature du radionucléide utilisé.

La médecine nucléaire est actuellement utilisée dans trois grands domaines médicaux: l'imagerie fonctionnelle, la radiothérapie, et la radioimmunologie.

Utilisée en imagerie, elle permet de visualiser la présence ou non dans l'organisme de la cible du radiopharmaceutique, une cellule tumorale par exemple, ou de constater une anomalie anatomique (^{123}I ou TcO_4^- par exemple permettent de surveiller la taille de la glande thyroïdienne [1, 2]). Grâce à un dispositif d'acquisition externe (β -imager, gamma camera, scanner), le rayonnement émis par le radionucléide peut être enregistré et, après traitement informatique, une image en deux ou trois dimensions permet de visualiser les niveaux de

concentration en radiopharmaceutiques. L'imagerie nucléaire est une méthode d'imagerie dite fonctionnelle ou dynamique. Elle permet, par exemple, de visualiser en temps réel les écoulements sanguins (intracérébraux, cardiaques ...), permettant ainsi de prévenir l'apparition d'infarctus [3] et d'étudier certaines maladies dégénératives comme la maladie d'Alzheimer [4] ou de Parkinson [5]. Elle est un outil précieux dans l'étude de certains métabolismes et est aussi utilisée pour évaluer la réponse à la chimiothérapie [6]. L'imagerie isotopique est couramment utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour réaliser les preuves de concepts de nouveaux médicaments en phase préclinique, ou pour évaluer les posologies en phase clinique [7, 8].

L'utilisation de radionucléides émettant des rayonnements plus ionisants peut également permettre de détruire les cellules situées au voisinage du radiopharmaceutique. C'est le principe de la radiothérapie dirigée.

Enfin, la radioimmunologie consiste à utiliser des anticorps marqués par un traceur radioactif afin d'effectuer des dosages immunologiques. C'est l'extrême sensibilité de la médecine nucléaire qui est ici mise à profit. Elle rend possible le dosage de composés à des concentrations beaucoup plus faibles que par les techniques classiques.

L'extrême sensibilité de l'imagerie nucléaire qui rend possible le dépistage précoce de certains désordres et l'efficacité de la radiothérapie dirigée font du développement des radiopharmaceutiques un domaine de recherche aujourd'hui très actif. En 2010, le marché mondial de l'imagerie médicale était évalué à 200 milliards de dollars dont 11% pour l'imagerie à grands instruments (Rayons-X, scintigraphies). A titre de comparaison le marché des instruments médicaux (hors imagerie) représente 4 milliards de dollars (source : ministère de l'industrie).

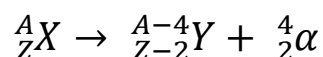
I.1.2 Imagerie et thérapie

I.1.2.a. Les différents types de rayonnements

Les radionucléides utilisés en médecine nucléaire peuvent être classés en quatre catégories selon le type de rayonnement qu'ils émettent. Chaque catégorie d'émetteurs donne lieu à une utilisation différente en imagerie ou en thérapie.

Les émetteurs α

Les émetteurs α sont des radionucléides émettant un rayonnement particulaire par décroissance isotopique. Ces particules sont constituées de deux protons et de deux neutrons.



Les particules α ont une énergie élevée (5 à 9 MeV) et le transfert d'énergie linéique (TEL) qui traduit l'énergie moyenne fournie par le rayonnement au milieu qu'il traverse par unité de distance, le plus important (80 à 100 keV/ μ m). En revanche, leur pouvoir pénétrant dans les tissus est très faible (40 à 100 μ m). Ces propriétés les rendent particulièrement adaptées à une utilisation thérapeutique lorsque la cible est de petite taille. Ils permettent une thérapie très localisée et génèrent très peu d'effets secondaires puisque seule la cible thérapeutique est touchée. Le mécanisme d'action des radiopharmaceutiques à émetteurs α repose sur de très fortes ionisations qui causent des dommages irréparables à l'ADN. On estime que moins de 1% de l'irradiation reçue par une cellule touche effectivement le noyau, mais l'efficacité est telle qu'il suffit à provoquer la mort cellulaire. Les ionisations endommagent également les organelles (mitochondries, ...) et les parois cellulaires [9, 10]. Le tableau I.1 répertorie les émetteurs α les plus courants et leurs propriétés caractéristiques [11-13].

Radioélément	Demi-vie	Energie (MeV)
²¹¹ At	7,2 h	5,87
²¹² Bi	60,6 min	6,05
²²⁵ Ac	10 j	5,75
²¹³ Bi	45,6 min	5,84
²¹² Pb	10,6 h	7,80
¹⁴⁹ Tb	4,1 h	3,97

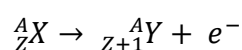
Tableau I.1. : Caractéristiques des principaux émetteurs α

Actuellement, des études cliniques sont réalisées pour une utilisation chez l'homme de radiopharmaceutiques à émetteurs α afin de soigner diverses pathologies dont principalement la leucémie myéloïde [14, 15], les métastases osseuses de cancers de la prostate ou du sein [16, 17] ou les tumeurs cérébrales récurrentes [18].

Les émetteurs β

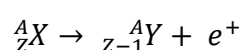
On distingue deux types d'émetteurs β selon la nature de la particule émise : un électron ou un positron respectivement pour les émetteurs β^- et β^+ .

Les émetteurs β^- sont actuellement les radionucléides les plus utilisés en radiothérapie. Leur décroissance s'accompagne de l'émission d'un électron (ou particule β^-).



Les particules β^- ont une énergie (0,5 à 2,3 MeV) et un TEL (0.2 keV/ μ m) plus faibles que les particules α mais un pouvoir pénétrant supérieur (0,05 à 12 mm). Par conséquent, une bonne efficacité en thérapie nécessite une forte accumulation de radionucléide au niveau de la cellule cible mais la zone d'irradiation est plus vaste et peut toucher les cellules voisines. La radiothérapie β^- est donc préconisée pour des cibles de plus grande taille. Leur mécanisme d'action consiste à générer des radicaux libres au sein des cellules qui vont conduire à la destruction localisée de celles-ci. Les radionucléides émetteurs β^- les plus utilisés à l'heure actuelle sont ${}^{90}\text{Y}$, ${}^{131}\text{I}$ et plus récemment ${}^{186}\text{Re}$ et ${}^{188}\text{Re}$ notamment pour le traitement des métastases osseuses du cancer du sein [19, 20]

Les émetteurs β^+ sont utilisés pour la tomographie par émission de positron. Leur décroissance s'accompagne de l'émission d'une particule chargée positivement, le positron.



L'annihilation du positron dans les tissus entraîne l'émission de deux photons dans des directions opposées avec une énergie d'environ 511 keV. Ces deux photons sont détectés par un dispositif de type scanner et peuvent être corrélés spatialement. Le rayonnement particulaire β^+ a un pouvoir pénétrant très faible et par conséquent le lieu d'émission des photons est situé au voisinage direct du radionucléide, et donc de la cible. Cette technique d'imagerie connaît un grand intérêt de par la précision très élevée qu'elle peut atteindre, étroitement liée au libre parcours moyen du positron avant annihilation. Nous verrons plus loin que depuis peu, de nouveaux détecteurs SPECT permettent d'obtenir une précision comparable avec des radionucléides émetteurs γ (cf I.1.2.b.). Les émetteurs β^+ les plus utilisés actuellement sont ${}^{18}\text{F}$,

^{11}C , ^{68}Ga et ^{15}O . Les deux derniers permettent le marquage de molécules par substitution isotopique, c'est-à-dire sans en modifier la structure et donc sans modifier l'affinité du composé froid pour la cible. Le ^{68}Ga , quant à lui, présente l'avantage d'être disponible en générateurs portables utilisables un an et de permettre une mise au point sur isotope « froid » [21]. La figure I.4. (page 12) montre deux clichés obtenus par TEP et donne une idée de l'efficacité de cette méthode d'imagerie en termes de précision et de quantification.

Le tableau I.2. répertorie les émetteurs β les plus courants et leurs propriétés physiques.

	Radioélément	Demi-vie	Energie (MeV)	Utilisation
β^+	^{11}C	20,4 min	0,96	Imagerie
	^{15}O	2 min	1,73	
	^{18}F	1,8 h	0,63	
	^{68}Ga	1.13h	0.51	
β^-	^{90}Y	64,1 j	2,28	Thérapie
	^{131}I	8.02 j	0,61	
	^{186}Re	3,77 j	1,08	
	^{188}Re	16,9 h	2,12	

Tableau I.2.: Caractéristiques des principaux émetteurs β

Les émetteurs Auger

Les émetteurs Auger sont des radionucléides qui se désintègrent par conversion interne (CI) ou par capture électronique (CE). Ils ont la particularité d'avoir un TEL très élevé sur quelques nanomètres. A plus longue distance le rayonnement est comparable à celui d'émetteurs β^- à faible TEL. Les principaux émetteurs Auger connus ainsi que leurs périodes respectives sont indiqués dans le tableau I.3.

Actuellement de nombreuses études sont réalisées afin d'utiliser ces radionucléides en radiothérapie mais aucun traitement mettant en jeu des émetteurs Auger n'est utilisé chez l'homme à ce jour. La principale raison repose dans le très faible pouvoir pénétrant de ces rayonnements qui réduit les possibilités thérapeutiques à deux approches. La première est une action directe sur l'ADN qui nécessite des vecteurs pouvant accumuler la radionucléide au sein même du noyau [22, 23]. La seconde consiste à accumuler le radionucléide dans le cytoplasme de

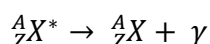
la cellule. Néanmoins, la taille de la cellule (ordre de grandeur du micromètre) étant très grande par rapport au pouvoir pénétrant des rayonnements Auger (de l'ordre du nanomètre), il faut obtenir une distribution régulière et très dense du radionucléide au sein de la cellule pour détruire celle-ci. C'est actuellement le principal obstacle à l'utilisation des émetteurs Auger en thérapie [24].

Radioélément	Demi-vie
^{125}I	60.5 j
^{123}I	13.3 h
^{77}Br	57 h
^{111}In	3 j

Tableau I.3. : Demi-vie des principaux émetteurs Auger

Les émetteurs γ

Les émetteurs γ constituent les radionucléides les plus utilisés en imagerie. L'émission γ a lieu lorsqu'un isotope issu d'une désintégration α ou β , se trouve dans un état excité. La désexcitation du noyau vers un état plus stable est accompagnée de l'émission d'un photon de haute énergie, à fort pouvoir pénétrant et à faible TEL. Dans la plupart des cas la durée de vie (10^{-12} s) de ces états excités est telle que ceux-ci ne sont pas observables. Néanmoins dans certains cas, cette durée de vie est très largement supérieure et l'état excité correspond à un état métastable. Il ne s'agit pas d'un phénomène de désintégration : le numéro atomique et le nombre de masse du radioélément ne varient pas.



Ce rayonnement n'interagit que très peu avec la matière et est donc idéal pour une utilisation en imagerie. C'est aussi le rayonnement le plus pénétrant. Le radionucléide émetteur γ le plus utilisé actuellement est le ^{99m}Tc ($t_{1/2} = 6.02\text{h}$, $E = 140\text{ keV}$) qui représente à lui seul plus de 85% des radiopharmaceutiques utilisés lors d'examens par scintigraphie en routine en milieu hospitalier.

I.1.2.b Les différentes techniques d'imagerie.

Les scintigraphies sont des examens d'imagerie impliquant l'administration d'un radiopharmaceutique dont la distribution dans le corps peut être visualisée par acquisition externe. En sélectionnant un radiopharmaceutique ayant une affinité élevée pour une cible choisie, on peut mettre en évidence cette cible sur une image 2D ou 3D du patient. L'énorme avantage des techniques d'imagerie impliquant un radiopharmaceutique, dites internes, par rapport aux techniques d'imagerie classiques, dites externes, (RX, ...) est leur très grande sensibilité. En effet des quantités de radiopharmaceutique de l'ordre du nanogramme sont détectables.

L'imagerie par rayonnement γ : SPECT

Les premières scintigraphies ont été développées à l'aide d'émetteurs γ . En effet le rayonnement émis possède les caractéristiques essentielles pour l'imagerie : TEL faible qui limite l'effet destructeur du rayonnement, pouvoir pénétrant élevé afin de détecter le rayonnement hors du corps, et une énergie comprise entre 100 et 400 keV (idéalement 150 keV). Deux dispositifs sont utilisés en fonction de la nature bidimensionnelle ou tridimensionnelle des images souhaitées.

- Les images 2D sont obtenues à l'aide d'une γ -caméra située au-dessus du patient. Les rayonnements issus du radiopharmaceutiques sont recueillis au travers d'un collimateur par un cristal d'iodure de sodium dopé au thallium qui présente une forte sensibilité aux rayonnements. Un dispositif informatique permet alors d'obtenir l'image 2D de la zone observée (fig. I.1, gauche). Cette technique permet l'acquisition d'images dynamiques et peut donc être utilisée pour visualiser des écoulements ou étudier des métabolismes.
- La méthode TEMP (Tomographie d'Emission Monophotonique) ou SPECT en anglais (Single Photon Emission Computed Tomography) consiste à appliquer la technique du scanner couplée à l'utilisation d'une ou plusieurs γ -caméras (fig. I.1., droite). Celles-ci tournent autour du patient et réalisent régulièrement une acquisition 2D, l'ensemble de ces acquisitions est ensuite traité par un algorithme informatique de façon à obtenir une

reconstruction 3D dont le spécialiste pourra extraire les coupes 2D nécessaires pour formuler son diagnostic.

En pratique, les clichés obtenus en SPECT sont le plus souvent superposés à des techniques d'imageries plus classiques RX, IRM donnant des images anatomiques. La localisation du lieu d'accumulation du radiopharmaceutique est ainsi encore plus précise. On parle alors de SPECT-CT (pour computed tomography).



Fig. I.1 : Imagerie par rayonnements γ .

A gauche: Principe de fonctionnement d'une γ -caméra. A droite : un scanner SPECT à trois γ -caméras.

La figure I.4.a. (page 12) représente un exemple d'utilisation de l'imagerie SPECT-CT. Le radiopharmaceutique utilisé est le ^{99m}Tc -tetrofosmin, qui s'accumule au niveau des glioblastomes cérébraux. L'imagerie γ permet dans ce cas d'évaluer le stade de la tumeur et de fournir un pronostic. [25].

Récemment ont été développés des capteurs CZT pour l'imagerie SPECT [26, 27] qui ont permis d'obtenir une sensibilité accrue (comparables à celle de l'imagerie β^+).

L'imagerie par rayonnement β^+

La tomographie par émission de positron (TEP, PET en anglais) est une technique d'imagerie plus récente, développée dans les 25 dernières années qui permet l'obtention d'images

ayant une très bonne résolution. Cette amélioration est essentiellement due à la sensibilité des capteurs utilisés qui sont capables de détecter environ 3% des rayonnements reçus, soit 100 fois plus que les détecteurs utilisés en imagerie γ les plus courants, mais aussi au phénomène de corrélation spatiale.

Le positron émis par le radionucléide émetteur β^+ va s'annihiler, provoquant l'émission de deux photons d'énergie 511 keV et de directions opposées. Ces deux photons sont détectés par les caméras TEP qui sont disposées en couronne autour du patient. Un dispositif informatique restitue alors la position du radionucléide en corrélant les signaux issus des deux photons antiparallèles (Fig. I.2).

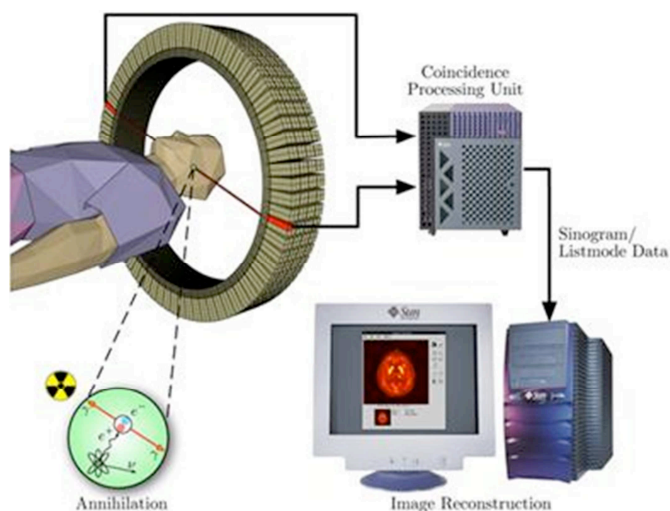


Fig. I.2 : Schéma de principe de l'imagerie TEP

Comme dans le cas du SPECT, la technique TEP peut être couplée à des techniques d'imagerie anatomique pour obtenir des clichés en TEP-CT [28].

Un autre grand intérêt de l'imagerie TEP réside dans l'utilisation possible des radioisotopes d'éléments constitutifs des molécules biologiques tels que le carbone, l'hydrogène ou l'oxygène. Avec ces radioéléments il est possible de développer des radiopharmaceutiques ayant exactement la même structure que la molécule biologique et donc la même affinité pour la cible, ce qui n'est pas le cas avec les émetteurs γ .

Malgré tous ses avantages, l'imagerie TEP est aujourd'hui encore moins utilisée que l'imagerie SPECT. Les principales raisons sont le coût élevé des dispositifs d'acquisition, les contraintes de radioprotection qui imposent notamment des salles d'examen plombées, la disponibilité limitée des sources dans le cas de certains radioéléments émetteurs β^+ et une chimie plus complexe et plus contraignante à mettre en œuvre. Actuellement le radiopharmaceutique le plus utilisé en TEP est le ^{18}F -FDG (fluorodésoxyglucose) qui permet de visualiser les cellules tumorales présentant

une consommation anormalement élevée de glucose (Fig. I.4.b). D'autres radiopharmaceutiques donnent des résultats très encourageants tels que le ^{18}F -Fluciclatide qui cible l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ surexprimée au niveau des tumeurs (Fig. I.3 et I.4.c). Outre le ^{18}F , d'autres radioéléments émetteurs β^+ sont également étudiés tels que les isotopes ^{60}Cu [29] ou ^{68}Ga [30-32].

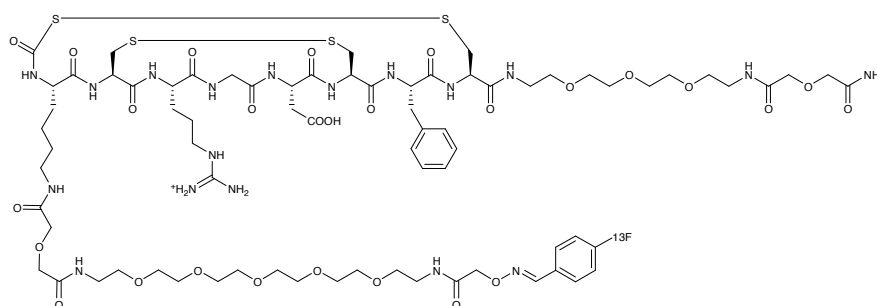
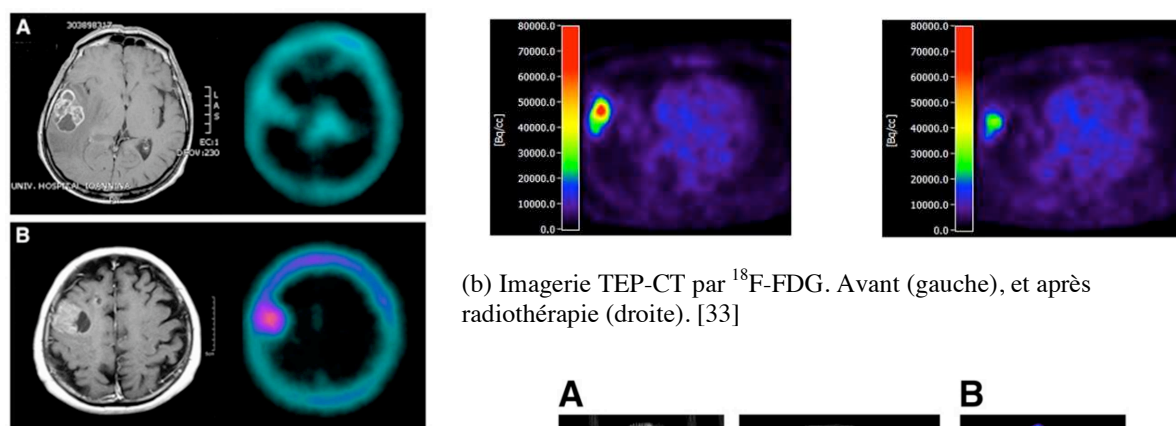


Fig. I.3. : ^{18}F -Fluciclatide



(b) Imagerie TEP-CT par ^{18}F -FDG. Avant (gauche), et après radiothérapie (droite). [33]

(a) Imagerie SPECT-CT par $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmin (droite). La zone rouge correspond à un site de haute accumulation du radiopharmaceutique. Le patient B est un cas gravissime. [25]

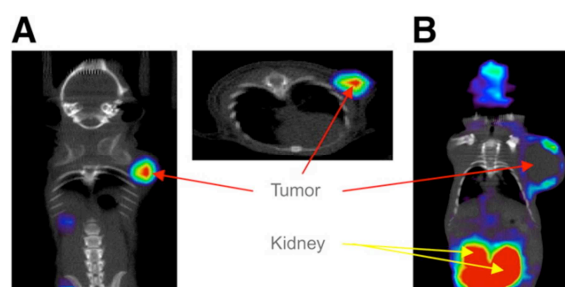


Fig. I. 4. : Quelques applications des imageries SPECT-CT et PET-CT

I.1.2.c. Utilisation thérapeutique

L'utilisation de radiopharmaceutiques permet d'assurer un rôle thérapeutique lorsque le radionucléide utilisé est un émetteur α , β^- , ou, en théorie, Auger. On parle alors de radiothérapie interne puisque la source du rayonnement est dans l'organisme.

On distingue quatre types de radiothérapie :

- La radiothérapie métabolique qui utilise une molécule marquée participant au métabolisme comme dans le cas de ^{131}I . L'iode est directement assimilé au niveau de la glande thyroïdienne et va permettre le traitement du cancer de la thyroïde [34].
- La radiothérapie locale qui consiste à injecter le radiopharmaceutique directement au niveau de la cible pour un effet très localisé. C'est une technique préconisée pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde par injection dans l'articulation [35, 36]
- La radioimmunothérapie consiste à atteindre la cible via un anticorps marqué visant un antigène particulier. Il peut s'agir par exemple d'un antigène exprimé à la surface de cellules tumorales. Cette technique présente l'avantage d'être très précise en raison de la haute spécificité des anticorps. [37, 38]
- La radiothérapie vectorisée est la plus répandue. Elle consiste à utiliser une structure servant de vecteur qui va assurer la spécificité du traceur pour la cible. Cette structure peut avoir de multiples formes : un composé chimique comme un peptide [39] ou une structure résultant d'une formulation particulière connue comme un liposome [40].

I.1.2. Caractéristiques des radionucléides utilisés en médecine nucléaire

Les radionucléides sont des éléments chimiques possédant une radioactivité naturelle ou artificielle.

I.1.2.a. Les caractéristiques physiques des radionucléides

Chaque radionucléide possède des caractéristiques physiques propres ainsi qu'un mode et un coût de production particulier.

Le type de rayonnement émis

La nature du rayonnement émis par le radionucléide conditionne son utilisation en imagerie ou en thérapie. Les rayonnements α , β^- sont utilisés en thérapie, tandis que les rayonnements β^+ et γ sont plus adaptés à l'imagerie.

Le transfert d'énergie linéique (TEL)

Il traduit l'énergie moyenne que la particule émise par le radionucléide transmet au milieu qu'elle traverse par unité de distance parcourue. Un rayonnement à transfert d'énergie linéique élevé est donc particulièrement adapté à la radiothérapie puisqu'il occasionnera des dégâts importants aux cellules en leur transmettant une forte énergie. A l'opposé, un radiopharmaceutique pour l'imagerie devra présenter un TEL faible le long de son parcours dans l'organisme afin de ne pas endommager les organes.

La période physique ou demi-vie

C'est la durée à l'issue de laquelle l'activité du radionucléide est diminuée de moitié. Elle doit être adaptée à l'utilisation du radiopharmaceutique. La période physique doit ainsi être suffisamment longue pour permettre à l'utilisateur de préparer le radiopharmaceutique et au radiopharmaceutique d'atteindre la cible sans une perte trop importante d'activité. A l'opposé, elle doit être relativement courte de façon à ne pas irradier le patient trop longtemps. En imagerie une période de quelques heures maximum est idéale tandis qu'une période pouvant atteindre plusieurs jours est nécessaire pour la thérapie.

L'activité spécifique

Exprimée en Bq/g, elle reflète la pureté de l'isotope obtenu. Selon son mode de production l'isotope est obtenu pur, sans entraîneur (on parle alors d'obtention NCA, « no-carrier added ») ou sous forme d'un mélange d'isotopes (CA, « carrier added »). Une production à activité

spécifique élevée permet d'injecter plus de radionucléide sans que des effets secondaires soient provoqués par les contaminants.

La filiation

Pour être utilisé en imagerie, un radioélément doit conduire par décroissance à un élément fils stable. En effet, si le produit de la décroissance décroît également en émettant un rayonnement hautement énergétique, l'acquisition risque d'être parasitée et la qualité d'image s'en ressentira.

Le coût et la disponibilité

Les radionucléides utilisés pour la fabrication des radiopharmaceutiques sont produits pour certains dans des réacteurs nucléaires, ou dans des synchrotrons, pour d'autres via des générateurs portables. Dans le premier cas, la production est très coûteuse, et la disponibilité limitée car leur production impose de réaliser la manipulation à proximité du réacteur ou du cyclotron. Les générateurs portables sont beaucoup plus attrayants de par leur coût et leur grande disponibilité. Ils consistent en une colonne séparative qui permet d'éluer le radionucléide désiré à partir du radionucléide père adsorbé en tête de colonne. C'est le cas par exemple du générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. Récemment la « crise du technétium » a mis en lumière les problèmes de disponibilité : avec les arrêts effectués ou à prévoir des deux plus gros réacteurs producteurs de Molybdène (le réacteur NRU au Canada qui produisait en 2007 environ 45% de l'approvisionnement mondial, victime d'une panne, a été mis à l'arrêt en mai 2009, et le réacteur HFR de Petten (Pays-Bas) est en maintenance depuis février 2010), la production de molybdène médical se voit amputée de 75%. Malgré leurs efforts, les réacteurs Br2 (Belgique), Osiris (France), Safari (Afrique du Sud) n'ont pas la capacité pour compenser cette pénurie. Actuellement, tous les réacteurs produisant le molybdène ont plus de 40 ans, ce qui occasionne des périodes longues d'entretien et la disponibilité du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ s'en ressent. En moins de deux ans, le prix d'un générateur portable de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a doublé. Néanmoins, cette situation ne devrait pas durer et ne remet pas en cause l'intérêt et l'utilisation du technétium en médecine nucléaire.

I.1.2.b. Le radionucléide idéal

Du point de vue des propriétés chimiques, les radionucléides utilisés en imagerie et en thérapie doivent donc idéalement répondre aux critères indiqués dans le tableau I.4. Comme l'indique ce tableau, ^{99m}Tc et $^{186}\text{Re} / ^{188}\text{Re}$ sont des éléments de choix pour ces applications.

	Imagerie	Thérapie
Rayonnement émis	γ ou β^+	α , β^- , voire Auger
TEL	Faible	Elevé à courte distance Faible à longue distance
Demi-vie	4 à 8h	10h à plusieurs jours
Activité spécifique	Elevée	
Filiation	Isotopes fils stables	
Production	Générateur	
Radionucléides les plus courants	^{99m}Tc , ^{111}In , ^{67}Ga (SPECT) ^{18}F , ^{68}Ga (TEP)	^{131}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re (β^-) ^{225}Ac , ^{213}Bi (α)

Tableau I.4.: Propriétés idéales des radionucléides utilisés en médecine nucléaire

Le choix d'un radionucléide doit aussi tenir compte de ses propriétés chimiques. Le marquage doit en effet être rapide, s'effectuer en une étape, et être quantitatif. En effet, la demi-vie faible des radionucléides utilisés en imagerie interdit toute synthèse longue.

Enfin, on s'intéressera plus volontiers aux radionucléides ayant une aptitude à former des complexes stables dans les conditions biologiques afin que les radiopharmaceutiques associés atteignent leur cible sans dégradation.

I.1.3 Du radionucléide au radiopharmaceutique

Un radionucléide seul n'a en général aucune affinité pour une cible particulière. Dans certains cas, le radionucléide va être capturé et accumulé par un organe ou une zone pathologique (ex : tumeur) du fait de son métabolisme accéléré, mais cette concentration ne relève pas d'une

réelle spécificité. C'est le cas par exemple pour ^{131}I et TcO_4^- qui s'accumulent naturellement au niveau de la thyroïde [1]. Pour réaliser des radiopharmaceutiques, il convient de développer des structures complexant les radionucléides qui leurs confèrent diverses propriétés telles qu'une meilleure stabilité dans le milieu circulant ou une affinité pour une cible thérapeutique particulière (tissu, tumeur, ...). Deux approches très différentes existent : le marquage covalent et le marquage par complexation du radionucléide.

I.1.3.a. Marquage covalent.

Il met en jeu des isotopes radioactifs d'éléments présents naturellement dans les molécules biologiques tels que ^3H , ^{11}C , et ^{15}O qui peuvent être introduits par substitution isotopique, ou des éléments pouvant être facilement introduit de façon covalente sur les structures comme ^{18}F , ^{131}I . Ce type de marquage présente l'avantage majeur de modifier très peu la structure de la molécule utilisée comme vecteur. Les radioéléments utilisés ne sont pas disponibles à partir de générateurs mais produits à partir de cyclotrons, ce qui constitue une contrainte. Le cas de ^{18}F , néanmoins, est différent puisqu'il est possible d'approvisionner journallement les hôpitaux.

A titre d'exemple on peut citer le ^{18}F -FDG (fluoro desoxyglucose) qui est très utilisé pour visualiser par TEP le métabolisme du glucose anormalement important dans les cellules tumorales [33, 41], ou la ^{11}C -méthionine utilisée pour visualiser la synthèse de peptides *in vivo* [42, 43] (Fig. I.5.). Les méthodes de marquage de ces deux composés sont décrites à la figure I.6. Le marquage du FDG s'effectue actuellement en deux étapes : fluoration par le $^{18}\text{F}_2$ marqué suivie d'une hydrolyse acide de l'atome de fluor labile. La ^{11}C -méthionine est préparée par formation du thioéther de méthyle. L'iodure de méthyle [^{11}C]MeI utilisé dans la réaction est préparé par réduction de [^{11}C]CO₂ par LiAlH₄.

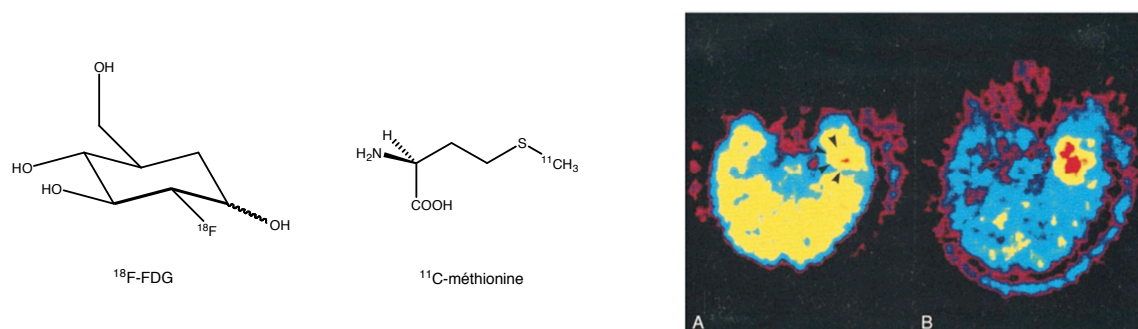


Fig. I.5. : Structures de de deux radiopharmaceutiques mettant en jeu un marquage covalent et exemple de clichés obtenus chez un patient souffrant d'une tumeur cérébrale avec le ^{18}F -FDG (A) et la ^{11}C -méthionine (B).

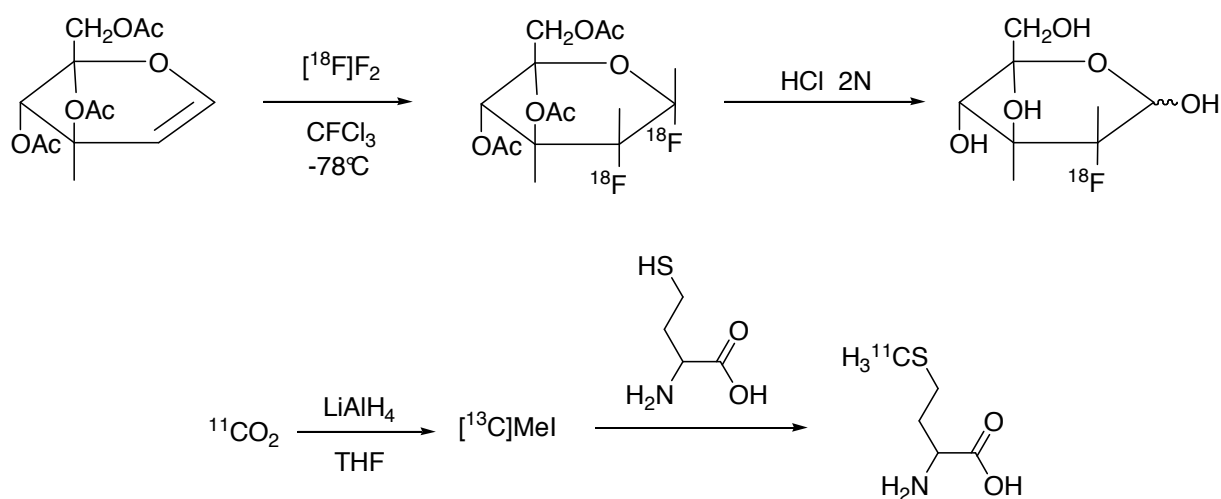


Fig. I.6. : Synthèse du ^{18}F -FDG [44] et de la ^{11}C -méthionine [45]

Parmi les radioéléments disponibles pour la réalisation de traceurs, le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ présente de nombreux avantages, comme nous le verrons par la suite. C'est un émetteur γ présentant des caractéristiques physiques idéales pour l'imagerie, disponible sous forme de générateur portable et à un coût très abordable. C'est pour ces raisons que nous avons choisi d'étudier les traceurs technétiés.

I.1.3.b. Marquage par complexation du radionucléide

Les radiopharmaceutiques obtenus par complexation du radionucléide peuvent être classés en plusieurs catégories comme indiqué à la Fig. I.7. dans le cas particulier du technétium. Dans cette partie, nous allons mettre en évidence les différences entre ces catégories.

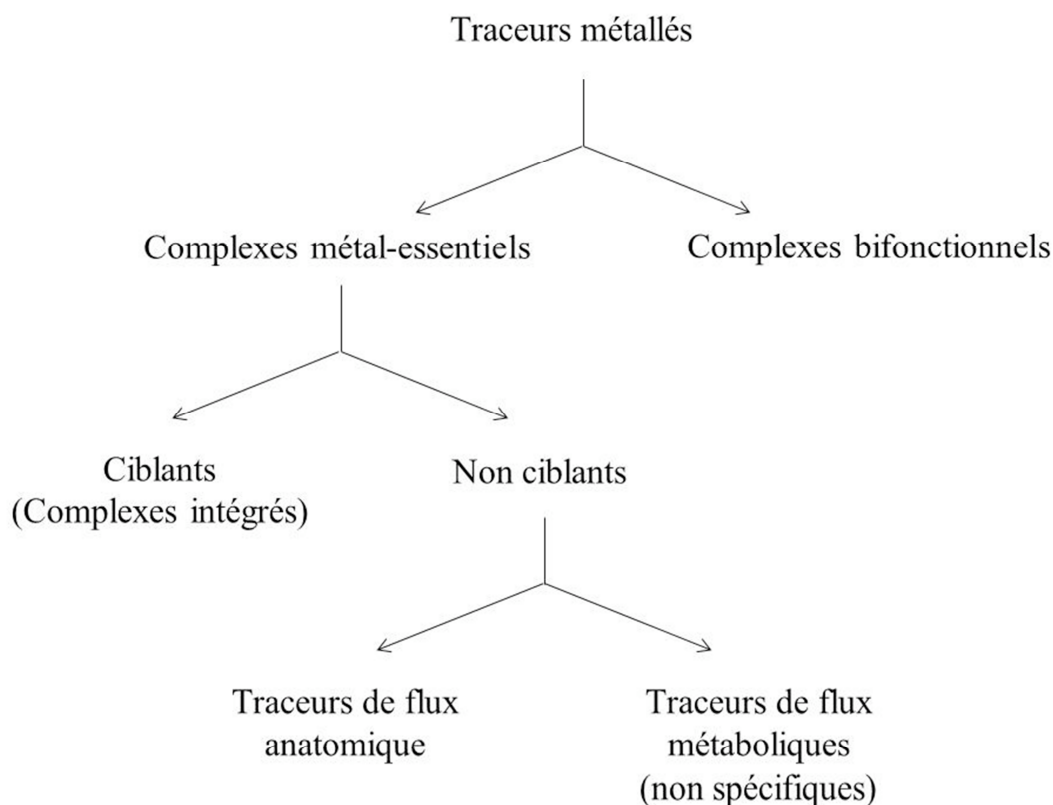


Fig. I.7. : Les différentes catégories de radiopharmaceutiques obtenus par complexation d'un radioélément.

On distingue deux grandes catégories de radiopharmaceutiques préparés par complexation. Les complexes de type « metal-essentiels » et les complexes bifonctionnels.

Les complexes metal-essentiels

Dans ce premier type de radiopharmaceutiques, le métal occupe une position centrale. Il est complexé par un ligand pouvant améliorer sa stabilité *in vivo* et/ou lui conférer une affinité pour un tissu particulier.

Complexes métal essentiels ciblant

Lorsque le ligand est fonctionnalisé, on parle de complexes intégrés. Dans ces structures le métal joue le double rôle de radionucléide et d'agent structurant pour le radiopharmaceutique. En l'absence du métal, la structure n'a habituellement que peu d'affinité pour la cible. Lorsque le métal est complexé, les groupements fonctionnels portés par le ligand adoptent une disposition spatiale adaptée à la reconnaissance par la cible. La structure chélatant le métal est donc incluse dans la structure ciblant.

Divers radiopharmaceutiques de ce type ont été étudiés avec des résultats assez variables. L'exemple le plus visuel de cette approche se trouve dans le domaine des stéroïdes. Plusieurs études ont en effet été réalisées dans le but de développer des mimes de stéroïdes afin de visualiser les cellules tumorales qui surexpriment leurs récepteurs. Dans ces études, les mimes de stéroïdes sont obtenus sous forme de complexes mixtes de type NS/NS représentés à la figure I.8. [46, 47].

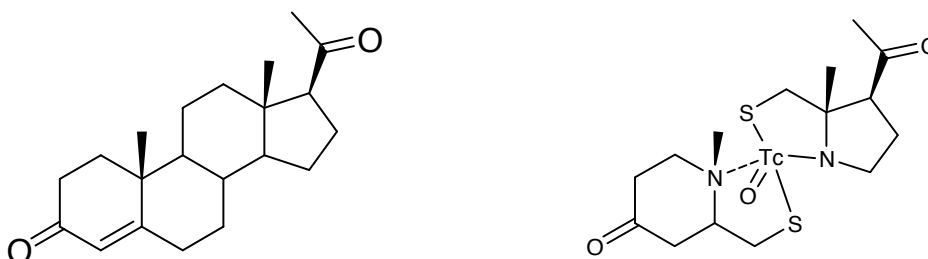


Fig I.8. : Approche intégrée : progestérone naturelle (à gauche) et mime de la progestérone (à droite) [46].

On visualise ici le double rôle du métal puisque, sans lui, les deux parties de la structure ne seraient pas solidaires. Si le radiopharmaceutique obtenu présente sur le papier une structure très proche de celle de la progestérone, la réalité est toute autre. Cette molécule dont la structure diffère trop de la progestérone n'a que peu d'affinité pour le récepteur (10^3 fois moins active que le ligand naturel).

D'autres radiopharmaceutiques intégrés sont obtenus par complexation directe du métal par la molécule biologique. Ce sont les groupes fonctionnels de la molécule utilisée qui assurent la complexation : il n'est pas nécessaire de modifier chimiquement la molécule. Par exemple, dans le cas du marquage de peptides, ce sont les groupements chélatants libres des chaînes latérales des acides aminés qui viennent chélater le radionucléide. On peut notamment citer l'exemple du marquage au ^{99m}Tc de peptides tels que l'adrenomedulline, un peptide vasodilatateur long de 52 acides aminés dont la structure comporte un enchainement de 5 acides aminés formant un cycle grâce à un pont disulfure. Des tests d'affinité réalisés après délétion de ce cycle montrent que ce dernier est indispensable à l'affinité du peptide pour son récepteur. Dans les conditions de marquage direct, en milieu réducteur, le pont disulfure est rompu mais pourtant, l'affinité du peptide marqué est encore élevée. Ceci s'explique par le fait que les thiols libérés par la réduction du pont, agissent dans la chélation du métal, reformant ainsi le cycle en n'affectant que très peu l'affinité [48]. Un autre exemple est celui du marquage d'anticorps monoclonaux par le ^{99m}Tc [49, 50]. Le principal inconvénient de cette méthode est qu'il est en général impossible de connaître la structure exacte du complexe qui est formé (en général différents sites de complexation sont possibles). Dans certains cas, jusqu'à 20% du marquage est non spécifique, c'est-à-dire qu'il ne correspond pas à une insertion du métal au site souhaité et conduit à des sous-produits qui peuvent s'accumuler dans le foie ou altérer l'efficacité du traceur [51].

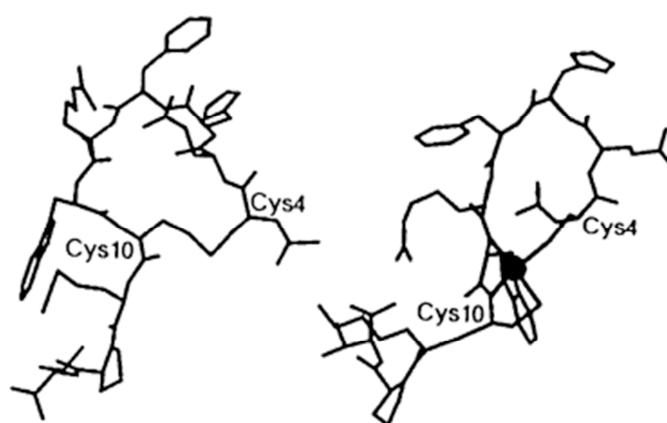


Fig I.9. : Le radiomarquage entraîne de fortes modifications structurelles de l' α -MSH. A gauche : structure de l' α -MSH, à droite : Re-MSH

De plus, l'insertion du radionucléide dans la structure du vecteur qui s'en trouve modifiée entraîne généralement une perte d'affinité. A titre d'exemple, le marquage direct de l'hormone α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone) a entraîné une forte modification structurale en particulier au niveau de la séquence reconnue par les récepteurs biologiques (Fig. I.9.). Ainsi marquée, la MSH s'est avérée avoir une affinité réduite à 1% de l'affinité de l'hormone libre [52].

D'autres radiopharmaceutiques, préparés dans notre laboratoire ont donné des résultats beaucoup plus concluants. On peut citer par exemple un composé cyclique pseudopeptidique présentant le motif tripeptidique RGD (Fig. I.10.a.). Ce motif est reconnu par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui est surexprimée au niveau des cellules cancéreuses. Ce phénomène sera décrit plus en détail au chapitre 4 de ce manuscrit. Dans cette structure c'est le métal, ici le technétium, qui assure la cyclisation. Son rôle dans la structure tridimensionnelle obtenue est donc primordial. L'affinité de ce composé cyclique pour l'intégrine s'est avérée très intéressante ($IC_{50} = 60$ nm) [53, 54]. Un autre programme développé au laboratoire a permis le développement de ligands de la cyclophiline hCyp-18 (Fig. I.10.b.) qui présentent une affinité pour la protéine comparable à celles préalablement observée dans le cas d'inhibiteurs non marqués [55-57].

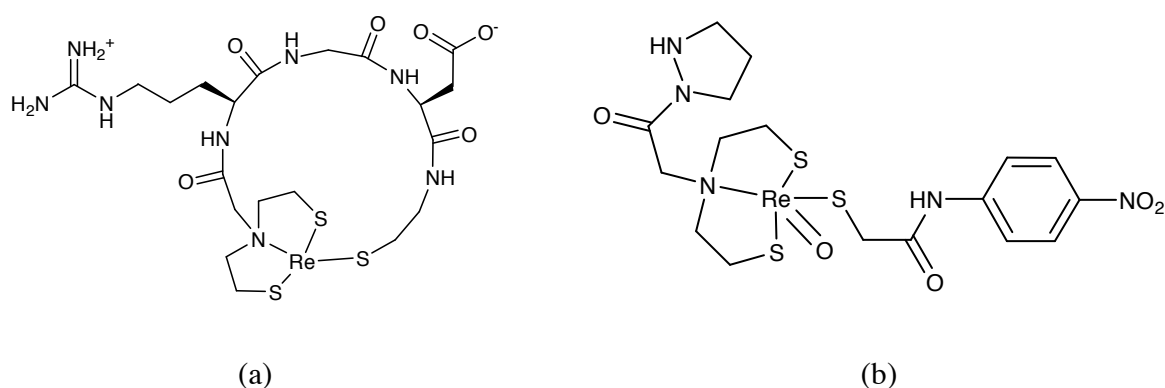


Fig. I.10. : Exemples de complexes metal-essentiels développés au laboratoire : a) pseudopeptide cyclique mime de RGD [53, 54]; b) ligand linéaire de la cyclophiline hCyp-18 [55].

Le développement de complexes de type « metal-essentiels » ciblant est une approche élégante qui se heurte pour l'heure à certaines limites liées à la chimie employée dans les synthèses, aux pertes d'affinité induites par la présence du métal qui vient déformer la structure de manière difficilement prédictible, et l'introduction du cœur métallique (TcO^{3+} par exemple) qui modifie l'hydrophilie du composé et donc sa biodistribution.

Complexes métal essentiels non-ciblant

Dans les complexes de cette catégorie, le rôle du ligand n'est pas de conférer des propriétés ciblant au radiopharmaceutique mais de lui assurer une stabilité élevée en milieu biologique. La biodistribution du complexe ainsi formé est liée à ses propriétés physicochimiques (taille, charge, lipophilie, ...) plutôt qu'à une affinité structurale pour la cible. Parmi ces complexes, les traceurs de flux métaboliques vont être accumulés et permettront de visualiser certaines fonctions métaboliques dans l'organisme. D'autres sont simplement transportés par le milieu circulant et permettent de visualiser des écoulements (irrigation cérébrale, écoulements intracardiaques, ...) : ce sont des traceurs de flux anatomiques.

Parmi les traceurs de flux anatomiques, on peut citer le Myoview ou ^{99m}Tc -Tetrofosmin [58-60] et le Cardiolite ou ^{99m}Tc -Sestamibi [61, 62] ciblent le cœur (figure I.11.a et b) et sont fréquemment utilisés lors d'exams cardiaques. Après injection, le patient est soumis à un exercice physique et l'imagerie permet de visualiser l'activité des deux ventricules cardiaques afin de déceler une éventuelle anomalie [63]. Le complexe $[^{99m}TcO(MAG_3)]^-$ (figure I.11.c) présente une accumulation très forte au niveau des reins et extrêmement réduite dans le foie [64]. Il est utilisé pour la mise en évidence d'insuffisances rénales [65] en se basant sur les variations locales de sa biodistribution [66].

Les traceurs utilisés pour visualiser l'irrigation cérébrale ont un fonctionnement plus complexe car ils visent à traverser la barrière hémato-encéphalique sans être rétrodiffusés à travers celle-ci par la suite. C'est ce que parviennent à faire deux radiopharmaceutiques non dirigés : le Ceretec (^{99m}Tc -HMPAO, [67, 68]) et le Neurolite (^{99m}Tc -EDC) (structures figure I.11.d et e). Dans le cas du Neurolite, il a été montré qu'un mécanisme enzymatique provoque l'hydrolyse d'un des groupements esters de la forme L-L du complexe rendant celui-ci

suffisamment hydrophile pour ne pas être rétrodiffusé au travers de la barrière hémato-encéphalique [69, 70]. Quant au Ceretec, c'est une réaction chimique avec le glutathion cérébral qui augmente son hydrophilie et bloque la rétrodiffusion [71].

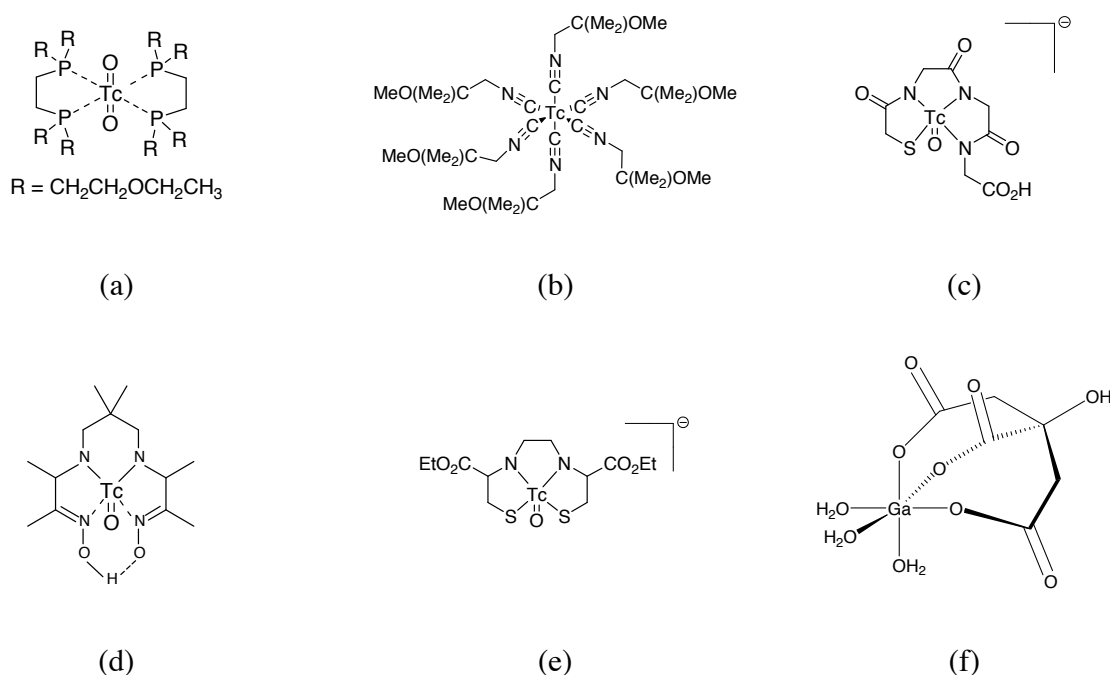


Fig I.11. : Quelques exemples de radiopharmaceutiques non dirigés : (a) Ceretec (^{99m}Tc -HMPAO), (b) Neurolyte (^{99m}Tc -EDC), (c) Mioview (^{99m}Tc -Tetrofosmin), (d) Cardiolite (^{99m}Tc -Sestamibi), (e) [$^{99m}\text{TcO}(\text{MAG}_3)]^-$, (f) ^{67}Ga -Citrate.

Un dernier exemple de cette famille de radiopharmaceutiques est le ^{67}Ga -Citrate (figure I.11.f) qui permet l'imagerie des foyers infectieux [72, 73]. Son mode d'action est différent puisqu'il repose sur une transchélation du gallium vers la transferrine exprimée au niveau de l'infection. Ce n'est donc pas le complexe du citrate qui est observé mais le complexe ^{67}Ga -transferrine [74, 75]. Ce type de radiopharmaceutiques représente l'essentiel des traceurs actuellement sur le marché.

Les traceurs de flux dits métaboliques mettent en jeu une molécule destinée à être métabolisée par l'organisme (peptide, etc...) qui est marquée par un radioélément. Si le métabolisme de ces composés est accentué lors de pathologies, ils peuvent être utilisés pour préparer des traceurs. C'est le cas du Fluorodesoxyglucose marqué au ^{18}F . Les cellules tumorales

métabolisent beaucoup plus de glucose que les cellules quiescentes afin d'assurer leur croissance. Le [^{18}F]-FDG est donc très souvent utilisé en imagerie TEP pour la détection de tumeurs.

Les complexes bifonctionnels

C'est l'approche qui est actuellement la plus répandue pour le développement de nouveaux agents d'imagerie. Elle est souvent appelée approche BFCA (BiFonctionnal Chelating Agent). Son principe consiste à relier une molécule ayant une affinité prouvée pour la cible choisie (molécule ciblante) à un motif de complexation du radionucléide, via un linker de taille et type variables (fig. I.12.).

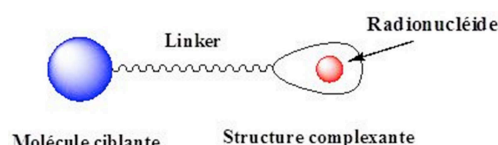


Fig. I.12. : Principe de l'approche bifonctionnelle

Le choix de la molécule ciblante est vaste : il peut s'agir d'un anticorps ou simplement d'un fragment, d'un ligand peptidique ou non-peptidique. La présence d'un linker de taille variable permet de séparer les deux parties du radiopharmaceutique et de minimiser ainsi au maximum les interférences de la structure chélatante sur l'affinité de la molécule ciblante pour son substrat. De plus, le choix de la structure du linker (PEG, polylysine...) peut orienter le mode d'élimination du composé vers les reins ou améliorer sa solubilité et sa biodistribution, modifiant ainsi sa pharmacocinétique [76]. Un exemple d'utilisation de linker métabolisable a été décrit dans la littérature. Cette approche permet une élimination accrue du composé du milieu circulant [77].

Parmi les inconvénients de cette approche, la taille importante des composés obtenus est gênante puisqu'elle augmente la probabilité de générer une réponse immunitaire de l'organisme. D'autre part, ces traceurs ne peuvent cibler que des récepteurs membranaires car leur taille limite fortement leur passage dans le milieu intracellulaire [78]. Il est également nécessaire d'identifier sur le vecteur un site où l'on puisse fixer le linker sans en altérer l'affinité. Le choix de ce site peut être guidé par la modélisation moléculaire ou des études de relation structure-activité, mais doit tenir compte de la faisabilité chimique de cette fixation et de la régiosélectivité de celle-ci (par exemple, le couplage régiosélectif du linker à une lysine précise au sein d'une protéine est difficile). Enfin la disponibilité des molécules vectrices peut s'avérer être un obstacle au

développement de ces approches et nécessiter par exemple la mise au point de nouvelles voies de synthèse.

Une autre limitation de l'utilisation de ce type de composé réside dans leur application pour la réalisation de kits utilisés en milieu hospitalier. Contrairement à un complexe « metal-essentiel » où le ligand peut être introduit en forte quantité puisqu'il ne présente aucune affinité pour la cible en l'absence de métal, un large excès de ligand fonctionnel non marqué peut entrer en compétition avec le traceur et diminuer son efficacité. Il est alors essentiel d'améliorer les conditions de marquage pour tendre vers la stœchiométrie

Les applications de ce type de composés sont très nombreuses et nous avons donc choisi d'en présenter ici quelques-unes à titre d'exemple. La première utilisation se situe dans le cadre de l'imagerie des cancers du sein et de la prostate. Ces deux types de tumeurs sont caractérisés par une surexpression des récepteurs aux stéroïdes (oestrogènes et progestérone respectivement). Ceux-ci sont donc une cible de choix pour des agents de contraste et la synthèse d'analogues marqués de stéroïdes a fait l'objet de nombreuses études. En particulier, plusieurs tentatives de marquage de la progestérone ont été réalisées. Parmi celles-ci on retiendra deux approches BFCA indiquées à la figure I.13. [79-81]. La première approche (fig. I.13.b.) consiste en une structure de type N_2S_2 (cf I.2.3.b.) complexant le technétium reliée via un linker benzylique à un analogue de progestérone. Cette molécule est destinée à l'imagerie.

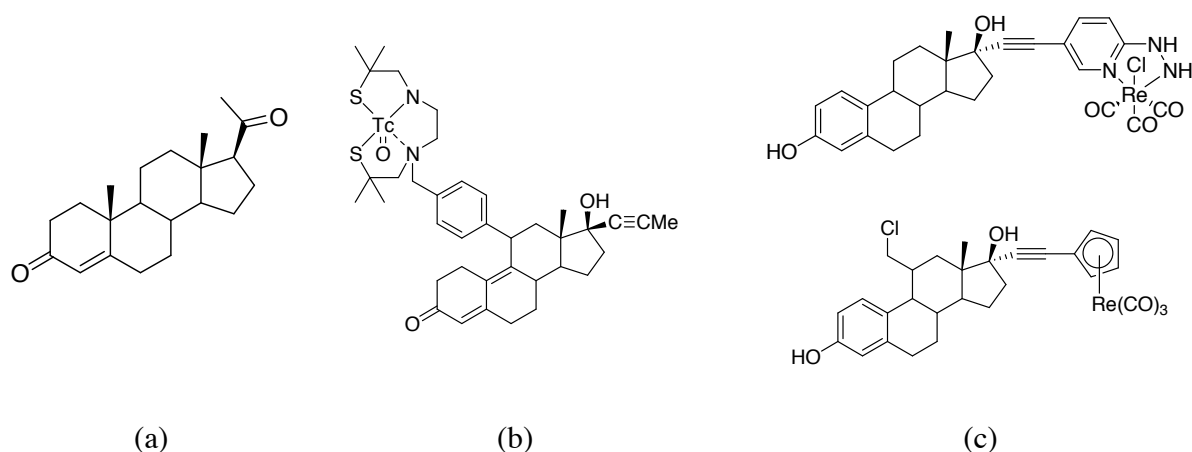


Fig I.13. : Illustration de l'utilisation de l'approche BFCA dans l'imagerie et le traitement du cancer de la prostate.(a) Progestérone, (b) Fonctionnalisation pour l'imagerie, (c) Fonctionnalisation pour la thérapie

Des composés pour la thérapie sont également étudiés, en particulier des complexes de rhenium, analogue de technétium (fig. I.13.c.). A l'heure actuelle, ces composés sont toujours en développement, peu d'entre eux ayant donné des résultats suffisamment satisfaisants pour envisager une étude clinique chez l'homme. Ces résultats en demi-teinte montrent la complexité réelle de cette stratégie qui contraste avec l'apparente simplicité du concept de base.

D'autres exemples intéressants se situent dans le domaine de l'imagerie du système nerveux. Au niveau synaptique, la transmission de l'influx nerveux est assurée par un échange de neurotransmetteurs. La dopamine est l'un d'eux et permet d'activer les récepteurs dopaminergiques postsynaptiques. La cocaïne est capable de bloquer ces récepteurs dopaminergiques et constitue donc une cible intéressante pour l'imagerie du système nerveux. Ainsi, des analogues de la cocaïne ont été développés dans le but de diagnostiquer précocement la maladie de Parkinson, c'est le cas du Tc-TRODAT (Fig. I.14.) [82, 83] utilisant lui aussi le technétium complexé par une structure de type N_2S_2 (Fig. I.14.).

La méthode BFCA peut également être appliquée au marquage d'anticorps monoclonaux pour une utilisation en radioimmunologie ou en imagerie lorsque l'on cible les antigènes exprimés à la surface des cellules tumorales [84]. La structure complexante est alors fixée par liaison peptidique à un acide carboxylique situé sur une des chaînes latérales de l'anticorps.

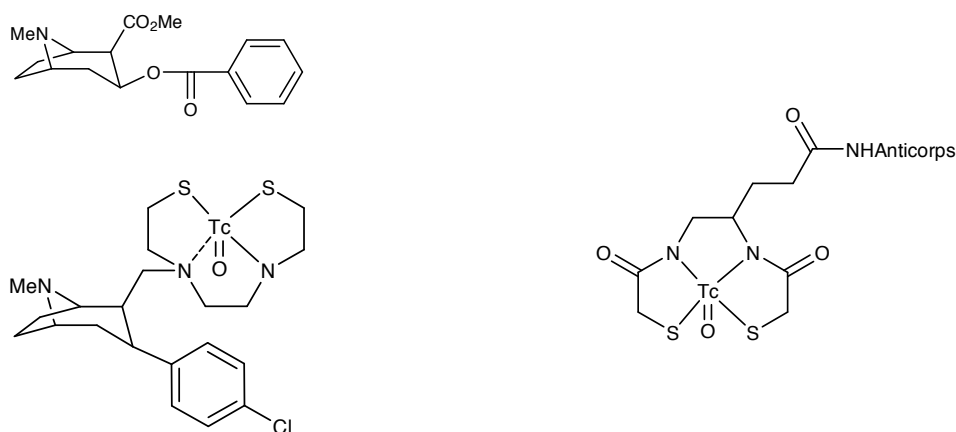


Fig. I.14. : Illustration de l'approche BFCA. Imagerie de la maladie de Parkinson : cocaïne (gauche haut) et Tc-TRODAT (gauche bas) et radiomarquage d'anticorps monoclonaux (à droite)

Enfin, dans le cadre de l'imagerie tumorale, on peut citer les approches visant à imager la néoangiogenèse tumorale en ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui est une protéine indispensable à la vascularisation des tumeurs [85, 86]. Cette protéine surexprimée à la surface des cellules tumorales reconnaît particulièrement l'enchaînement peptidique Arg-Gly-Asp (RGD, Fig. 15.a.) qui est très souvent utilisé comme vecteur [87, 88]. Le pentapeptide RGDfK en particulier fait l'objet de nombreuses études [89] (Fig. I.15.b.) qui seront évoquées plus précisément au chapitre IV.

Le marquage de l'octréotide, un peptide cyclique présentant une affinité pour les récepteurs de la somatostatine est également étudié pour l'imagerie des tumeurs neuroendocrines (fig. I.15.c.) [90].

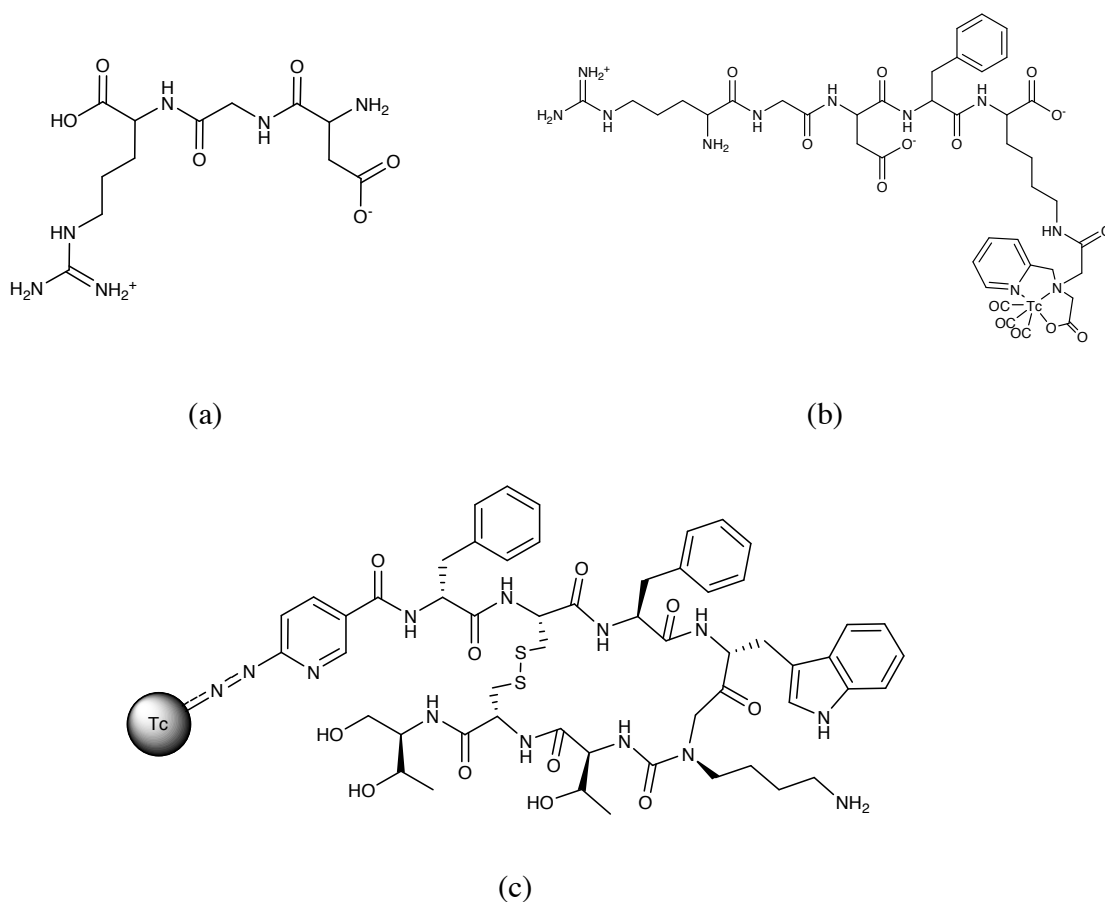


Fig. I.15.: Marquage de peptides par voie BFCA. (a) tripeptide RGD, (b) RGDfK-PADA-^{99m}Tc(CO)₃ [89] ; (c) Structure générale de l'octréotide marquée au technétium [90].

Malgré la relative facilité de marquage au technétium, la conception de traceurs demeure empirique puisqu'il est relativement difficile de prévoir leur comportement *in vivo*. Le développement d'un traceur utilisable chez l'homme relève donc souvent d'une longue et coûteuse optimisation.

Au chapitre IV de ce manuscrit, nous nous intéresserons à la préparation de traceurs technétiés intégrés et bifonctionnels de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en utilisant une approche combinatoire complémentaire du caractère empirique du développement de traceurs.

En effet, le technétium apparaît, tant sur ses propriétés radiochimiques que par sa facilité d'utilisation, comme un « radioisotope idéal » pour l'imagerie diagnostique. Ses nombreuses analogies avec le rhénium sont un atout supplémentaire, avantages qui vont être à présents développés.

I.2. Technétium et rhénium

I.2.1 Le technétium

Le technétium est le radioélément le plus utilisé pour la réalisation des radiopharmaceutiques couramment utilisés en milieu hospitalier (80 à 85% des actes médicaux d'imagerie moléculaire). En 2003, 20 radiopharmaceutiques utilisant ce radioélément étaient couramment employés aux Etats-Unis sur un total de 50 disponibles (51 en 2005) [91].

I.2.1.a Généralités, découverte, et production

Découverte

En 1869, D. Mendeleïev réalise la classification périodique des éléments. Il prédit alors l'existence d'éléments inconnus à l'époque mais indispensables pour combler les cases de la classification restées vides. Dès lors, les recherches se multiplient pour identifier ces éléments et l'on découvre le gallium (1875), le scandium (1879), le germanium (1886)... Les progrès technologiques et en particulier le développement des cyclotrons permettent en 1937 à Carlo Perrier et Emilio Segrè d'isoler l'élément de numéro atomique 43 à partir d'un échantillon de

molybdène ayant été bombardé par des deutériums [92, 93]. En 1947, dans un très court article publié dans le journal Nature, C. Perrier et E. Segrè proposent le nom de « technétium » pour cet élément [94]. Ce nom, issu du grec, signifie artificiel. Le technétium est en effet le premier élément obtenu artificiellement en cyclotron. Théoriquement, le technétium ne peut pas exister à l'état naturel car tous ses isotopes présentent une demi-vie très faible par rapport à l'âge de la terre. Néanmoins, cet élément fut identifié et isolé à l'état naturel dans des mines d'uranium, la fission spontanée de l' ^{238}U , générant environ 1 ng de technétium par kg d'uranium. Le technétium existe donc aussi à l'état naturel mais en très faibles quantités [92, 95].

Production

Aujourd'hui, le technétium utilisé pour les examens d'imagerie médicale est obtenu de deux façons : en cyclotron par bombardement de molybdène, ou en réacteur nucléaire par fission de l'uranium (Tableau I.5.). Cette deuxième méthode est celle utilisée pour l'essentiel de la production. Elle permet d'obtenir ^{99}Mo qui se désintègre naturellement en technétium sous forme de deux isotopes : ^{99g}Tc (12.4%) et ^{99m}Tc (87.6%) qui décroît pour conduire à ^{99g}Tc . ^{99g}Tc se désintègre ensuite avec une période extrêmement longue ($2,13 \cdot 10^5$ ans) pour donner ^{99}Ru . (Fig. I.16.).

Réacteur	Localisation	Puissance (MW)
NRU	Canada	135
HFR	Pays-Bas	115
BR-2	Belgique	100
Safari	Afrique du sud	100
Osiris	CEA Saclay, France	70

Tableau I.5. : Les principaux réacteurs producteurs de ^{99}Mo

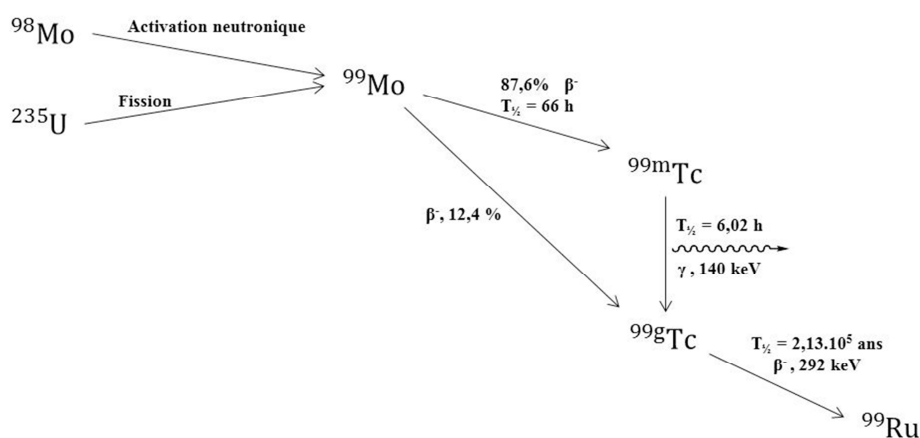


Fig. I.16 : Obtention et décroissance du ^{99}Mo et du ^{99m}Tc

I.2.1.b. ^{99m}Tc

Le ^{99m}Tc correspond à 87.6% des produits de décroissance du ^{99}Mo . Dans la plupart des cas, un radioélément issu de la décroissance (α ou β) d'un élément père est obtenu dans un état excité à durée de vie extrêmement courte (de l'ordre de la picoseconde) et n'est donc pas observable. Dans le cas du technétium, la durée de vie de l'état excité est beaucoup plus élevée (demi-vie : 6,02 h). On parle alors d'état métastable (« m ») qui se stabilise vers un état plus stable (« g » ou ground state, ^{99g}Tc). Ce phénomène s'accompagne de l'émission d'un rayonnement γ à TEL faible, d'énergie $E = 140$ keV. Toutes ces propriétés font de ^{99m}Tc un radionucléide idéal pour l'imagerie médicale.

Un radioélément disponible en générateur portable

Outre ses propriétés physiques, c'est sa disponibilité qui fait du ^{99m}Tc le radionucléide le plus utilisé actuellement. Il est en effet disponible sous forme de générateurs $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$ (Fig. I.17.) mis au point en 1958 par Tucker et Greene, commercialisés à un prix attractif et très facilement transportables. Pour les expériences impliquant le ^{99m}Tc réalisées dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé des générateurs ELUMATIC-III produits par la société CisBio International (Fig. I.16.a.). Ce sont des générateurs calibrés à 4 GBq respectant tous les critères imposés par la pharmacopée européenne (efficacité d'élution, pureté du radionucléide élué, pureté radiochimique (supérieure à 95%), pH = 5 – 7, stérilité) [96].

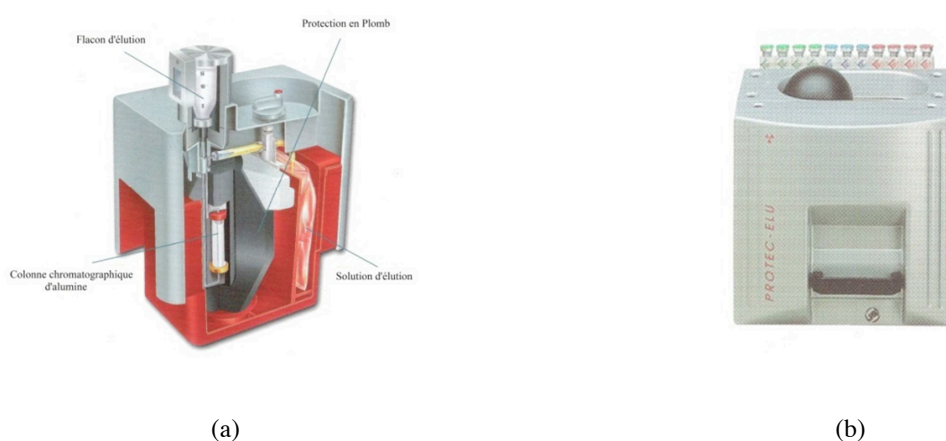


Fig. I.17. : Générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (ELUMATIC-III, CisBio International). (a) Coupe latérale du générateur, (b) Caisson de protection anti-radiations

Ce générateur qui est muni d'une première épaisseur de plomb afin de protéger l'expérimentateur permet d'éluer une solution de pertechnétate de sodium ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) pendant 7 à 10 jours grâce à une colonne chromatographique d'alumine sur lequel a été fixé du $^{99\text{m}}\text{Mo}$. La solution éluée étant très diluée (de 10^{-7} à 10^{-9} M), la formation des radiopharmaceutiques par complexation s'effectue donc en très large excès de ligand. Le complexe est alors obtenu dans des concentrations nanomolaires qui rendent difficile toute détection par UV. Nous utilisons donc pour étudier les solutions de complexes une radio-HPLC, constituée d'une HPLC analytique couplée à un détecteur de radioactivité. Une élution régulière du générateur est importante de façon à limiter la quantité de $^{99\text{g}}\text{Tc}$ résiduel issu de la décroissance naturelle de ^{99}Mo dans la solution éluée [97, 98].

Le générateur est placé dans un conteneur qui constitue un deuxième blindage au plomb (Fig. I.17.b). Une 3^{ème} barrière de protection constituée d'un mur de plomb disposé sur la paillasse protège encore le manipulateur. A titre d'information, le débit de dose ($\mu\text{Sv}\cdot\text{h}^{-1}$) enregistré sans blindage à 1m du générateur est donné par : $0.71 \times \text{Activité en GBq}$.

Malgré son apparente simplicité d'utilisation, ce type de générateur doit être manipulé dans des conditions très strictes de sécurité et de radioprotection par un personnel habilité et est stocké dans des salles à accès réglementé. Un suivi de la dose reçue par le manipulateur est effectué par des services spécialisés (IRSN) grâce à un système de dosicards, relevés régulièrement. Enfin, un protocole d'évacuation des déchets impose de les laisser décroître complètement (environ 10 à 15 jours) avant une élimination par voie classique.

I.2.1.c. $^{99\text{g}}\text{Tc}$

Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ décroît avec une demi-vie de 6.02 h vers un état beaucoup plus stable, le $^{99\text{g}}\text{Tc}$ où « g » signifie « ground ». Celui-ci se désintègre ensuite avec une période de 213 000 ans en émettant un rayonnement β^- ($E = 294$ keV). Il est produit en réacteur en tant que produit de fission de l'uranium: un réacteur de 100MW produit chaque jour environ 2.5g de $^{99\text{g}}\text{Tc}$ soient 6% des produits de fission. De par sa très longue période radioactive, il peut être considéré comme « froid » et nécessite des conditions d'utilisations moins drastiques que pour son parent métastable. Ainsi il peut être utilisé en quantités bien supérieures (de l'ordre du milligramme).

Néanmoins sa période et son énergie sont telles qu'il doit être utilisé avec précaution afin d'éviter la contamination récurrente des laboratoires.

Le ^{99g}Tc est extrêmement utile. D'une part, il permet de réaliser des complexes « froids » de technétium que l'on peut ensuite caractériser par les méthodes classiques : RMN, MS, LC-MS. On l'utilise également pour déterminer les caractéristiques structurales des complexes par cristallographie. D'autre part, il permet d'effectuer les études *in vivo* sur des mélanges homogènes. La préparation des solutions injectables en mélange $^{99m}\text{Tc} + ^{99g}\text{Tc}$ étant réalisée en proportions stoechiométriques, elle évite l'injection simultanée de complexe et de ligand libre. Les protocoles de complexation similaires et la possibilité de réaliser des complexes homogènes constituent deux arguments de poids pour l'utilisation du ^{99g}Tc lors de la réalisation des complexes froids plutôt que du rhénium comme cela est souvent proposé.

^{99m}Tc et ^{99g}Tc sont les isotopes du technétium les plus importants car les plus utilisés et étudiés. On dénombre 28 autres isotopes allant de ^{90}Tc à ^{110}Tc dont ^{94m}Tc , émetteur β^+ ($E = 244$ eV, $t_{1/2} = 52$ min) [99, 100] dont l'utilisation en TEP est extrêmement limitée, ^{18}F lui étant préféré.

I.2.2 Le Rhénium

I.2.2.a. Généralités

Découvert en 1925 par Walter Noddack, Ida Tacke et Otto Berg, le rhénium est l'un des éléments naturels les plus rares sur terre. Il est aussi l'un des quelques éléments à exister sous forme d'un mélange de deux isotopes stables ^{185}Re (37,4%) et ^{187}Re (62,6%). Ce métal blanc très dur, possède une très bonne résistance à l'usure et à la corrosion. Il est donc utilisé, brut ou en alliages, pour la fabrication d'instruments de précision, de thermocouples, et de composants électroniques.

Le rhénium est utilisé en chimie en raison de quelques propriétés très particulières [101] :

- Il peut être observé à des états redox allant de -I à +VII ($C_5Me_5ReO_3$) tout comme le technétium.
- Il peut former des complexes insaturés ce qui rend possible certains mécanismes catalytiques atypiques.

C'est ainsi que son utilisation s'est développée en catalyse dans de multiples domaines de la chimie organique comme, par exemple, l'époxydation des styrènes [102], l'hydrogénation stéréospécifique d'énamides [103], ou l'élongation de chaîne carbonée par addition d'alcyne [104].

I.2.2.b. Technétium et Rhénium, deux éléments de la même famille

Le technétium et le rhénium figurent dans la même colonne (VIIb) de la classification périodique des éléments, ils ont donc des propriétés comparables comme le suggéraient déjà Perrier et Segré en 1937. De plus grâce au phénomène de contraction des orbitales f de la série des lanthanides, ils ont un rayon métallique très proche (tableau I.7). Le rhénium est donc couramment utilisé dans le but de modéliser des complexes

	M = Tc	Re
Numéro atomique	43	75
Configuration électronique	[Kr]4d ⁵ 5s ²	[Xe]4f ¹⁴ 5d ⁵ 4s ²
Rayon métallique (Å)	1.36	1.37
E ₀ (MO ₄ ⁻ /M)	0,48 V	0,37 V
E ₀ (MO ₄ ⁻ /MO ₂)	0,74 V	0,55 V

Tableau I.7.: Quelques propriétés physiques du technétium et du rhénium

du ^{99m}Tc lorsque l'on n'a pas la possibilité d'utiliser le ^{99g}Tc (coût, disponibilité). Il suffit de réaliser l'analogue rhénié du complexe technétié pour effectuer des études en RMN, LC-MS, cristallographie sans se soucier du problème de radioactivité lié au ^{99m}Tc. Néanmoins, une différence persiste entre ces deux éléments au niveau de leurs potentiels d'oxydo-réduction. Les sels de technétium sont plus faciles à réduire que leurs analogues rhéniés [39]. Ceci a une conséquence sur l'efficacité des protocoles de marquage selon le radionucléide utilisé, et peut aboutir à des cinétiques de complexation beaucoup plus lentes par rapport au technétium. Dans ce cas, l'usage de ^{99g}Tc, qui ne présente pas cet inconvénient, est particulièrement intéressant pour la

caractérisation des complexes. Néanmoins, le ^{99g}Tc n'est pas systématiquement utilisé car il est beaucoup moins disponible et nettement plus cher que le rhénium.

I.2.2.c Les isotopes radioactifs du rhénium

Outre ses deux isotopes naturels, le rhénium possède aussi deux isotopes radioactifs : ^{186}Re et ^{188}Re . Tous deux sont des émetteurs β^- et émettent également un rayonnement γ [69]. Ils permettent donc d'imager le traitement thérapeutique. Les propriétés de ces deux isotopes sont résumées dans le tableau I.8.

	Demi-vie (h)	Energie β^- (MeV)	Pénétration dans les tissus (mm)	Energie γ (keV)
^{186}Re	90	1,07	5	137
^{188}Re	17	2,1	11	155

Tableau I.8. : Propriétés physiques des isotopes radioactifs du rhénium.

Ces deux émetteurs β^- peuvent être utilisés en thérapie. Leurs pouvoirs pénétrants différents vont permettre d'agir sur des cibles de différentes tailles. Ainsi on privilégie ^{186}Re pour les cibles de faible taille car son pouvoir pénétrant est faible comparé à celui de ^{188}Re qui sera, quant à lui, utilisé pour des cibles d'un volume plus important. ^{188}Re présente l'énorme avantage d'être disponible sous forme de générateurs portables $^{188}\text{W}/^{180}\text{Re}$. Néanmoins sa demi-vie est relativement courte (17h) et la pureté isotopique des solutions éluées n'est pas optimale pour une utilisation thérapeutique. ^{186}Re est beaucoup moins disponible puisqu'il est obtenu en réacteur par irradiation de ^{185}Re .

Parmi les applications en thérapie de radiopharmaceutiques rhéniés, on peut citer à titre d'exemple ^{186}Re -HEDP (Fig I.18.) qui cible les métastases osseuses apparaissant dans deux tiers des cas de cancers du sein. Dans le cas de métastases osseuses, le patient n'a, en

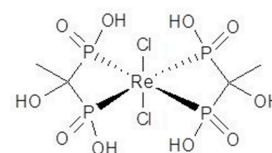


Fig I.18. : ^{186}Re -HEDP

général, qu'une espérance de vie de 2 à 4 ans. Le traitement par radiothérapie n'est pas curatif mais il permet d'atténuer considérablement les douleurs osseuses dont sont victimes 65% des patients [19, 105].

La cinétique plus lente de formation des complexes du rhénium constitue la principale limite à l'utilisation de ce métal dans la production de radiopharmaceutiques. En outre, en raison de ses propriétés redox, le rhénium est oxydé plus rapidement qu'il n'est chélaté par le ligand lors de la formation de complexes. Ceci impose de stabiliser le rhénium à l'état réduit par un ligand échangeable (gluconate, tartrate, etc...) pour former un complexe intermédiaire à partir duquel le complexe désiré est obtenu par transchélation. C'est le marquage indirect (voir aussi au chapitre IV).

I.2.3. Les différents cœurs technétiés et leurs motifs de complexation

Le technétium a une chimie de coordination très riche. De configuration électronique [Kr] $4d^5 5s^2$, ce métal possède pas moins de 9 degrés d'oxydation utilisables (-I à +VII) associés à différents cœurs technétiés.

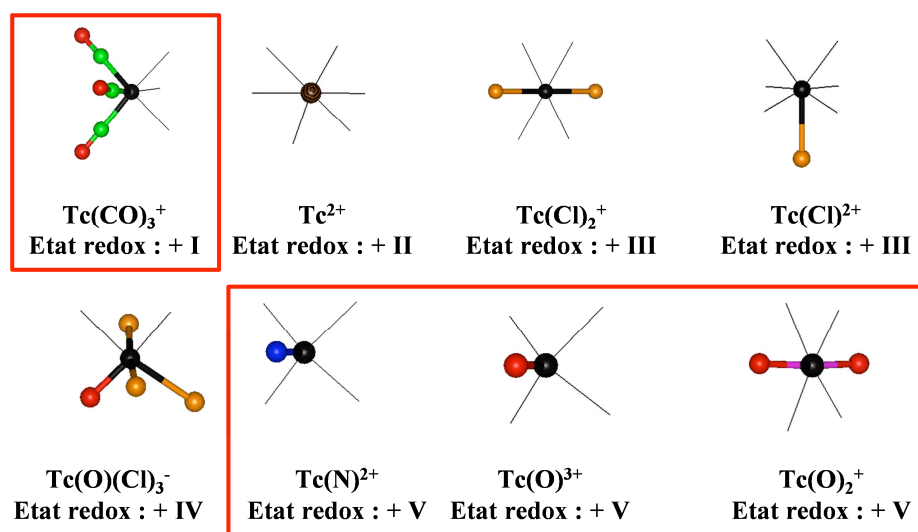


Fig. I.19: Les différents cœurs technétiés correspondant aux degrés d'oxydation +I à +V du technétium. En rouge, les cœurs les plus utilisés pour la préparation de traceurs.

Trois de ces degrés d'oxydation sont stables en milieu aqueux, les six autres nécessitent une stabilisation par un ligand hétéroatomique donneur π . Les plus courants sont TcO_4^- (+VII), TcO^{3+} (+V), ou encore Tc^+ (+I) (Fig. I.19.). Notons que le rhénium présente la même diversité de degrés d'oxydation et de cœurs associés.

I.2.3.a. Le degré d'oxydation +I

Les complexes du technétium au degré d'oxydation +I sont de deux grands types : les complexes « Tc-tricarbonyle » et les complexes à ligands isonitriles.

Les complexes tricarbonyles ont été développés suite aux travaux de l'équipe de Schibli [106-109]. Ils sont obtenus à partir du précurseur hydrosoluble $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, préparé par réduction de TcOCl_4 sous atmosphère de d'oxyde de carbone. En présence de ligands accepteurs π (phosphines, polyaminocarboxyliques, cyclopentadiényle, imidazoles...), ce précurseur permet l'obtention de complexes de Tc(I) plus stables (Fig. I.20.).

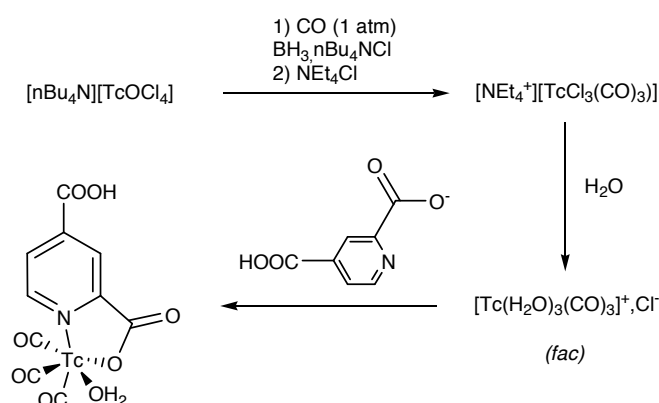


Fig. I.20. : Préparation de complexes Tc-Tricarbonyles [106].

Du point de vue pratique, ces complexes présentent l'intérêt d'être pour la plupart hydrosolubles et de se former facilement. Néanmoins, leur préparation nécessite de travailler sous atmosphère de monoxyde de carbone, qui n'est pas possible dans tous les laboratoires et surtout dans les hôpitaux. Un autre procédé de formation de ces complexes qui ne nécessite pas un travail sous atmosphère de monoxyde de carbone consiste à utiliser des complexes du bores tels que

$K[H_3BCOOH]$ (Fig. I.21.) qui vont libérer par chauffage en milieu acide de molécules de monoxyde de carbone *in situ* [110, 111].

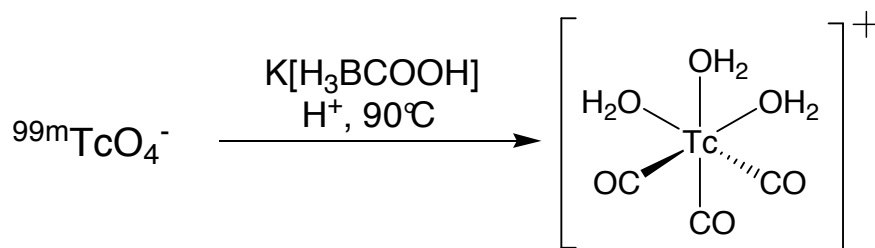


Fig. I.21. : Préparation du précurseur hydrosoluble $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ à l'aide d'une source *in situ* de monoxyde de carbone

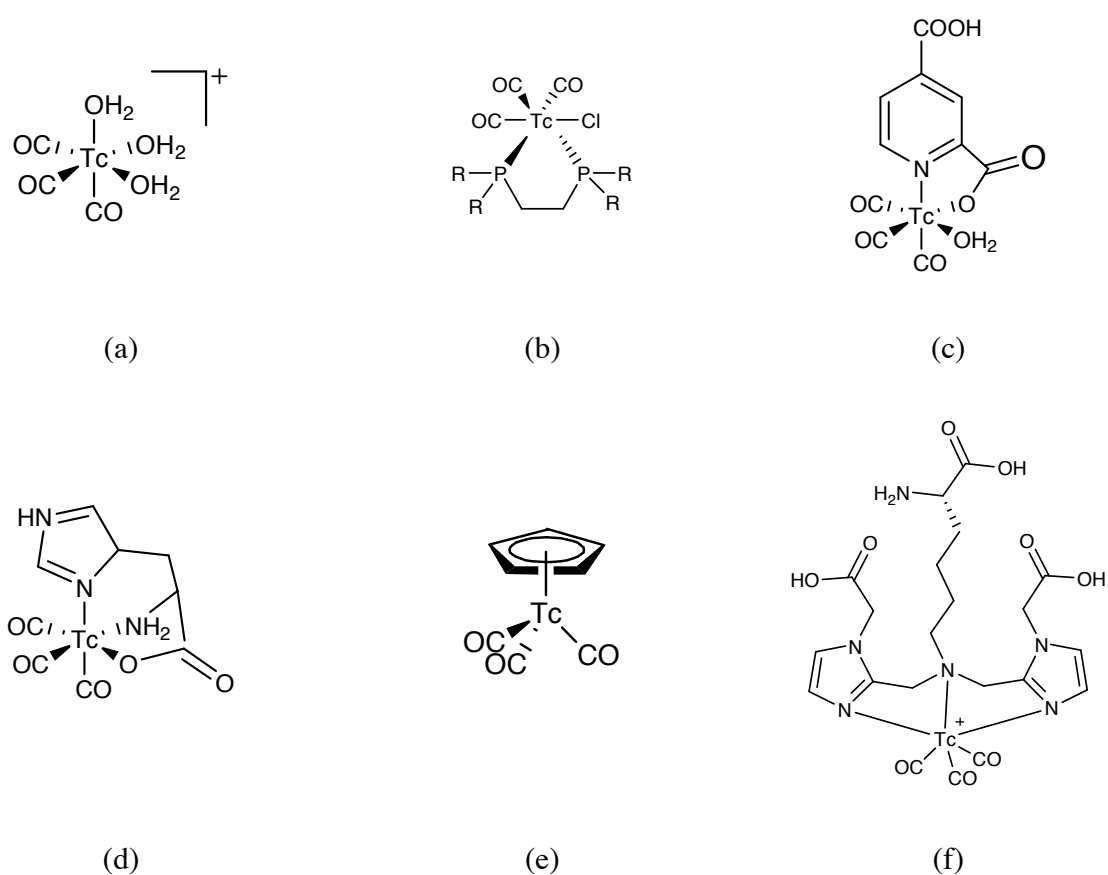


Fig. I.22. : le précurseur hydrosoluble $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ (a) et divers complexes tricarbonyles formés par des ligands phosphiniques (b), polyaminocarboxyliques (c, d), cyclopentadiényles (e), imidazoles (f).

Le complexe $[^{99m}\text{TcCl}(\text{CO})_3(\text{R}_2\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{PR}_2)]$ (fig. I.22.(b)) qui présente des propriétés remarquables de stabilité *in vitro* et d'élimination urinaire, est lui aussi très étudié [112].

Des complexes Tc-tricarbonyles font également l'objet d'approches bifonctionnelles comme dans le cas du marquage de stéroïdes (Fig. I.12.c), ou de petits peptides (Fig. I.14.c).

La famille des complexes à ligands isonitriles regroupe des complexes obtenus quantitativement et très stables [113].

Les isonitriles sont des groupements isoélectroniques du carbonyle et génèrent donc des liaisons π très fortes avec les métaux à bas degré d'oxydation tels que le technétium. Tous ces complexes ont une structure octaédrique. Le représentant le plus fréquent de cette famille est le ^{99m}Tc -Sestamibi (Fig. I.23.). Il s'agit d'un traceur utilisé couramment pour l'imagerie intracardiaque [114, 115].

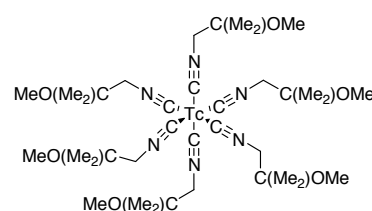


Fig. I.23.: ^{99m}Tc -Sestamibi

I.2.3.b Le degré d'oxydation +V

Le Tc(V) est le degré d'oxydation le plus fréquent. A ce degré d'oxydation, les complexes les plus utilisés ou étudiés actuellement sont essentiellement à cœur oxotechnetium (TcO^{3+}), dioxotechnetium (TcO_2^+) et diazotechnetium ($\text{TcN}_2\text{R}^{2+}$) et nitridotechnetium ($\text{Tc}\equiv\text{N}^{2+}$).

Le cœur TcO^{3+}

Dans cette configuration, les complexes adoptent une structure pyramidale à base carrée dans laquelle le cœur oxotechnetium est en position apicale au-dessus du plan contenant le ou les ligands. Un recouvrement important est possible entre les orbitales d du métal et p de l'oxygène, ayant pour conséquence une liaison TcO courte (1.65 Å). Les ligands mis en jeu sont des ligands donateurs π tels que O, N, S, hétéroatomes présents dans les peptides et les protéines, ainsi que le phosphore.

Les complexes à cœur monooxotechnetium les plus répandus mettent en jeu des ligands tétradentates de type N_xS_{4-x} . Dans ces complexes, les sites de complexation sont souvent des amides, des amines, et/ou des thiols [116]. Le complexe mercaptoacétyl triglycine, Tc-MAG₃, de type N_3S , est couramment utilisé pour des approches BFCA dans lesquelles il est fixé à un peptide par liaison peptidique (Fig. I.24.a et b.) [117, 118]. Il utilise un ligand tétradentate constitué de 3 fonctions amides et une fonction thiol. Un autre exemple très étudié est le Tc-Trodat-1 (Fig. I.24.c) qui est utilisé en imagerie lors de l'étude de syndromes parkinsoniens [119].

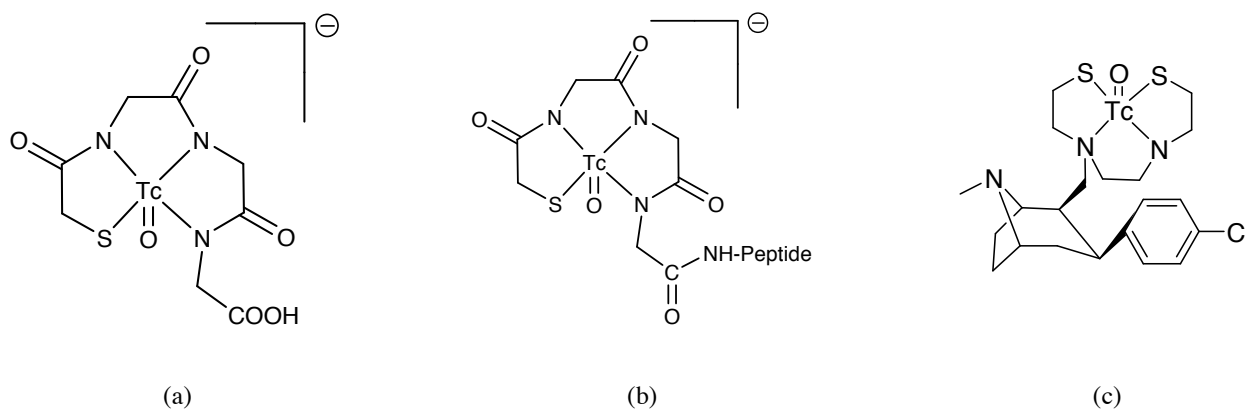


Fig I.24. : Le complexe N_3S Tc-mercaptoacétyl triglycine, Tc-MAG₃ (a) et son application au marquage de peptides (b) ; le complexe N_2S_2 Tc-Trodat-1 (c).

Une deuxième classe de complexes est constituée de structures bimoléculaires comprenant deux ligands et permettant la réalisation de traceurs par chimie combinatoire en faisant varier l'un d'entre eux. On peut citer les exemples de complexes bimoléculaires de type NS_2/S linéaires ou cycliques développés dans notre laboratoire (Fig. I.25.a-c) [54, 57] ou de type NS/NS tels que les complexes mimant les stéroïdes (Fig. I.25.c.) [46]. De tels complexes biomoléculaires peuvent être obtenus par chimie combinatoire [55, 56, 120, 121] mais présentent l'inconvénient d'être particulièrement sensible à l'échange de ligand avec le glutathion [56, 122].

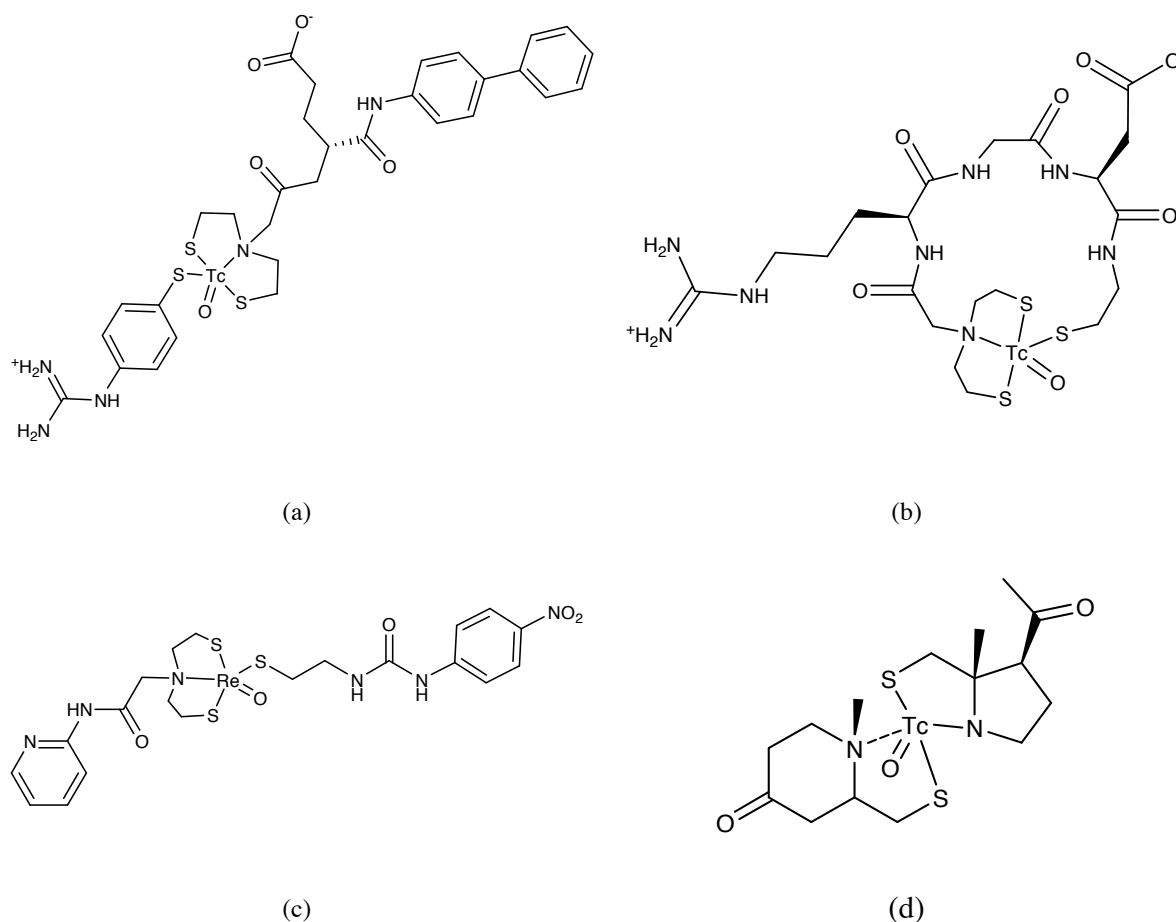


Fig. I.25.: Exemples de complexes bimoléculaires de TcO^{3+} : a et b) NS_2/S [54, 120] ; c) NS_2/S [56]; d) NS/NS [46].

Le cœur dioxotechnetium

Les complexes à cœur TcO_2^+ ont une structure octaédrique dans laquelle les positions apicales sont occupées par des atomes d'oxygène. La liaison TcO est plus longue que dans le cas d'un cœur monooxotechnétium du fait d'un recouvrement plus faible entre les orbitales p de l'oxygène et d du technétium. Ces complexes sont obtenus avec des ligands ayant un effet donneur π très faible ou avec des ligands π -accepteurs (phosphines, pyridines) mono, bi ou tridentates (Fig. I.26.).

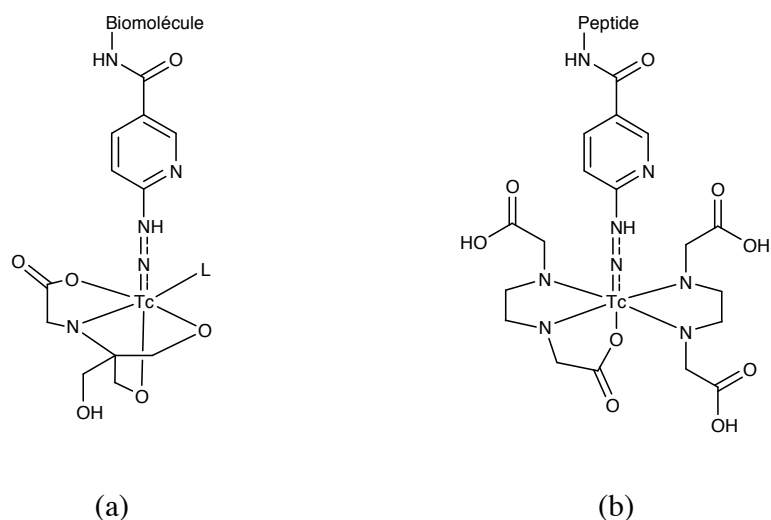


Fig. I.28. : Complexes à cœur diazotechnetium : (a) $[^{99m}\text{Tc}(\text{HYNIC-BM})(\text{tricinate})(\text{L})]$ (L = phosphine, pyridine, ...); (b) $[^{99m}\text{Tc}(\text{HYNIC-Peptide})(\text{EDDA})_2]$.

La première utilisation de ces complexes permettait de marquer l'immunoglobuline G [127]. Depuis ces structures sont fréquemment étudiées pour des applications très diverses telles que le marquage de liposomes [128, 129], d'oligonucléotides [130] ou de peptides comme le pentapeptide cyclique c(RGDyK) [131] ou la bombésine [132]. Le principal inconvénient de ces composés est la taille importante de la structure complexante (taille des ligands et du groupement Hynic).

Le cœur nitridotechnetium

Le cœur nitridotechnetium ($\text{Tc}\equiv\text{N}^{2+}$) est isoélectronique du cœur TcO^{3+} . Il est donc susceptible de former des complexes avec les mêmes ligands que celui-ci. La liaison $\text{Tc}\equiv\text{N}$ est plus courte que la liaison $\text{Tc}=\text{O}$ (1.60 Å contre 1.65 Å). Les complexes à cœur nitridotechnetium sont généralement formés par échange de ligand à partir du précurseur $[\text{TcNCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ (Fig. IV.29.A.). Comme dans le cas du cœur oxotechnetium, les ligands thiols chélatent très efficacement le cœur nitridotechnetium [133-135] (Fig. IV.29.B et C). Les complexes obtenus sont à géométrie pyramidale à base carrée dans le cas de ligands tétradentates comme les

bisdithiocarbamates, ou à géométrie octaédrique déformée dans le cas de ligands pentadentates tels que les polythioéthers.

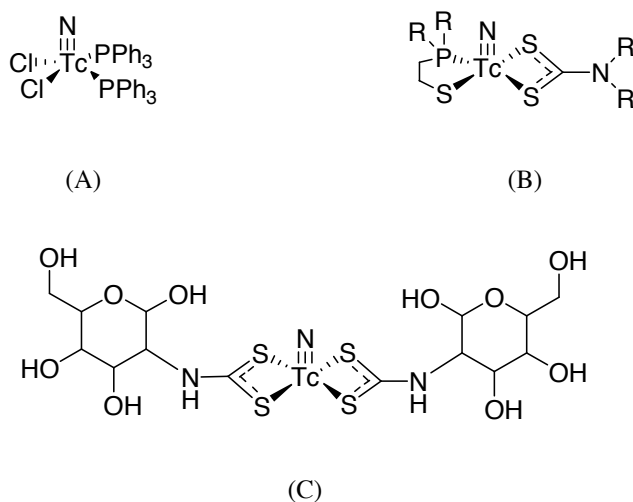


Fig. I.29. : Exemples de complexes à cœur nitridotechnetium

I.3. Présentation du projet

Dans cette introduction bibliographique, nous avons rappelé l'importance de la médecine nucléaire tant sur le plan de la thérapie grâce aux émetteurs α , β^- et Auger que de l'imagerie avec les émetteurs β^+ et γ . L'imagerie nucléaire se divise en deux techniques. D'une part la tomographie par émission de positron (TEP) qui utilise des émetteurs β^+ tels que ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , ou ^{68}Ga et dont l'utilisation en routine reste limitée essentiellement du fait de son coût d'exploitation. D'autre part la tomographie par émission monophotonique (TEMP) basée sur l'utilisation d'émetteurs γ , beaucoup moins onéreuse et dominée par les traceurs au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (85% de l'imagerie nucléaire de routine en milieu hospitalier).

En dehors des traceurs de flux, le développement de traceurs *in vivo* nécessite le marquage isotopique d'une molécule biologique (peptides, protéines, liposomes, petites molécules non peptidiques...) ayant une affinité marquée pour la cible à imager et qui va jouer le rôle de vecteur. Ce marquage peut parfois être réalisé par substitution isotopique (avec ^{18}F , ^{11}C ,

^{15}O , traceurs TEP) ou par marquage directe en utilisant l'aptitude naturelle de la molécule à complexer le radioélément (exemples : anticorps [50], protéine comme l'adrénomedulline [48]). Néanmoins, dans la grande majorité des cas, le radiomarquage nécessite une structure dédiée à la complexation du radioélément reliée à la molécule biologique (approche bifonctionnelle) ou partie intégrante de celle-ci (approche intégrée). Il existe déjà dans la littérature, une grande diversité de structures de ce type dont la plus répandue est la mercaptoacétyl triglicine ou MAG_3 .

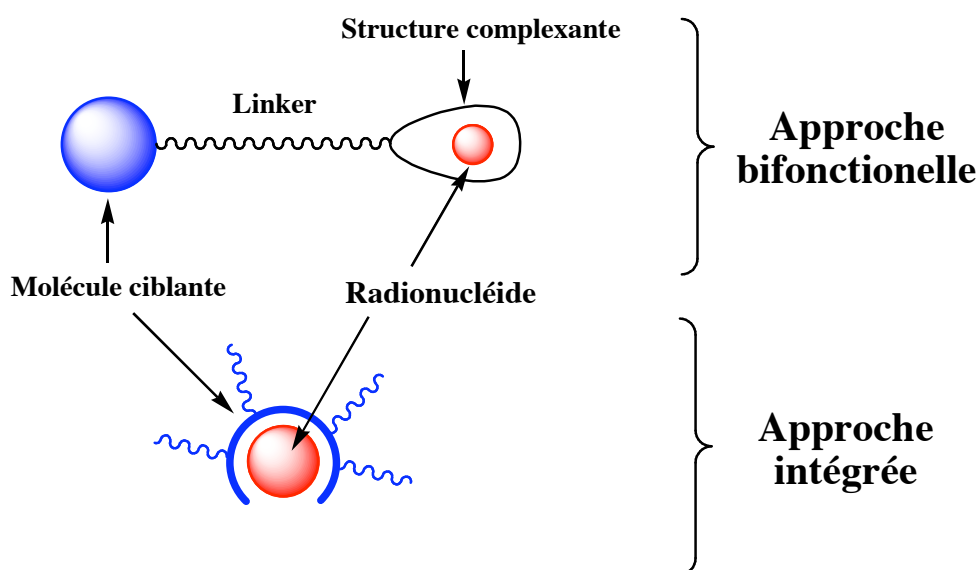


Fig. I.30. : Principes des approches bifonctionnelle et intégrée.

L'adjonction de ces structures complexantes à une molécule biologique requiert le plus souvent une mise au point assez longue liée au caractère imprévisible du comportement de ces conjugués *in vivo*. L'ingénierie moléculaire visant à affiner la structure des traceurs nécessite très souvent leur resynthèse complète, induisant un coût et une durée de développement élevés. Dans ce contexte, une optimisation combinatoire de ces traceurs, comme cela a été réalisé précédemment dans notre laboratoire pour la mise au point de ligands de la cyclophiline A (hCyp18) [56] ou de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [54], apparaît comme une approche prometteuse permettant à moindre coût la préparation de séries de traceurs pouvant ensuite être évalués *in vitro* et *in vivo*. La préparation de chimiothèques de composés est une pratique courante en laboratoire de synthèse dans le but de développer des ligands de récepteurs biologiques [136], des sondes moléculaires [137], ... Cette approche a déjà été validée au laboratoire dans le cadre de traceurs

phosphiniques pour l'imagerie *in vivo*. D'autres travaux réalisés au laboratoire ont également montré que le meilleur ligand d'une cible biologique (meilleurs résultats *in vitro*) n'est pas toujours le meilleur traceur *in vivo*. Le passage au modèle animal nécessite en effet de prendre en compte les critères de biodistribution, d'excrétion, de métabolisation. Par exemple lors de l'étude de cyclopeptides cyclisés par complexation du cœur TcO^{3+} [54], deux complexes rhéniés de la chimiothèque développée ont montré une affinité *in vitro* pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ respectivement de $IC_{50} = 60$ nM et 280 nM (Fig. I.31.). Pourtant, la réalité *in vivo*, ne reflétait pas les résultats obtenus *in vitro*. C'est en effet le traceur correspondant au composé de plus faible affinité qui a mené à la plus forte accumulation dans la tumeur. Celui-ci semble avoir une meilleure sélectivité pour la tumeur comparée aux autres tissus.

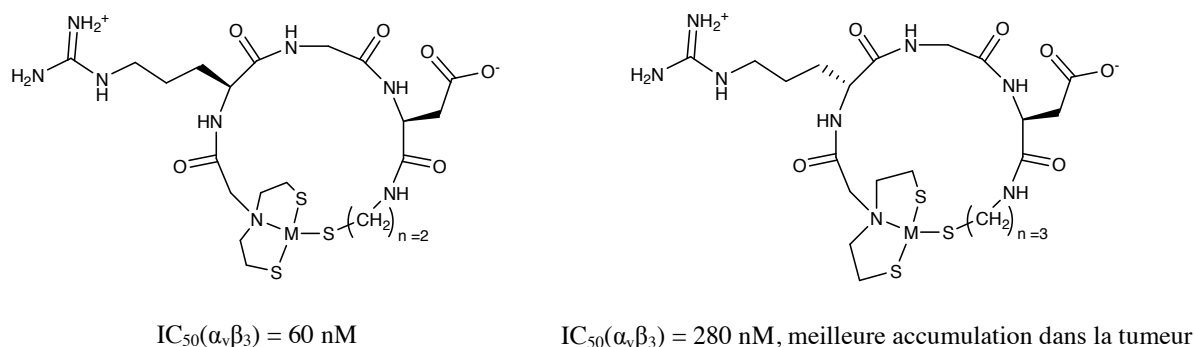


Fig. I.31. : Meilleur ligand ne signifie pas systématiquement meilleur traceur.

Le développement de traceurs par chimie combinatoire nécessite de choisir des structures et une chimie compatibles avec cette approche. En pratique, il s'agira donc d'utiliser par exemple la synthèse peptidique, qui permet de préparer de façon rapide et efficace des banques de composés sur support ou des réactions dites de « chimie click » [138, 139] qui permettent en une seule étape de conjuguer deux molécules par formation par exemple d'un noyau triazole [140] (Fig. I.32.). Cette deuxième possibilité est actuellement en plein essor car elle présente un réel potentiel de par sa simplicité d'utilisation et sa performance. [141, 142].

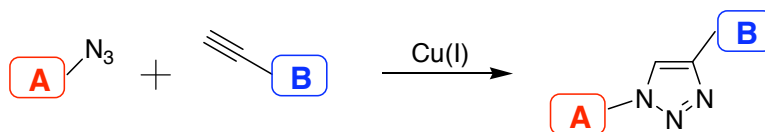


Fig. I.32.: Principe de la chimie click

Des radiotraceurs dans lesquels le radioélément est introduit via la chimie click ont déjà été décrits, notamment le ¹⁸F [143-145] pour le TEP. La fonction triazole ne joue alors qu'un rôle de conjugaison entre biomolécule et motif radiomarqué.

Nous souhaitons ici appliquer le principe de chimie-click au technétium en développant des traceurs dans lesquels un complexe du ^{99m}Tc sera relié à une molécule ciblante (approche bifonctionnelle) d'une part et servira de cœur à un traceur construit autour de lui (approche intégrée) d'autre part. Dans cette perspective, nous avons choisi d'utiliser un cœur oxotechnétium (TcO³⁺) qui est le cœur technétié le plus facile à obtenir et qui permet différents modes de complexation conduisant à des complexes neutres ou chargés. Différents précédents de complexation de ce type de cœur par des motifs hétéroaromatiques tels que des cycles pyridyles ou imidazole sont décrits dans la littérature [146] (Fig. I.33. gauche et centre). Néanmoins, aucune donnée ne décrivait une éventuelle aptitude d'un noyau triazole à complexer un cœur oxotechnétium. Le seul exemple de chélation du technétium par un motif triazole a été obtenu dans le cadre de complexes Tc-tricarbonyle [139] (Fig. I.33.droite).

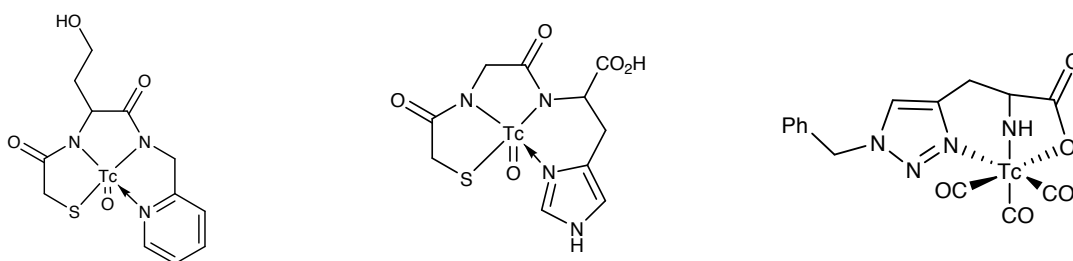


Fig. I.33.: Cycle hétéroaromatiques complexant le ^{99m}Tc. Pyridyle et imidazole complexant un cœur TcO³⁺ (à gauche), triazole complexant un cœur Tc-tricarbonyle (à droite).

Nous avons donc souhaité étudier la possibilité d'une complexation d'un cœur oxotechnétium par un ligand comportant un motif triazole impliqué dans la complexation du métal. Ce motif est formé par la réaction de cycloaddition de Huisgen [147] catalysée au Cu(II) [140]. L'objectif de ce travail sera de déterminer, parmi un éventail de ligands tétradentates non fonctionnalisés de type N₃X (X = N, O, S) comportant tous un motif triazole, une des structures les plus adaptées à la complexation du cœur oxotechnétium (Fig. I.34.).

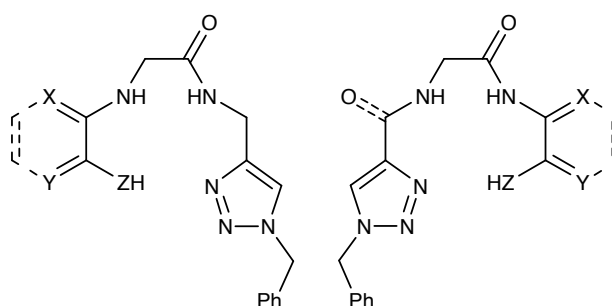


Fig. I.34. : Structures générales des ligands non fonctionnalisés étudiés.

Ce ligand sera ensuite étudié *in vitro* et *in vivo* puis son potentiel pour la réalisation de traceurs sera illustré par une application à l'imagerie de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui constitue l'un des axes de recherche de notre laboratoire. Dans un premier temps, dans le cadre d'une approche intégrée, le complexe sera fonctionnalisé de façon à mimer un ligand de cette intégrine (Fig. I.35.gauche).

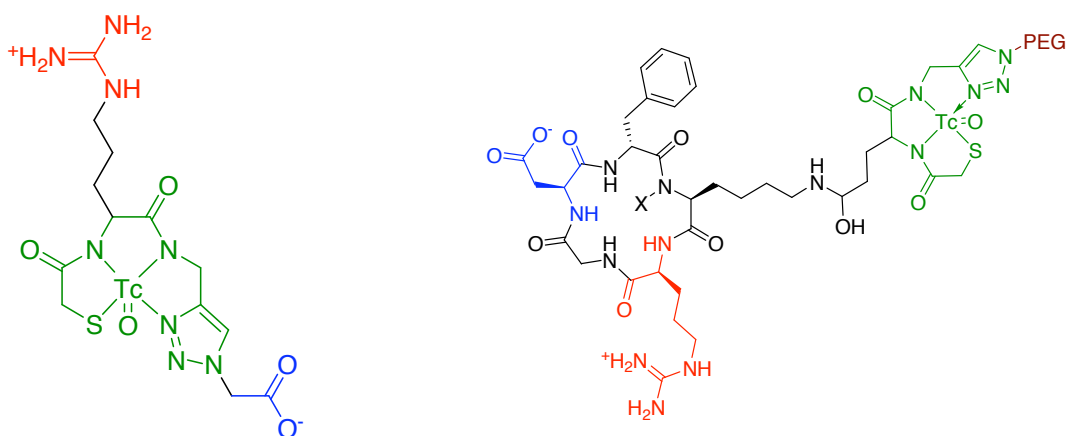


Fig. I.35. : Illustration de la stratégie employée pour le développement de traceurs.

Puis nous développerons une approche bifonctionnelle en reliant cette structure à un motif connu pour sa haute affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, le cyclopentapeptide c(RGDfK) (Fig. I.35.droite). Dans les deux cas, nous mettrons à profit la chimie click pour fonctionnaliser la structure ou pour y incorporer un motif permettant d'orienter la biodistribution et d'augmenter la solubilité des composés (PEG, polyamine, sucre).

Ce manuscrit va s'articuler en trois chapitres faisant suite à la présente introduction bibliographique. Dans un second chapitre, nous indiquerons les raisons du choix des structures générales adoptées pour les complexes et détaillerons les stratégies de synthèses employées. Au chapitre 3, nous procéderons au criblage de ces ligands non fonctionnalisés selon leur aptitude à chélater le cœur oxotechnétium d'une part, et selon la stabilité *in vitro* des complexes ainsi formés d'autre part. Les complexes issus de ce double criblage seront alors évalués *in vivo* chez la souris. Enfin, le chapitre IV permettra d'illustrer le potentiel de ces ligands pour le développement de traceurs de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Dans une conclusion générale, nous envisagerons diverses applications ou extensions de ces travaux dans le domaine de l'imagerie moléculaire.

I.4. Références bibliographiques

1. Spencer, R., R. Scholl, and N. Erbay, *Tc-99m Pertechnetate Thyroid Images in Hyperthyroidism: Size, Distribution, and Presence of a Pyramidal Lobe*. Clinical Nuclear Medicine, 1997. **22**(8): p. 519-522.
2. Arnold, J.E. and S. Pinsky, *Comparison of ^{99m}Tc and ^{123}I for Thyroid Imaging*. Journal of Nuclear Medicine, 1976. **17**(4): p. 261-267.
3. Iida, H., et al., *Absolute quantitation of myocardial blood flow with ^{201}Tl and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2008. **35**(5): p. 896-905.
4. Hanyu, H., et al., *The progression of cognitive deterioration and regional cerebral blood flow patterns in Alzheimer's disease: A longitudinal SPECT study*. Journal of the neurological sciences, 2010. **290**(1): p. 96-101.
5. Stoessl, A., *Neuroimaging in Parkinson's Disease*. Neurotherapeutics, 2011. **8**(1): p. 72-81.
6. Cachin, F., A. Kelly, and J. Maublant, *Evaluation de la réponse thérapeutique en cancérologie: place de l'imagerie isotopique*. Bull Cancer, 2006. **93**: p. 1191.
7. Wong, D.F., *Imaging in Drug Discovery, Preclinical, and Early Clinical Development*. J Nucl Med, 2008. **49**(6): p. 26N-28.
8. Hwang, D.-R. and J. Evelhoch, *How the Biopharmaceutical Industry Uses Molecular Imaging*. J Nucl Med, 2008. **49**(6): p. 24N-25.
9. Supiot, S., et al., *Le point sur les avancées récentes de la radio-immunothérapie alpha*. Cancer/Radiothérapie, 2007. **11**(5): p. 252-259.
10. Gadbois, D.M., et al., *Alterations in the Progression through the Cell Cycle after Exposure to Alpha Particles or Gamma Rays*. Radiation Research Society, 1996. **146**: p. 414-424.
11. Zalutsky, M.R. and O.R. Pozzi, *Radioimmunotherapy with alpha-emitting radionuclides*. The Quarterly Journal of Medicine and Molecular Imaging, 2004. **48**: p. 289.
12. Mulford, D.A., D.A. Scheinberg, and J.G. Jurcic, *The Promise of Targeted α -Particle Therapy*. J Nucl Med, 2005. **46**(1_suppl): p. 199S-204.
13. Ercan, M.T. and M. Caglar, *Therapeutic radiopharmaceuticals*. Current Pharmaceutical Design, 2000. **6**(11): p. 1085.
14. Jurcic, J.G., et al., *Targeted α particle immunotherapy for myeloid leukemia*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1233-1239.
15. Salvatori, M., L. Indovina, and L. Mansi, *Targeted alpha-Particle Therapy: A Clinical Overview*. current radiopharmaceuticals, 2008. **1**: p. 251-253.

16. Nilsson, S., et al., *Bone-targeted radium-223 in symptomatic, hormone-refractory prostate cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled phase II study*. The Lancet Oncology, 2007. **8**(7): p. 587-594.
17. Nilsson, S., et al., *First Clinical Experience with α -Emitting Radium-223 in the Treatment of Skeletal Metastases*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(12): p. 4451-4459.
18. Zalutsky, M.R., et al., *Clinical Experience with α -Particle Emitting ^{211}At : Treatment of Recurrent Brain Tumor Patients with ^{211}At -Labeled Chimeric Antitumour Monoclonal Antibody 81C6*. J Nucl Med, 2008. **49**(1): p. 30-38.
19. Lam, M.E.H., J.H. Klerk, and P. Rijk, *Re-HEDP for metastatic bone pain in breast cancer patients*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2004. **31**(0): p. S162-S170.
20. Volkert, W.A. and T.J. Hoffman, *Therapeutic Radiopharmaceuticals*. Chemical Reviews, 1999. **99**(9): p. 2269-2292.
21. Bartholomä, M.D., et al., *Technetium and Gallium Derived Radiopharmaceuticals: Comparing and Contrasting the Chemistry of Two Important Radiometals for the Molecular Imaging Era*. Chemical Reviews, 2010. **110**(5): p. 2903-2920.
22. Watanabe, N., et al., *Molecular Therapy of Human Neuroblastoma Cells Using Auger Electrons of ^{111}In -Labeled N-myc Antisense Oligonucleotides*. J Nucl Med, 2006. **47**(10): p. 1670-1677.
23. Kassis, A.I. and S.J. Adelstein, *Radiobiologic Principles in Radionuclide Therapy*. J Nucl Med, 2005. **46**(1_suppl): p. 4S-12.
24. Donoghue, J.A.O. and T.E. Wheldon, *Targeted radiotherapy using Auger electron emitters*. Physics in Medicine and Biology, 1996. **41**(10): p. 1973.
25. Alexiou, G.A., et al., *The Value of ^{99m}Tc -Tetrofosmin Brain SPECT in Predicting Survival in Patients with Glioblastoma Multiforme*. J Nucl Med, 2010. **51**(12): p. 1923-1926.
26. Duvall, W., et al., *Reduced isotope dose and imaging time with a high-efficiency CZT SPECT camera*. Journal of Nuclear Cardiology, 2011: p. 1-11.
27. Duvall, W., et al., *Comparison of high efficiency CZT SPECT MPI to coronary angiography*. Journal of Nuclear Cardiology, 2011. **18**(4): p. 595-604.
28. Strobel, K., P. Veit-Hailbach, and T.F. Hany, *Utilisation judicieuse du PET/CT en oncologie*. Forum Med Suisse, 2007. **7**: p. 270-277.
29. Dunphy, M.P.S. and J.S. Lewis, *Radiopharmaceuticals in Preclinical and Clinical Development for Monitoring of Therapy with PET*. J Nucl Med, 2009. **50**(Suppl_1): p. 106S-121.
30. Kubíček, V.c., et al., *Gallium(III) Complexes of DOTA and DOTA-Monoamide: Kinetic and Thermodynamic Studies*. Inorganic Chemistry, 2010. **49**(23): p. 10960-10969.

31. Plössl, K., et al., *A novel gallium bisaminthiolate complex as a myocardial perfusion imaging agent*. Nuclear Medicine and Biology, 2008. **35**(1): p. 83-90.
32. Boros, E., et al., *Acyclic Chelate with Ideal Properties for ⁶⁸Ga PET Imaging Agent Elaboration*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(44): p. 15726-15733.
33. de Langen, A.J., et al., *Monitoring Response to Antiangiogenic Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer Using Imaging Markers Derived from PET and Dynamic Contrast-Enhanced MRI*. J Nucl Med, 2011. **52**(1): p. 48-55.
34. Parthasarathy, K.L. and E.S. Crawford, *Treatment of Thyroid Carcinoma: Emphasis on High-Dose ¹³¹I Outpatient Therapy*. Journal of Nuclear Medicine Technology, 2002. **30**(4): p. 165-171.
35. Liepe, K., et al., *Radiosynovectomy using yttrium-90, phosphorus-32 or rhenium-188 radiocolloids versus corticoid instillation for rheumatoid arthritis of the knee*. Annals of Nuclear Medicine, 2011. **25**(5): p. 317-323.
36. Das, B., *Role of radiosynovectomy in the treatment of rheumatoid arthritis and hemophilic arthropathies*. Biomedical Imaging and Intervention Journal, 2007. **3**(4): p. 1.
37. Schubiger, P.A., R. Alberto, and A. Smith, *Vehicles, Chelators, and Radionuclides: Choosing the "Building Blocks" of an Effective Therapeutic Radioimmunoconjugate*. Bioconjugate Chemistry, 1996. **7**(2): p. 165-179.
38. Perkins, A.C., *In vivo molecular targeted radiotherapy*. Biomedical Imaging and Intervention Journal, 2005: p. 2.
39. Garcia-Garayoa, E., R. Schibli, and P.A. Schubiger, *Peptides radiolabeled with Re-186/188 and Tc-99m as potential diagnostic and therapeutic agents*. Nuclear Science and Techniques, 2007. **18**(2): p. 88-100.
40. Bao, A., et al., *¹⁸⁶Re-Liposome Labeling Using ¹⁸⁶Re-SNS/S Complexes: In Vitro Stability, Imaging, and Biodistribution in Rats*. J Nucl Med, 2003. **44**(12): p. 1992-1999.
41. Papathanasiou, N.D., et al., *¹⁸F-FDG PET/CT and ¹²³I-Metaiodobenzylguanidine Imaging in High-Risk Neuroblastoma: Diagnostic Comparison and Survival Analysis*. J Nucl Med, 2011. **52**(4): p. 519-525.
42. Tsuyuguchi, N., et al., *Evaluation of Pleomorphic Xanthoastrocytoma by Use of Positron Emission Tomography with [¹⁸F]-Fluorodeoxyglucose and [¹¹C]-Methionine Tracers*. AJNR Am J Neuroradiol, 2001. **22**(2): p. 311-313.
43. Kang, B., et al., *¹⁸F-FDG and ¹¹C-MET Positron Emission Tomography Findings of Cutaneous Mast Cell Tumor in a Dog*. Journal of Veterinary Medical Science, 2011. **73**(3): p. 355-359.
44. Shiue, C.-Y., C.D. Arnett, and A.P. Wolf, *Synthesis and biodistribution of 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-d-glucopyranosyl [¹⁸F]fluoride in mice*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 1984. **9**(2): p. 77-80.

45. Långström, B., et al., *Synthesis of L- and D-[Methyl-¹¹C]Methionine*. Journal of Nuclear Medicine, 1987. **28**(6): p. 1037-1040.
46. Hom, R.K. and J.A. Katzenellenbogen, *Synthesis of a Tetradentate Oxorhenium(V) Complex Mimic of a Steroidal Estrogen*. The Journal of Organic Chemistry, 1997. **62**(18): p. 6290-6297.
47. Chi, D.Y., et al., *Homodimeric and Heterodimeric Bis(amino thiol) Oxometal Complexes with Rhenium(V) and Technetium(V). Control of Heterodimeric Complex Formation and an Approach to Metal Complexes that Mimic Steroid Hormones*. Journal of Medicinal Chemistry, 1994. **37**(7): p. 928-937.
48. Fu, Y., et al., *Characterization of the adrenomedullin receptor acting as the target of a new radiopharmaceutical biomolecule for lung imaging*. European journal of pharmacology, 2009. **617**: p. 118-123.
49. Goldenberg, D., et al., *Carcinoembryonic antigen immunoscintigraphy complements mammography in the diagnosis of breast carcinoma*. Cancer, 2000. **89**(104): p. 104-115.
50. Dias, C.R., et al., *Tc-99m direct radiolabeling of monoclonal antibody for egfr3: quality control and image studies in mice*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2005. **48**: p. 29-35.
51. John, E., et al., *Technetium-99m-Labeled Monoclonal Antibodies: Influence of Technetium-99m Binding Sites*. Journal of Nuclear Medicine, 1994. **35**(5): p. 876-881.
52. Giblin, M.F., et al., *Design and characterization of α -melanotropin peptide analogs cyclized through rhenium and technetium metal coordination*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(22): p. 12814-12818.
53. Aufort, M., et al., *Synthesis and biochemical evaluation of a cyclic RGD oxorhenium complex as new ligand of $\alpha_v\beta_3$ integrin*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **44**(9): p. 3394-3401.
54. Aufort, M., et al., *Synthesis, in vitro screening and in vivo evaluation of cyclic RGD analogs cyclized through oxorhenium and oxotechnetium coordination*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2011. **46**(5): p. 1779-1788.
55. Clavaud, C., et al., *Combinatorial Self-Assembly of Cyclophilin hCyp-18 Ligands through Rhenium Coordination*. ChemBioChem, 2006. **7**(9): p. 1352-1355.
56. Clavaud, C., et al., *Dynamic Combinatorial Self-Assembly of Cyclophilin hCyp-18 Ligands through Oxorhenium Coordination*. ChemBioChem, 2008. **9**(11): p. 1823-1829.
57. Clavaud, C., et al., *Cyclic and Acyclic Oxorhenium(V)-Peptide Conjugates as New Ligands of the Human Cyclophilin hCyp-18*. Bioconjugate Chemistry, 2006. **17**(3): p. 807-814.
58. Fragasso, G., et al., *High prevalence of ^{99m}Tc-tetrofosmin reverse perfusion pattern in patients with myocardial infarction and angiographically smooth coronary arteries*.

- The International Journal of Cardiovascular Imaging (formerly Cardiac Imaging), 2002. **18**(1): p. 31-40.
59. Athanasoulis, T. and C.A. Zervas, *Interpretation of reverse redistribution of ^{99m}Tc-tetrofosmin in patients with acute myocardial infarction*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2003. **30**(5): p. 798-799.
 60. Jain, D., et al., *Influence of ^{99m}Tc-tetrofosmin SPECT myocardial perfusion imaging on the prediction of future adverse cardiac events*. Journal of Nuclear Cardiology, 2009. **16**(4): p. 540-548.
 61. Maddahi, J., H. Kiat, and D.S. Berman, *Myocardial perfusion imaging with technetium-99m-labeled agents*. The American Journal of Cardiology, 1991. **67**(14): p. 27D-34D.
 62. Ito, Y., et al., *Estimation of myocardial blood flow and myocardial flow reserve by ^{99m}Tc-sestamibi imaging: comparison with the results of PET*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2003. **30**(2): p. 281-287.
 63. Shaw, L.J., et al., *Prognostic Value of Normal Exercise and Adenosine ^{99m}Tc-Tetrofosmin SPECT Imaging: Results from the Multicenter Registry of 4,728 Patients*. Journal of Nuclear Medicine, 2003. **44**(2): p. 134-139.
 64. Vivier, P.-H. and J.-N. Dacher, *Pharmacokinetics of ^{99m}Tc-MAG3*. Am. J. Roentgenol., 2009. **193**(4): p. W361-.
 65. Palmer, M.R., et al., *Evaluation of relative renal function for patients who had undergone simultaneous liver–kidney transplants using Tc-99m-MAG₃ scintigraphy with attenuation correction from anatomical images and SPECT/CT*. Nuclear Medicine Communications, 2011. **32**(8): p. 738-744
10.1097/MNM.0b013e328347e958.
 66. Taylor, A., et al., *A 7% Decrease in the Differential Renal Uptake of MAG₃ Implies a Loss in Renal Function*. Urology, 2010. **76**(6): p. 1512-1516.
 67. Ogasawara, K., et al., *^{99m}Tc-Bicisate and ^{99m}Tc-HMPAO SPECT Imaging in Early Spontaneous Reperfusion of Cerebral Embolism*. AJNR Am J Neuroradiol, 1999. **20**(4): p. 626-628.
 68. Lee, A., I. Mena, and B. Miller, *Cerebral Hypoxic Injury Detected by Tc-HMPAO SPECT*. Clinical Nuclear Medicine, 1989. **14**(7): p. 482-483.
 69. Dilworth, J.R. and S. J. Parrott, *The biomedical chemistry of technetium and rhenium*. Chemical Society Reviews, 1998. **27**(1): p. 43-55.
 70. Walovitch, R., et al., *Studies of the retention mechanism of the brain perfusion imaging agent ^{99m}Tc-bicisate (^{99m}Tc-ECD)*. Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism, 1994. **1994**(S4-11): p. S4-11.
 71. Neirinckx, R.D., et al., *The Retention Mechanism of Technetium-99m-HM-PAO: Intracellular Reaction with Glutathione*. J Cereb Blood Flow Metab, 1988. **8**(S1): p. S4-S12.

72. Hughes, D.K., *Nuclear Medicine and Infection Detection: The Relative Effectiveness of Imaging with ¹¹¹In-Oxine-, ^{99m}Tc-HMPAO-, and ^{99m}Tc-Stannous Fluoride Colloid-Labeled Leukocytes and with ⁶⁷Ga-Citrate*. Journal of Nuclear Medicine Technology, 2003. **31**(4): p. 196-201.
73. Ercan, M.T., et al., *^{99m}Tc-citrate versus ⁶⁷Ga-citrate for the scintigraphic visualization of inflammatory lesions*. Nuclear Medicine and Biology, 1993. **20**(7): p. 881-887.
74. Nanni, C., et al., *⁶⁸Ga-Citrate PET/CT for Evaluating Patients with Infections of the Bone: Preliminary Results*. Journal of Nuclear Medicine, 2010. **51**(12): p. 1932-1936.
75. Goldsmith, S.J. and S. Vallabhajosula, *Clinically Proven Radiopharmaceuticals for Infection Imaging: Mechanisms and Applications*. Seminars in nuclear medicine, 2009. **39**(1): p. 2-10.
76. Liu, S. and D.S. Edwards, *^{99m}Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals*. Chemical Reviews, 1999. **99**(9): p. 2235-2268.
77. Smith-Jones, P.M., et al., *Synthesis, biodistribution and renal handling of various chelate-somatostatin conjugates with metabolizable linking groups*. Nuclear Medicine and Biology, 1997. **24**(8): p. 761-769.
78. Hom, R.K. and J.A. Katzenellenbogen, *Technetium-99m-labeled receptor-specific small-molecule radiopharmaceuticals: Recent developments and encouraging results*. Nuclear Medicine and Biology, 1997. **24**(6): p. 485-498.
79. Arterburn, J.B., et al., *Synthesis of 17- α -Substituted Estradiol-Pyridin-2-yl Hydrazine Conjugates as Effective Ligands for Labeling with Alberto's Complex fac-[Re(OH₂)₃(CO)₃]⁺ in Water*. The Journal of Organic Chemistry, 2003. **68**(18): p. 7063-7070.
80. Welch, M.J., J.B. Downer, and J.A. Katzenellenbogen, *Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development*. Kluwer Academic Press, 1996: p. 137.
81. Top, S., et al., *Rhenium Carbonyl Complexes of .beta.-Estradiol Derivatives with High Affinity for the Estradiol Receptor: An Approach to Selective Organometallic Radiopharmaceuticals*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(32): p. 8372-8380.
82. Meltzer, P.C., et al., *A Technetium-99m SPECT Imaging Agent Which Targets the Dopamine Transporter in Primate Brain*. Journal of Medicinal Chemistry, 1997. **40**(12): p. 1835-1844.
83. Kung, H.F., et al., *Imaging of dopamine transporters in humans with technetium-99m TRODAT 1*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 1996. **23**(11): p. 1527-1530.
84. Fritzberg, A.R., et al., *Specific and stable labeling of antibodies with technetium-99m with a diamide dithiolate chelating agent*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(11): p. 4025-4029.

85. Jin, H. and J. Varner, *Integrins: roles in cancer development and as treatment targets*. Br J Cancer, 2004. **90**(3): p. 561-565.
86. Haubner, R., *$\alpha_v\beta_3$ -integrin imaging: a new approach to characterise angiogenesis?* European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2006. **33**(0): p. 54-63.
87. Tran, T., et al., *In Vivo Evaluation of Cysteine-Based Chelators for Attachment of ^{99m}Tc to Tumor-Targeting Affibody Molecules*. Bioconjugate Chemistry, 2007. **18**(2): p. 549-558.
88. Chen, X., et al., *Pegylated Arg-Gly-Asp Peptide: ^{64}Cu Labeling and PET Imaging of Brain Tumor $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression*. J Nucl Med, 2004. **45**(10): p. 1776-1783.
89. Psimadas, D., et al., *Study of the labeling of two novel RGD-peptidic derivatives with the precursor $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ and evaluation for early angiogenesis detection in cancer*. Applied Radiation and Isotopes, 2006. **64**(2): p. 151-159.
90. Maecke, H.R. and J.C. Reubi, *Somatostatin Receptors as Targets for Nuclear Medicine Imaging and Radionuclide Treatment*. Journal of Nuclear Medicine, 2011. **52**(6): p. 841-844.
91. Silberstein, E.B., *Radionuclides and Radiopharmaceuticals for 2005*. J Nucl Med, 2005. **46**(5): p. 13N-14.
92. Jonge, F.A.A. and E.K.J. Pauwels, *Technetium, the missing element*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 1996. **23**(3): p. 336-344.
93. Perrier, C. and E. Segré, *Radioactive Isotopes of Element 43*. Nature, 1937. **140**: p. 193.
94. Perrier, C. and E. Segré, *Technetium: the element of Atomic Number 43*. Nature, 1947. **159**: p. 24.
95. Alfassi, Z.B., et al., *On the "artificial" nature of Tc and the "carrier-free" nature of ^{99m}Tc from $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generators*. Applied Radiation and Isotopes, 2005. **63**(1): p. 37-40.
96. Hammermaier, A., E. Reich, and W. Bögl, *Chemical, radiochemical, and radionuclide purity of eluates from different commercial fission $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generators*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 1986. **12**(1): p. 41-46.
97. Moore, P.W., *Technetium-99 in Generator Systems*. J Nucl Med, 1984. **25**(4): p. 499-502.
98. Hung, J.C., et al., *Generator eluate effects on the labeling efficiency of ^{99m}Tc -sestamibi*. Nuclear Medicine and Biology, 1995. **22**(7): p. 949-951.
99. Nickles, R., et al., *Technetium-94m-Tboroxime: Synthesis, Dosimetry, and Initial PET Imaging Studies*. Journal of Nuclear Medicine, 1993. **34**(7): p. 1058-1066.
100. Stone, C., et al., *Technetium-94m-labeled methoxyisobutyl isonitrile: Dosimetry and resting cardiac imaging with positron emission tomography*. Journal of nuclear cardiology, 1994. **1**(5): p. 425-433.

101. Casey, C.P., *Organorhenium Chemistry*. Science, 1993. **259**(5101): p. 1552-1558.
102. Al-Ajlouni, A.M. and J.H. Espenson, *Epoxidation of Styrenes by Hydrogen Peroxide As Catalyzed by Methylrhenium Trioxide*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(36): p. 9243-9250.
103. Wassenaar, J. and J.N.H. Reek, *Asymmetric Hydrogenation of Enamides, α -Enol and α -Enamido Ester Phosphonates Catalyzed by IndolPhos-Rh Complexes*. The Journal of Organic Chemistry, 2009. **74**(21): p. 8403-8406.
104. Kuninobu, Y., et al., *Rhenium-Catalyzed Regio- and Stereoselective Addition of Two Carbon Units to Terminal Alkynes via Carbon-Carbon Bond Cleavage of β -Keto Sulfones*. Organic Letters, 2011. **13**(11): p. 2959-2961.
105. Lewington, V., *Targeted radionuclide therapy for bone metastases*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 1993. **20**(1): p. 66-74.
106. Alberto, R., et al., *Metal carbonyl syntheses XXII. Low pressure carbonylation of $[MOCl_4]$ and $[MO_4]$: the technetium(I) and rhenium(I) complexes $[NEt_4]_2[MCl_3(CO)_3]$* . Journal of Organometallic Chemistry, 1995. **493**(1-2): p. 119-127.
107. Schibli, R., et al., *Structural and ^{99}Tc NMR Investigations of Complexes with fac- $[Tc(CO)_3]^+$ Moieties and Macrocyclic Thioethers of Various Ring Sizes: Synthesis and X-ray Structure of the Complexes fac- $[Tc(9\text{-ane-S3})(CO)_3]Br$, fac- $[Tc_2(\text{tosylate})_2(18\text{-ane-S6})(CO)_6]$, and fac- $[Tc_2(20\text{-ane-S6-OH})(CO)_6][\text{tosylate}]_2$* . Inorganic Chemistry, 1998. **37**(14): p. 3509-3516.
108. Schibli, R., 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*. Bioconjugate Chemistry, 2000. **11**(3): p. 345-351.
109. Schibli, R., et al., *Steps toward High Specific Activity Labeling of Biomolecules for Therapeutic Application: Preparation of Precursor $[^{188}Re(H_2O)_3(CO)_3]^+$ and Synthesis of Tailor-Made Bifunctional Ligand Systems*. Bioconjugate Chemistry, 2002. **13**(4): p. 750-756.
110. Alberto, R., et al., *Synthesis and Properties of Boranocarbonate: A Convenient in Situ CO Source for the Aqueous Preparation of $[^{99m}Tc(OH)_2(CO)_3]^+$* . Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(13): p. 3135-3136.
111. Alberto, R. and R. Motterlini, *Chemistry and biological activities of CO-releasing molecules (CORMs) and transition metal complexes*. Dalton Transactions, 2007(17): p. 1651-1660.
112. Jurisson, S.S. and J.D. Lydon, *Potential Technetium Small Molecule Radiopharmaceuticals*. Chemical Reviews, 1999. **99**(9): p. 2205-2218.
113. Abrams, M.J., et al., *Synthesis and characterization of hexakis(alkyl isocyanide) and hexakis(aryl isocyanide) complexes of technetium(I)*. Inorganic Chemistry, 1983. **22**(20): p. 2798-2800.

114. Leslie, W.D., et al., *Prognostic Value of Automated Quantification of ^{99m}Tc-Sestamibi Myocardial Perfusion Imaging*. J Nucl Med, 2005. **46**(2): p. 204-211.
115. uz Zaman, M., et al., *Predictive and prognostic values of transient ischemic dilatation of left ventricular cavity for coronary artery disease and impact of various managements on clinical outcome using technetium-99m sestamibi gated myocardial perfusion imaging*. Annals of Nuclear Medicine, 2011: p. 1-5.
116. Le Gal, J., et al., *Synthesis and structural characterization of new oxorhenium and oxotechnetium complexes with XN₂S-tetradentate semi-rigid ligands (X = O, S, N)*. Dalton Transactions, 2005(23): p. 3800-3807.
117. Blok, D., et al., *New chelation strategy allows for quick and clean ^{99m}Tc-labeling of synthetic peptides*. Nuclear Medicine and Biology, 2004. **31**(6): p. 815-820.
118. Okarvi, S.M., *Synthesis, radiolabeling and in vitro and in vivo characterization of a technetium-99m-labeled alpha-M2 peptide as a tumor imaging agent*. The Journal of Peptide Research, 2004. **63**(6): p. 460-468.
119. Mozley, P.D., et al., *Biodistribution and Dosimetry of TRODAT-1: A Technetium-99m Tropane for Imaging Dopamine Transporters*. Journal of Nuclear Medicine, 1998. **39**(12): p. 2069-2076.
120. Aufort, M., et al., *Oxorhenium-Mediated Assembly of Noncyclic Selective Integrin Antagonists: A Combinatorial Approach*. ChemBioChem, 2011. **12**(4): p. 583-592.
121. Le Gal, J., et al., *Chelate oxorhenium to assemble new integrin antagonists*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2011. **105**(6): p. 880-886.
122. Syhre, R., et al., *Stability versus reactivity of "3+1" mixed-ligand technetium-99m complexes in vitro and in vivo*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 1998. **25**(7): p. 793-796.
123. Berning, D.E., et al., *In vitro and in vivo characterization of a ^{99m}Tc complex with tris(hydroxymethyl)phosphine (THP)*. Nuclear Medicine and Biology, 1996. **23**(5): p. 617-622.
124. Kelly, J.D., et al., *Technetium-99m-Tetrofosmin as a New Radiopharmaceutical for Myocardial Perfusion Imaging*. Journal of Nuclear Medicine, 1993. **34**(2): p. 222-227.
125. Liu, S., et al., *Coligand effects on the solution stability, biodistribution and metabolism of the ^{99m}Tc-labeled cyclic RGDfK tetramer*. Nuclear Medicine and Biology, 2008. **35**(1): p. 111-121.
126. Liu, S., et al., *Effect of Coligands on Biodistribution Characteristics of Ternary Ligand ^{99m}Tc Complexes of a HYNIC-Conjugated Cyclic RGDfK Dimer*. Bioconjugate Chemistry, 2005. **16**(6): p. 1580-1588.
127. Abrams, M.J., et al., *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): p. 2022-2028.

128. Laverman, P., et al., *A Novel Method to Label Liposomes with ^{99m}Tc by the Hydrazino Nicotinylic Derivative*. *J Nucl Med*, 1999. **40**(1): p. 192-197.
129. Dams, E.T.M., et al., *Technetium-99m-Labeled Liposomes to Image Experimental Colitis in Rabbits: Comparison with Technetium-99m-HMPAO-Granulocytes and Technetium-99m-HYNIC-IgG*. *Journal of Nuclear Medicine*, 1998. **39**(12): p. 2172-2178.
130. Shen, Y., et al., *Preparation of liposome-coated oligonucleotide labeled with ^{99m}Tc and its uptake in vascular smooth muscle cells*. *Nuclear Science and Techniques*, 2007. **18**(2): p. 101-106.
131. Decristoforo, C., et al., *[^{99m}Tc]HYNIC-RGD for imaging integrin $\alpha_v\beta_3$ expression*. *Nuclear Medicine and Biology*, 2006. **33**(8): p. 945-952.
132. Ananias, H.J.K., et al., *^{99m}Tc -HYNIC(tricine/TPPTS)-Aca-Bombesin(7-14) as a Targeted Imaging Agent with MicroSPECT in a PC-3 Prostate Cancer Xenograft Model*. *Molecular Pharmaceutics*, 2011: p. null-null.
133. Bolzati, C., et al., *Technetium and Rhenium in Five-Coordinate Symmetrical and Dissymmetrical Nitrido Complexes with Alkyl Phosphino-thiol Ligands. Synthesis and Structural Characterization*. *Inorganic Chemistry*, 2008. **47**(24): p. 11972-11983.
134. Zhang, J., et al., *Synthesis and biological evaluation of a novel ^{99m}Tc nitrido radiopharmaceutical with deoxyglucose dithiocarbamate, showing tumor uptake*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2009. **19**(10): p. 2752-2754.
135. Zhang, J., et al., *Synthesis and biodistribution of a novel ^{99m}Tc nitrido dithiocarbamate complex containing aromatic group for cerebral imaging*. *Applied Radiation and Isotopes*, 2010. **68**(1): p. 101-104.
136. Frecentese, F., et al., *Efficient microwave combinatorial synthesis of novel indolic arylpiperazine derivatives as serotonergic ligands*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009. **45**: p. 752.
137. Ghosh, K., et al., *Solid phase combinatorial synthesis of a xanthone library using click chemistry and its application to an embryonic stem cells probe*. *Chemical Communications*, 2011. **47**: p. 7488-7490.
138. Mindt, T.L., et al., *A Click Approach to Structurally Diverse Conjugates Containing a Central Di-1,2,3-triazole Metal Chelate*. *ChemMedChem*, 2009. **4**(4): p. 529-539.
139. Mindt, T.L., et al., *"Click to Chelate": Synthesis and Installation of Metal Chelates into Biomolecules in a Single Step*. *Journal of the American Chemical Society*, 2006. **128**(47): p. 15096-15097.
140. Rostovtsev, V.V., et al., *A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002. **41**(14): p. 2596-2599.
141. Moses, J. and A. Moorhouse, *The growing applications of click chemistry*. *Chemical Society Reviews*, 2007. **36**: p. 1249-1262.

142. Tron, G.C., et al., *Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes*. Medicinal Research Reviews, 2008. **28**(2): p. 278-308.
143. Hausner, S.H., et al., *In Vivo Positron Emission Tomography (PET) Imaging with an $\alpha_m\beta_6$ Specific Peptide Radiolabeled using ^{18}F -“Click” Chemistry: Evaluation and Comparison with the Corresponding 4- ^{18}F Fluorobenzoyl- and 2- ^{18}F Fluoropropionyl-Peptides*. Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **51**(19): p. 5901-5904.
144. Hong, V., et al., *Labeling Live Cells by Copper-Catalyzed Alkyne–Azide Click Chemistry*. Bioconjugate Chemistry, 2010. **21**(10): p. 1912-1916.
145. Ross, T.L., et al., *Fluorine-18 Click Radiosynthesis and Preclinical Evaluation of a New ^{18}F -Labeled Folic Acid Derivative*. Bioconjugate Chemistry, 2008. **19**(12): p. 2462-2470.
146. Rajagopalan, R., et al., *Preparation, Characterization, and Biological Evaluation of Technetium(V) and Rhenium(V) Complexes of Novel Heterocyclic Tetradentate N_3S Ligands*. Bioconjugate Chemistry, 1997. **8**(3): p. 407-415.
147. Huisgen, R., *Proceedings of the Chemical Society. October 1961*. Proceedings of the Chemical Society, 1961(October): p. 357-396.

Chapitre II

Préparation d'une famille de ligands triazoles.

La première partie de ce travail a pour objectif la conception et la synthèse d'une famille de ligands contenant un motif triazole combiné avec divers autres motifs chélatants et répondant à des critères précis. Ces ligands seront par la suite criblés selon la pureté et la stabilité en milieu biologique du complexe formé avec ^{99m}Tc .

II.1 Choix d'une structure de ligands

II.1.1. Cahier des charges, propriétés désirées

L'objectif était d'identifier un ou plusieurs complexes de ^{99m}Tc susceptibles d'être utilisés comme plateforme de départ afin de réaliser des traceurs *in vivo*. Dans cette optique, le choix du type de cœur et de la structure complexante était primordial.

Les ligands retenus en tant que candidats pour cette étude devaient avoir une aptitude marquée à former des complexes du technétium. Les complexes ayant vocation à être utilisés en imagerie médicale, leur préparation à partir du ligand devait être effectuée de façon efficace (complexation quantitative), rapide (une seule étape, avec un temps de réaction faible à l'échelle de la période du ^{99m}Tc (6.02 h), si possible sans nécessiter de purification supplémentaire) et

suffisamment simple pour être utilisée en milieu hospitalier par un médecin-manipulateur. Les complexes de Tc(I) de type tricarbonyles nécessitant des conditions de préparations plus délicates (travail sous atmosphère de monoxyde de carbone) ont été écartés au profit des complexes de Tc(V) et plus particulièrement du cœur oxotechnétium (TcO^{3+}) dont nous possédons une expérience significative au laboratoire [1-3] et qui est facilement complexé par des ligands tétradentates, conduisant à des structures rigides.

Les complexes formés devaient être utilisables *in vivo*, et donc impérativement présenter une stabilité élevée en milieu biologique. Les structures retenues devaient par conséquent être les plus stables possibles vis-à-vis de la démétallation ou de l'oxydation. En particulier les réactions d'échange de ligands avec le glutathion ou la cystéine endogènes étaient à minimiser. En effet, les fluides circulants, et notamment le sang, contiennent du glutathion à des concentrations assez variable (environ 250 nM en moyenne mais 2 à 3 mM au niveau cérébral par exemple [4]). La stabilité des complexes du Tc(V), à cœur oxotechnétium, de type N_3X ($X = O, N, S$) ou 3+1 (N_2S/S ou NS_2/S) vis-à-vis de ces réactions est bien documentée [5-8]. Les complexes bimoléculaires 3+1 étant plus sensibles aux réactions d'échanges de ligand avec le glutathion [2, 9, 10], nous avons fait le choix de nous orienter vers des ligands tétradentates de type N_3X ($X = N, O, S$).

Les structures des ligands candidats devaient présenter un maximum de sites permettant d'introduire une fonctionnalisation permettant d'orienter leur bioactivité. C'est au niveau de ces sites qu'il sera possible de modifier chimiquement la plateforme de départ pour la transformer en un traceur intégré ou la relier à une molécule biologique dans le cas d'une approche bifonctionnelle, sans affecter ses propriétés de chélation. Le choix de ces sites et les méthodes de fonctionnalisation sont souvent déterminés de façon empirique. Dans cette optique, il était souhaitable qu'un ou plusieurs de ces sites permette la mise en œuvre de chimie combinatoire afin d'envisager la préparation simple et rapide de chimiothèques de ligands fonctionnalisés.

Enfin, d'un point de vue pratique, la synthèse de ces ligands devait privilégier une approche convergente mettant en jeu des réactions simples et efficaces.

II.1.2 De complexes références à une structure générale

Lors de la mise au point de la structure de base utilisée pour le développement de la famille de ligands, nous nous sommes intéressés à deux types de complexes décrits dans la littérature.

Les complexes Triazole-tricarbonyles

Depuis quelques années, l'équipe de R. Schibli développe des complexes tricarbonyles mettant en jeu un ligand tridentate présentant au sein de sa structure un ou plusieurs noyaux 1,2,3-triazoles directement impliqués dans la complexation du technétium [11-13] (Fig. II.1.). Ces complexes se forment de façon quantitative et ne nécessitent aucune purification. En outre, le noyau 1,2,3-triazole est introduit par une réaction de chimie click (cf II.3.2), la cycloaddition dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre. Cette stratégie permet d'introduire au niveau du noyau triazole une large variété de substituants via des méthodes combinatoires. Néanmoins l'obtention de ces complexes de Tc(I) nécessite des conditions délicates avec notamment la manipulation sous atmosphère de monoxyde de carbone (voir chapitre 1).

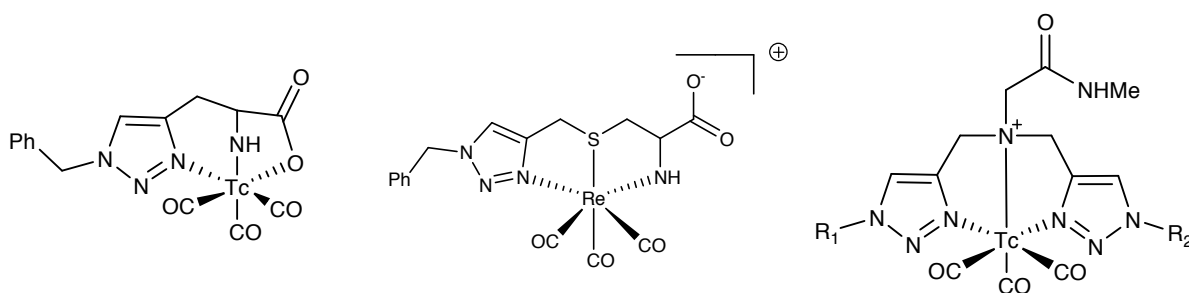


Fig. II.1. : Complexes Tc-Tricarbonyles à ligands triazoles (à gauche : Mindt, Struthers et al. 2006, au centre : [12] , à droite : Mindt, Schweinsberg et al. 2009).

Les complexes Tc(V)-N₃S à noyau pyridyle ou imidazolyle

Le second type de complexes auquel nous nous sommes intéressés regroupe des complexes du Tc(V) contenant des ligands tétradentates de types N₃S dans lesquels un des atomes d'azote chélatant le métal appartient à un cycle hétéroaromatique de type pyridyle ou imidazole (Fig. II.2.) [14]. Ces complexes sont obtenus avec d'excellents rendements (supérieurs à 90%) et sont particulièrement stables lors de tests de compétition par la cystéine (moins de 10% de dégradation après 24h). Le cœur oxotechnetium présentait l'avantage par rapport au cœur technétium tricarbonyle d'être obtenu très facilement par réduction du pertechnétate de sodium en présence du ligand. Enfin, la structure de ces complexes est plus rigide et plus variée que les complexes Tc-tricarbonyles, permettant ainsi d'envisager diverses approches de fonctionnalisation via des méthodes combinatoires.

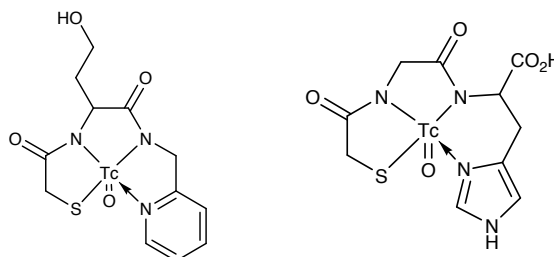


Fig. II.2. : Complexe ^{99m}Tc-N₃S à noyau pyridyle ou imidazole

Une structure générale conjuguant les propriétés de ces deux types de complexes

La structure de base que nous avons retenue pour le design de l'ensemble des ligands tend à conjuguer les principales propriétés de ces deux types de complexes. Il s'agira de complexes du Tc(V) de type N₃X où X = N, O, S dans lesquels un noyau 1,2,3-triazole participe directement à la complexation via l'azote 3. L'obtention de ce noyau triazole par chimie click permettra d'introduire facilement de la diversité sur cette position par chimie combinatoire lors de l'étape de fonctionnalisation ultérieure. Pour cette première étude, nous avons choisi un noyau 1-benzyl-triazole pouvant être intégré dans cette structure à deux positions distinctes. Le groupement benzyle a été retenu car il est inerte vis à vis de la chélation du technétium et facile à introduire par chimie-click à partir de l'azote correspondant. Il est situé sur le site présentant le plus fort potentiel de fonctionnalisation et permet d'avoir une première idée de l'effet de la présence d'un

substituant de taille moyenne sur cette position sans risque d'interférence avec le processus de chélation. La structure générale de ces complexes permet une synthèse de type peptidique.

La série A regroupera les ligands pour lesquels l'alcyne précurseur du triazole est introduit au niveau de l'acide carboxylique de la glycine par couplage peptidique. En N-terminal, six blocs variables seront introduits par couplage peptidique (A1) ou alkylation (A2).

La série B regroupera les ligands pour lesquels l'alcyne précurseur du triazole est introduit à l'extrémité amine de la glycine par alkylation (B1) ou couplage peptidique (B2). En C-terminal, le bloc variable est toujours introduit par couplage de type peptidique.

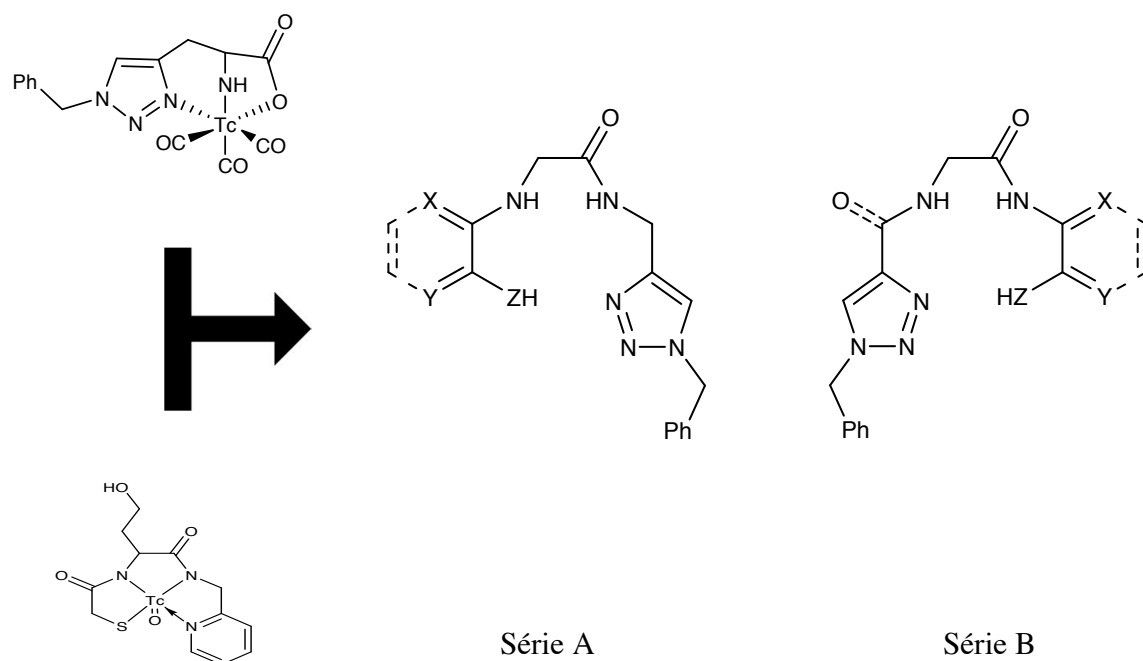


Fig. II.3. : La structure de base de la famille de complexes étudiés (A), la structure « symétrique » (B) avec X,Y = O, CH et Z = O, S, NH, NAc.

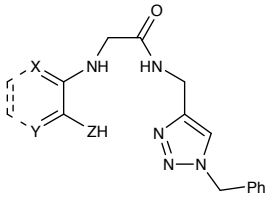
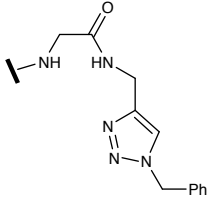
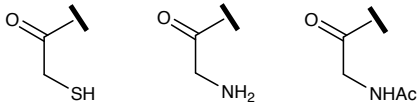
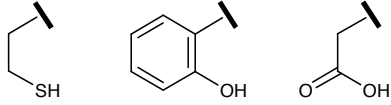
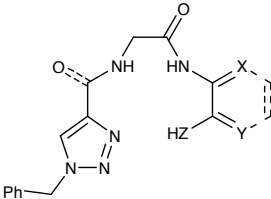
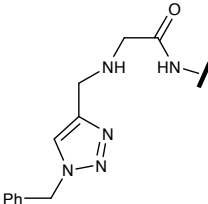
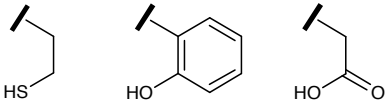
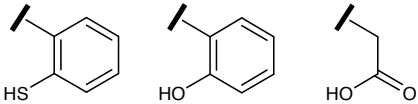
			A1
			A2
			B1
			B2

Fig. II.4. : Détail de l'ensemble de 12 ligands sélectionnés.

Le choix des divers blocs fonctionnels variables a été guidé par la littérature concernant les complexes à cœur oxotechnétium [15, 16].

Le motif mercaptoacétique est régulièrement utilisé pour introduire le groupement thiol qui est un très bon chélatant du technétium. On le retrouve notamment dans la structure de MAG_3 (Fig. II.5.a-c) [17, 18]. L'utilisation du motif thioéthyl, a permis d'évaluer l'effet du passage à une structure N_3S possédant une amine à la place d'une fonction amide chélatante.

Enfin l'utilisation de motifs aromatiques ortho-substitués a été inspirée par les travaux de l'équipe de E. Benoist [19-21] (Fig. II.5.d.). Dans cette catégorie de motifs, nous nous sommes intéressés aux groupements phénol et thiophénol.

Le motif glycol central est resté constant au cours de cette étude du fait de sa simplicité de synthèse et d'utilisation (pas de chaîne pouvant introduire des contraintes stériques ou interférer avec la chélation du technétium). De plus, ce motif « acide aminé » offre la possibilité de

nombreuses variations ultérieures en utilisant le répertoire des acides aminés proteogéniques et non-naturels.

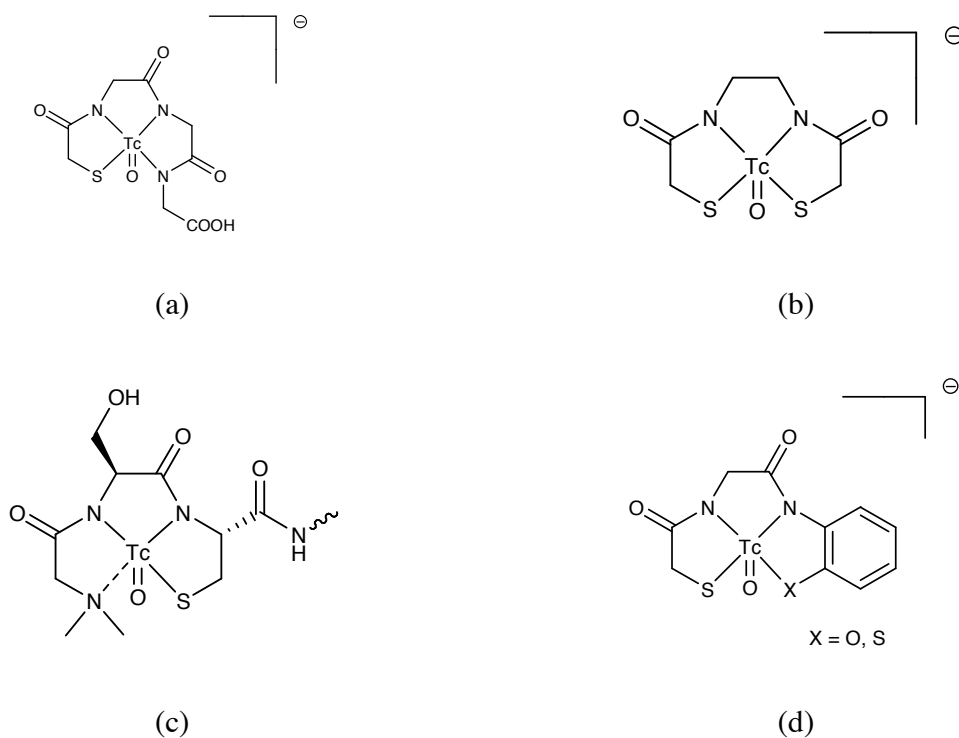


Fig. II.5. : Choix des motifs chélatants.

Motif mercaptoacétique : (a) Tc-MAG₃ [22], (b) anion oxo[N,N'-ethylenebis(2-mercaptoacetimido)]technetate [18], (c) une variante fonctionnalisée [17]

Motifs aromatiques ortho-substitués : (d) [19]

En dehors de ces 12 ligands, deux autres composés ont été synthétisés pour servir de références. Ils ont permis d'évaluer l'influence sur la complexation du noyau triazole chélatant le métal. Il s'agit d'un ligand amine-diamidethiol (N₃S) et d'un ligand diamidedithiol (N₂S₂). Ces composés ont été choisis car ils constituent des versions non fonctionnalisées de structures chélatantes utilisées régulièrement pour le marquage de biomolécules (Fig. II.6.) [23, 24] .

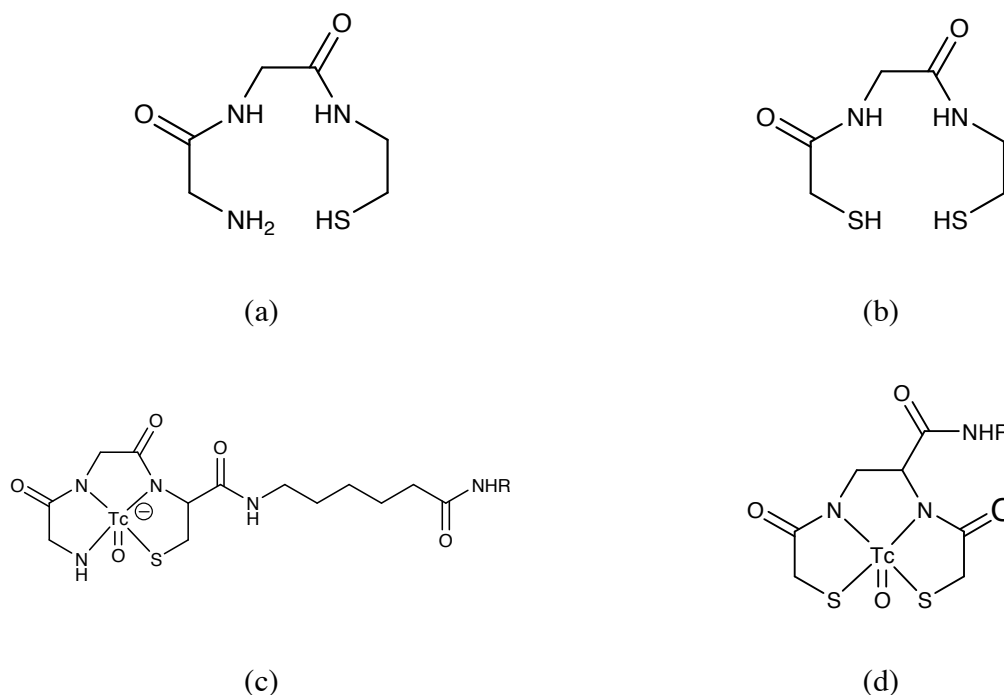


Fig. II.6.: Des composés références directement inspirés de structures chélatantes régulièrement utilisées.

(a) référence N₃S ; (b) référence N₂S₂ ; (c) et (d) structures N₃S et N₂S₂ utilisées pour le marquage de peptides.

II.2. La réaction de cycloaddition de Huisgen

Au sein des structures de chacun des ligands synthétisés figure un noyau triazole obtenu via la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen. Les cycloadditions de Huisgen permettent la formation de cycles à partir de deux réactifs insaturés : un alcyne et une molécule dipolaire telle qu'un azoture d'alkyle. Dans l'usage courant, la cycloaddition de Huisgen est d'ailleurs assimilée au cas particulier de la cycloaddition d'un azoture sur un alcyne.

II.2.1. Formation de triazole par cycloaddition

Dans les années 1960, R. Huisgen met au point la réaction de cycloaddition d'un azoture sur un alcyne [25]. Cette réaction, qui permet l'obtention de 1,2,3-triazoles, présente l'avantage

d'être très permissive en terme de solvants utilisés et peu sensible aux fonctions chimiques avoisinantes. En contrepartie, elle présente l'inconvénient d'être non régiospécifique, un mélange de triazole 1,4 et 1,5 substitués est obtenu (Fig. II.7.). Néanmoins, il est possible d'orienter la régiosélectivité en utilisant des alcynes terminales particulièrement déficitaires en électrons ou même d'assurer une régiospécificité dans le cas de cycloadditions intramoléculaires conduisant à des composés bicycliques [26].

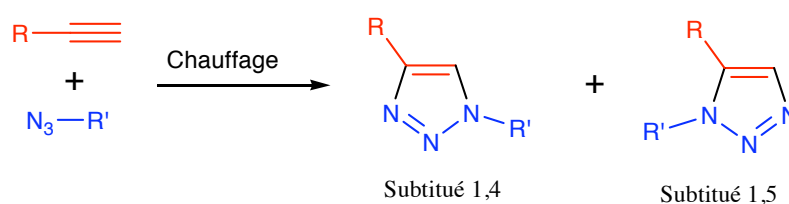


Fig. II.7. : La cycloaddition de Huisgen mène à deux régioisomères du 1,2,3-triazole.

Outre sa non régiospécificité, cette réaction présentait à l'époque l'inconvénient de nécessiter un chauffage qui rendait son utilisation avec des azotures de faible poids moléculaire dangereuse en raison du caractère facilement explosif de ces derniers. Pour toutes ces raisons, cette réaction était peu utilisée dans ces conditions.

II.2.2. Cycloaddition de Huisgen catalysée

L'utilisation de métaux de transition a permis le développement d'une version catalysée de la cycloaddition de Huisgen. Alors que l'utilisation de complexes du ruthénium permet d'obtenir spécifiquement le triazole 1,5 substitué [27], l'utilisation de complexes de Cu(I) a permis l'obtention spécifique du régioisomère 1,4 [28] (Fig II.8.). Nous nous intéresserons exclusivement à la formation du triazole substitué 1,4 utilisé dans cette étude.

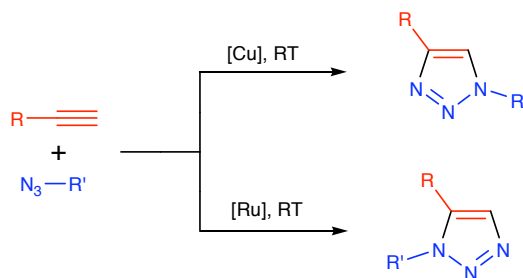


Fig. II.8. : Cycloaddition de Huisgen catalytique

En 2001, le professeur K.B. Sharpless (prix Nobel de chimie 2001) a défini une nouvelle classes de réactions chimiques répondant à un ensemble de critères très sélectif, il pose alors la définition de la chimie click:

«une réaction click doit être modulaire, avoir un large champ d'application, des rendements élevés, ne créer que des sous-produits inoffensifs et pouvant être éliminés par chromatographie, stéréospécifique, simple à mettre en place et dans des solvants inoffensifs ou facilement éliminables » [29].

Parmi ces réactions, la cycloaddition catalysée au cuivre d'un alcyne et d'un azoture (appelée classiquement CuAAC, de l'anglais Cu-Catalysed Azide-Alkyne Cycloaddition) mise au point par l'équipe de K.B. Sharpless en 2002 [28] est de loin la plus connue. Elle est d'ailleurs régulièrement assimilée à la chimie click. La catalyse au cuivre présente de nombreux avantages. Elle permet d'une part l'obtention régiospécifique du 1,4-triazole et d'autre part de réaliser la cycloaddition à température ambiante en réduisant les temps de réactions jusqu'à quelques minutes.

La chimie-click est régulièrement utilisée en chimie combinatoire pour le développement de banques ou chimiothèques de composés. Celles-ci peuvent être préparées en solution mais le plus souvent, pour des raisons de simplicité de traitement post-réactionnel, les chimiothèques sont développées sur support solide [30, 31]. Plus récemment, diverses équipes ont développées des stratégies combinatoire grâce à la chimie click *in situ* (Fig. II.8)[32-34].

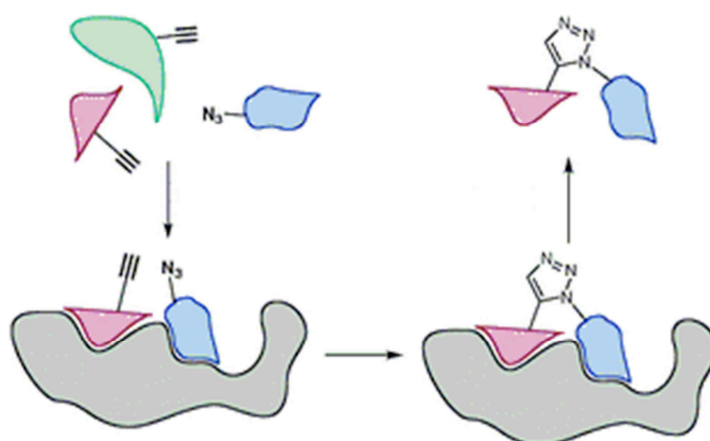


Fig. II.9. : Principe de la chimie click *in situ* pour l'identification d'inhibiteurs d'une protéine.

Le principe de la chimie click *in situ* consiste à identifier des ligands d'une protéine ou d'un récepteur en mettant en présence en solution une chimiothèque d'azotures et une chimiothèque d'alcynes substitués, dans les conditions de cyclisation et en présence du récepteur ciblé. Ce récepteur va exercer une pression de sélection en favorisant grandement la réaction entre les motifs qui s'insèrent le mieux dans son site actif. C'est là, *in situ*, qu'a lieu la cyclisation (Fig. II.9.). Les motifs n'ayant pas été sélectionnés par la protéine sont ensuite éliminés, et le ligand identifié est caractérisé en masse. Cette méthode très élégante permet d'augmenter considérablement les chances d'obtenir des inhibiteurs efficaces des protéines étudiées.

Les conditions expérimentales de la cycloaddition de Huisgen catalysée

La réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre (CuAAC) est d'une grande souplesse du point de vue des conditions expérimentales. Si des mélanges alcool (alcool tertbutylique, méthanol, éthanol)/eau sont couramment utilisés comme solvant, la réaction peut également être réalisée dans l'eau sans cosolvant à des pH pouvant aller de 4 à 12. De plus le groupement triazole formé est inerte vis-à-vis des autres groupements fonctionnels, et stable dans les conditions de réaction usuelles. Le catalyseur est le cuivre au degré d'oxydation I. Il peut être introduit directement via des sels tels que CuI, ou CuOTf. Néanmoins, dans ces conditions, des sous-produits peuvent apparaître et le dioxygène dissous dans les solvants peut entraîner l'oxydation du catalyseur en Cu(II). Ainsi, la formation *in situ* de Cu(I) est très souvent préférée. Elle est réalisée en utilisant un sel de Cu(II) tel que le sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) et un réducteur : cuivre (Cu(0)) ou le plus souvent de l'ascorbate de sodium. Cette dernière méthode permet de minimiser l'oxydation du cuivre par le dioxygène dissous dans les solvants.

De nombreuses variantes de ces conditions jouant essentiellement sur la forme du catalyseur ont été développées. Ainsi des techniques de fixation du catalyseur sur phase solide [35] ou de catalyse hétérogène [36] ont été proposées, permettant d'éliminer le catalyseur par simple filtration. La réaction a également été réalisée en présence de Cu(II) sans ascorbate de sodium ni Cu(0), en mettant alors à profit les propriétés réductrices de l'alcool utilisé comme solvant [37]. L'utilisation de micro-ondes s'est également développée : elle permet de réduire de façon significative les temps de réactions, parfois jusqu'à seulement quelques minutes [38-40].

Enfin, plusieurs protocoles proposent la formation de l'azoture *in situ* à partir du dérivé bromé correspondant et d'azoture de sodium [41, 42]. Ces procédés permettent d'éviter la manipulation et le stockage dangereux d'azotures d'alkyles de bas poids moléculaires (Fig. II.10.).

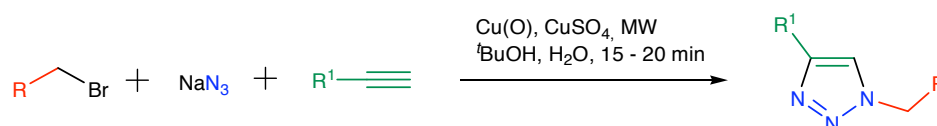


Fig. II.10. : Préparation de triazoles substitué 1,4 avec formation *in situ* de l'azoture d'alkyle

Mécanisme catalytique et régiospécificité

L'explication du phénomène catalytique lié à la présence de Cu(I) repose sur l'activation de l'alcyne (Fig. II.11.). Cette activation a pour conséquence une augmentation de la vitesse de réaction d'un facteur allant jusqu'à 10^7 dans certains cas. La régiospécificité de la CuAAC s'explique quant à elle par le caractère dipolaire de l'azoture. Celui-ci va venir se coordiner au cuivre exclusivement via l'atome N(1) riche en électron qui porte la chaîne alkyle. Le passage par un intermédiaire cyclique à 6 chaînons proposé par K.B. Sharpless [28] permet l'obtention du triazole substitué 1,4 et la régénération du catalyseur.

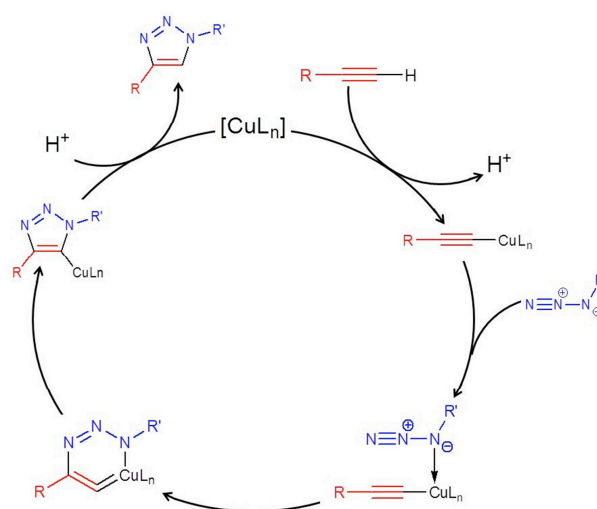


Fig. II.11. : Mécanisme catalytique de la CuAAC proposé en 2002 par K.B. Sharpless

II.2.3. Les conditions expérimentales employées

Nous avons vu que la formation de triazoles via la cycloaddition de Huisgen peut s'effectuer dans des conditions très variées. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à deux types de conditions. Dans un premier temps, nous avons choisi un protocole réalisé dans un mélange DMSO/eau (9/1) en formant l'azoture de benzyle *in situ* à partir de bromure de benzyle et d'azoture de sodium. Le catalyseur utilisé est $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en présence d'ascorbate de sodium (Procédure 1, fig. II.12) [42, 43].

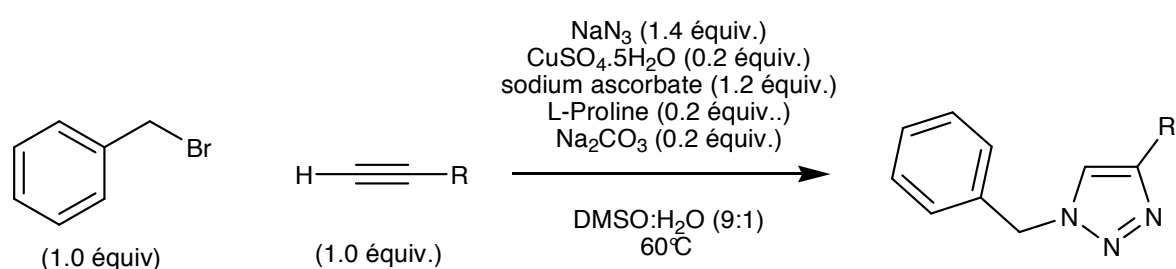


Fig. II.12. : Procédure de cycloaddition de Huisgen n°1 : DMSO/H₂O (9/1), 60°C.

Ce protocole présente deux inconvénients majeurs : plusieurs jours de réaction peuvent être nécessaires pour obtenir un rendement convenable et l'extraction du DMSO s'avère particulièrement délicate, entraînant une chute significative des rendements. Nous nous sommes alors tournés vers un protocole plus efficace utilisant les micro-ondes en flacon scellé (300W, 80°C, 30 min) afin de réduire considérablement les temps de réaction [39]. En outre nous avons effectué cette réaction dans un mélange EtOH : H₂O (7 : 3) permettant une bonne solubilisation des réactifs et un traitement beaucoup plus efficace.

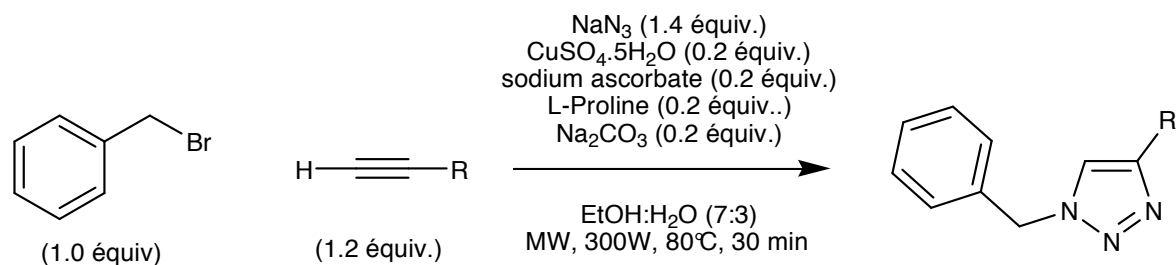


Fig. II.13. : Procédure de cycloaddition de Huisgen n°2 : EtOH/H₂O (7/3), MW, 300W, 80°C, 30 min.

Dans tous les cas, la formation du triazole est toujours l'avant dernière étape de la synthèse de ligands. Le composé est alors déprotégé par un mélange TFA/TIPS/eau sans purification préalable afin de dévoiler les fonctions polaires chélatantes protégées. Une fois déprotégé, le composé est alors purifié par RP-HPLC semi-préparative.

Les synthèses décrites dans la suite de ce chapitre ne sont pas des séquences optimisées. En effet, notre but était d'obtenir rapidement et en quantité suffisante les ligands afin de les tester, les produits les plus efficaces faisant l'objet, le cas échéant, d'une adaptation des conditions et une amélioration des rendements. Notamment, deux protocoles de cyclisation dipolaire ont été utilisés : le choix de la méthode est purement chronologique, la méthode utilisant les micro-ondes ayant été employée plus tardivement.

II.3. Synthèse des 12 ligands et 2 références

II.3.1. Synthèse des ligands de la série A

Les six ligands de la série A peuvent être séparés en deux catégories. D'une part des ligands diamide-triazole (**1** et **2**) ou triamide-triazole (**3**) obtenus par un double couplage peptidique et qui constituent la série A1, d'autre part trois ligands de type amide-amine-triazole (**4** - **6**) formant la série A2 (Fig. II.4.).

Les synthèses des ligands **1** et **2** sont réalisés en 4 étapes par un double couplage peptidique suivi d'une réaction de cycloaddition de Huisgen. Le composé **3** est obtenu directement à partir de **2** par acylation afin de pouvoir étudier l'effet d'un ligand triamide sur la complexation du technétium (Fig. II.14.).

La figure II.15. montre les chromatogrammes obtenus pour ces trois ligands en RP-HPLC (UV 220 nm). On remarque que le ligand **1** a tendance à conduire à un second composé avec le temps (pic à $t_R = 17.3$ min). S'agissant d'un thiol, il s'agit vraisemblablement d'un phénomène de dimérisation par oxydation en disulfure.

Chapitre II : Préparation d'une famille de ligands triazoles.

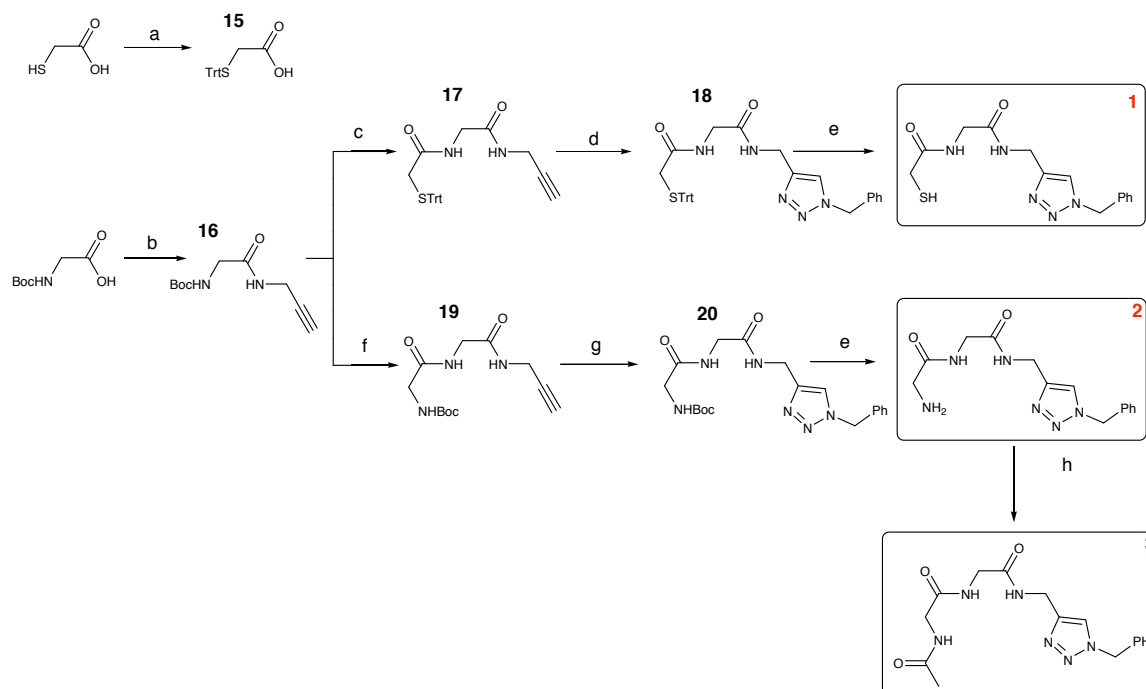


Fig. II.14. : Synthèse des ligands de la série A1 : (a) TrtOH, TFA, rt, 3h, 92% ; (b) BocGlyOH, DCC, DIPEA, THF, rt, 24h, 64% ; (c) 1) DCM/TFA (2/1), 0°C, 1.5h, 2) **15**, DCC, DIPEA, DCM, rt, 24h, 50% ; (d) CuAAC procédure n°1, 38% ; (e) TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5), rt, 2h ; (f) 1) DCM/TFA (2/1), rt, 1h, 2) BocGlyOH, DCC, DIPEA, DMF, rt, 48h, 73% ; (g) CuAAC procédure n°2, 78% ; (h) (AcO)₂O, DIPEA, rt, 2h, 93%.

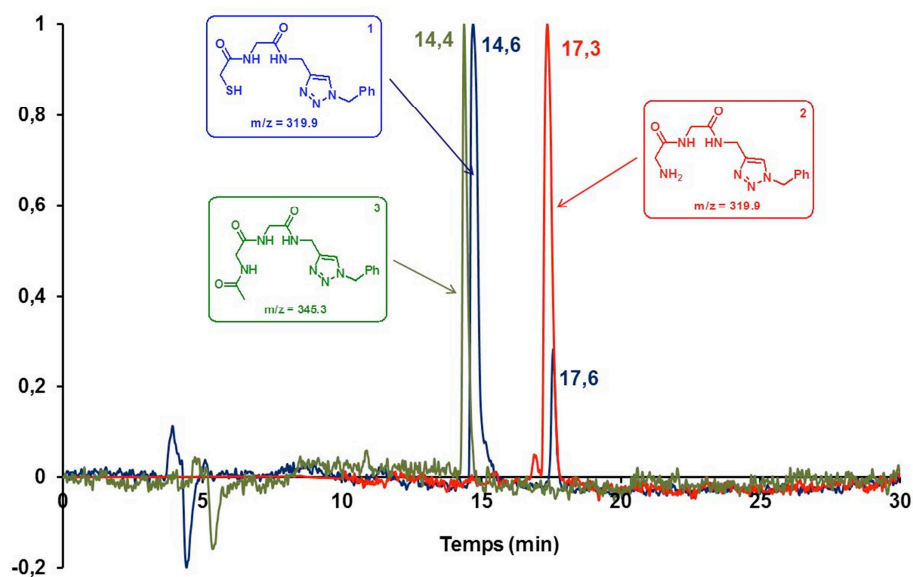


Fig. II.15. : Chromatogrammes RP-HPLC analytique des ligands 1 – 3 (UV 220 nm). (■ : 1, ■ : 2, ■ : 3)

Les ligands de la série A2 (**4** à **6**), de type amine-amide-triazole, sont obtenus en trois étapes à partir du bromure de bromoacétyle. Après une première réaction d'acylation en présence de propargylamine, le motif variable de ces ligands est fixé par alkylation (réaction lente nécessitant un chauffage à 50°C) (Fig. II.16.).

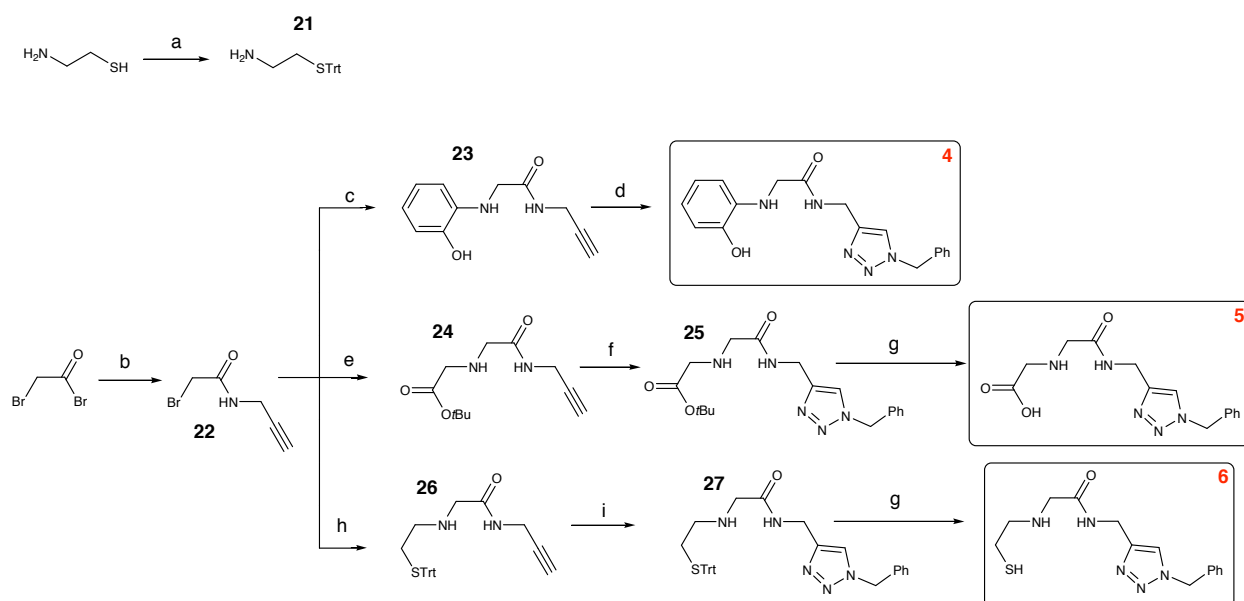


Fig. II.16. : Synthèse des ligands **4** à **6** : (a) TrtOH, TFA, rt, 2h, 86% ; (b) Propargylamine, Cs₂CO₃, DCM, 0°C, 30 min, quant. ; (c) 2-aminophenol, Cs₂CO₃, DMF, 50°C, 7j, 38% ; (d) CuAAC Procédure n°1, 24%, (e) chlorhydrate de *tert*-butylglycine, Cs₂CO₃, DMF, 50°C, 3j, 19% ; (f) CuAAC, Procédure n°1, 63% ; (g) TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5), rt, 2h ; (h) **21**, Na₂CO₃, DMF, 50°C, 24h, 48% ; (i) CuAAC, Procédure n°2, 54%.

Lors de la purification par chromatographie flash des composés **23** à **26**, issus de l'alkylation, le composé monoalkylé était le composé majoritaire. Néanmoins, d'autres composés visibles en chromatographie sur couche mince et les rendements relativement faibles obtenus laissent penser qu'un phénomène de dialkylation favorisé par le chauffage à 50°C a pu intervenir. Ceci est illustré à la figure II.17. dans le cas de la formation du composé **26** qui peut également conduire au sous-produit dialkylé **26b**.

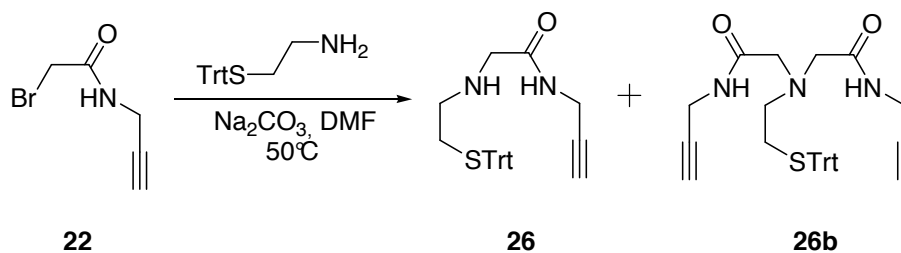


Fig. II.17. : Phénomène de dialkylation illustré sur la formation du composé **26**

Comme précédemment, dans le cas du ligand thiol **6**, on observe avec le temps la formation d'un produit d'oxydation caractérisée par l'apparition d'un pic secondaire ($t_R = 16.2$ min) (Fig. II.18). Le phénomène observé entre 10 et 14 min (« bosse ») est attribuable à la colonne analytique utilisée qui était vieillissante et est devenue inutilisable peu de temps après cette expérience. Néanmoins, dans un souci de cohérence, nous l'avons utilisée pour caractériser l'ensemble des ligands (voir aussi fig. II.23.).

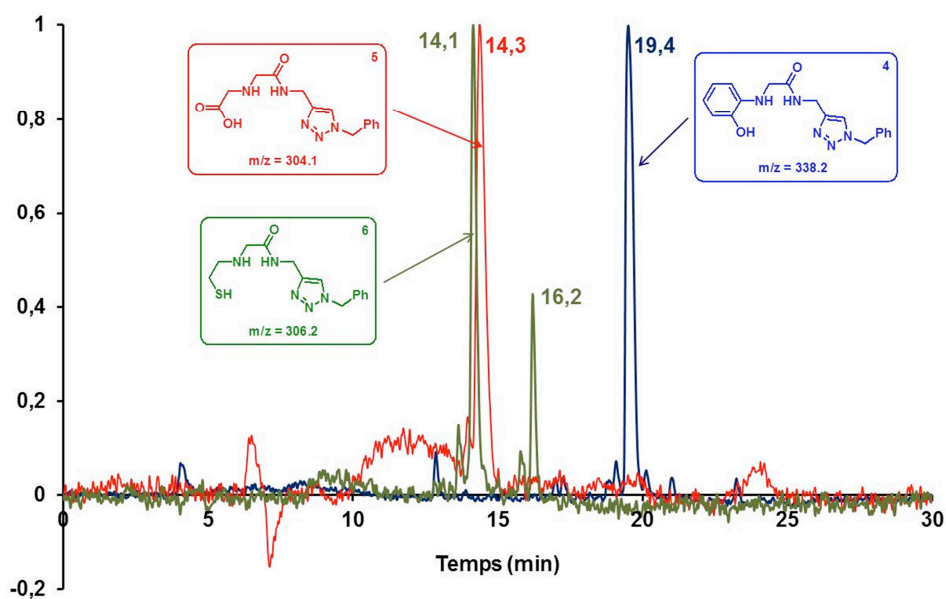


Fig. II.18. : Chromatogrammes RP-HPLC analytique des ligands **4 - 6** (UV 220 nm). (■ : **4**, ■ : **5**, ■ : **6**)

II.3.2. Synthèses des 3 ligands de la série B1

Pour ces composés, le bloc fonctionnel est introduit par couplage peptidique sur la Cbz-Glycine ou acylation par le bromure de bromoacétyle. L'alcyne précurseur du noyau triazole est introduit via une réaction d'alkylation faisant intervenir la propargylamine ou le bromure de propargyle.

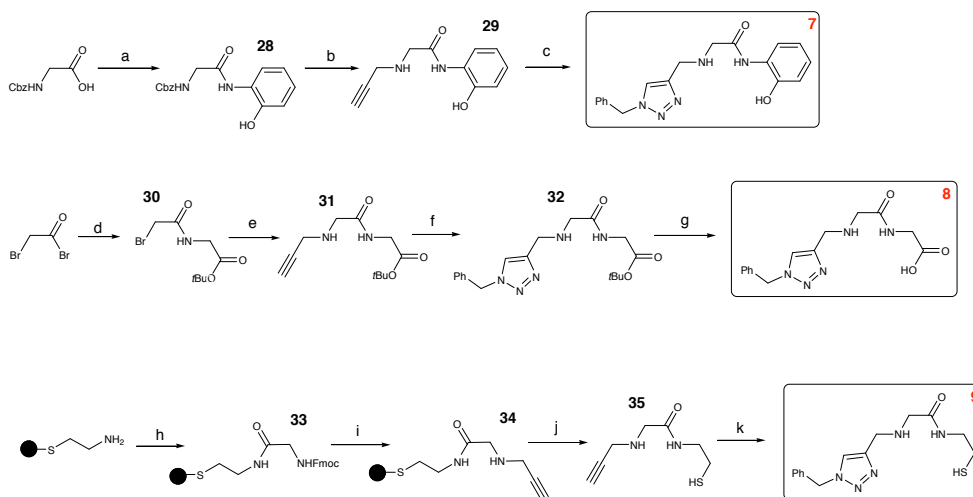


Fig. II.19. : Synthèse des ligands 7 à 9 : (a) 2-aminophénol, DCC, DIPEA, THF, rt, 6h, 86% ; (b) 1) H₂, Pd/C, MeOH, 89%, 2) Bromure de propargyle, rt, 48h, 24% ; (c) CuAAC Procédure n°1 ; (d) Chlorohydrate de *tert*-butylglycine, Cs₂CO₃, DCM, 0°C, 30 min ; (e) Propargylamine, Cs₂CO₃, DCM, 50°C, 5j, 38% ; (f) CuAAC, Procédure n°2, 50% ; (g) TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5), rt, 2h ; (h) FmocGlyOH, DCC, DMF, rt, 24h ; (i) 1) DMF/Pipéridine (4/1), rt, 3x5 min, 2) chlorure de propargyle, DCC, DMF, rt, 24h ; (j) TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5), rt, 2x1h ; (k) CuAAC, Procédure n°2, 24%.

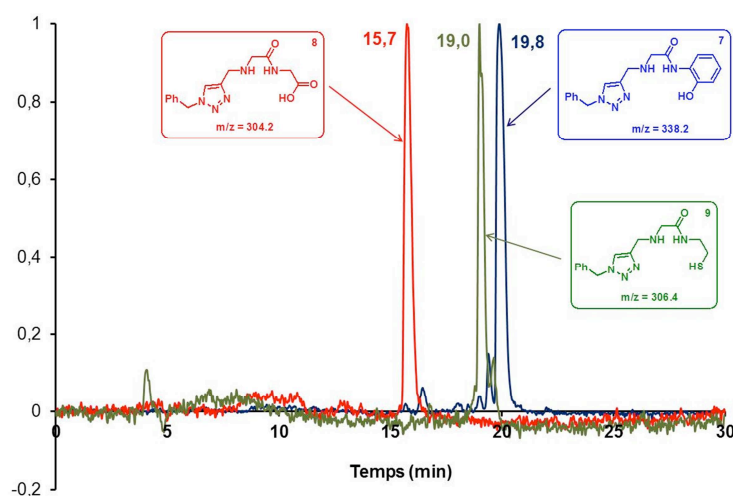


Fig. II.20. : Chromatogrammes RP-HPLC analytique des ligands 7 - 9 (UV 220 nm). (■ : 7, ■ : 8, ■ : 9)

II.3.3. Synthèses des 3 ligands de la série B2

Couplage peptidique de l'acide propiolique

Le couplage de l'acide propiolique a représenté une réelle difficulté dans la synthèse des composés **10** à **12**. Lors de tentatives de couplages par la voie classique (DCC, DIPEA dans le DMF), on observait une réaction immédiate au moment de l'ajout de la DIPEA se traduisant par un noircissement de la solution. Dans ces conditions, la réaction conduisait à un mélange de produits non identifiés.

En 2008, ces difficultés ont été évoquées dans le cas de la synthèse sur phase solide, la précipitation de l'acide propiolique étant observée lors de l'ajout de DIPEA à un mélange acide propiolique/HATU. Cette difficulté avait pu être contournée en pré-conditionnant la résine dans une solution de DIPEA à 10% dans le DMF. Dans ces conditions le rendement de couplage très faible permettait néanmoins de réaliser la synthèse en répétant le couplage à de multiples reprises [44].

En solution, comme dans notre cas, l'utilisation de DIPEA était donc impossible. Nous nous sommes alors tournés vers la méthode de l'anhydride symétrique (Fig. II.21.) qui ne nécessite pas de DIPEA [45]. L'anhydride symétrique est formé par réaction de l'acide propiolique avec le DCC, l'adduit acide-DCC réagissant à son tour avec une molécule d'acide propiolique. L'amine vient alors réagir avec l'anhydride, libérant une molécule de propiolate, ce qui implique donc d'utiliser deux équivalents d'acide au cours de la première étape.

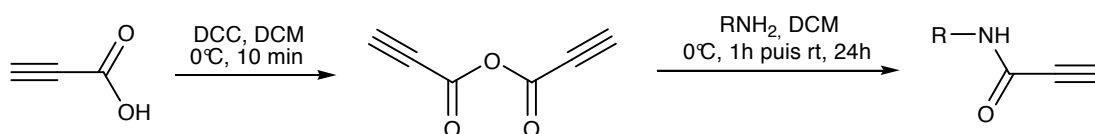


Fig. II.21. : Couplage de l'acide propiolique par la méthode de l'anhydride symétrique.

Descriptif des synthèses

Le couplage de l'acide propiolique étant une étape délicate conduisant à la formation de plusieurs sous-produits visibles en chromatographie sur couche mince, nous avons souhaité éviter l'utilisation de Fmoc-Glycine afin de réduire le nombre de composés (résidus de déprotection et

sous-produits) lors de la purification. Les composés **10** et **11** ont donc été préparés à partir de la Cbz-Glycine. Le groupement carboxybenzyle présente en effet l'avantage d'être éliminé très proprement par hydrogénation catalytique et de conduire au produit déprotégé sans résidu de déprotection tout en fournissant une amine libre non protonnée. Ainsi le couplage de l'acide propiolique peut être réalisé sur un intermédiaire réactionnel obtenu pur. Cette approche particulière n'a tout de fois pas pu être utilisée pour l'obtention du composé **12** puisque les protections carboxybenzyle et trityle ne sont pas toujours orthogonales, le trityle pouvant réagir au cours de l'hydrogénation. Cette dernière synthèse a donc été réalisée à partir de la Fmoc-Glycine.

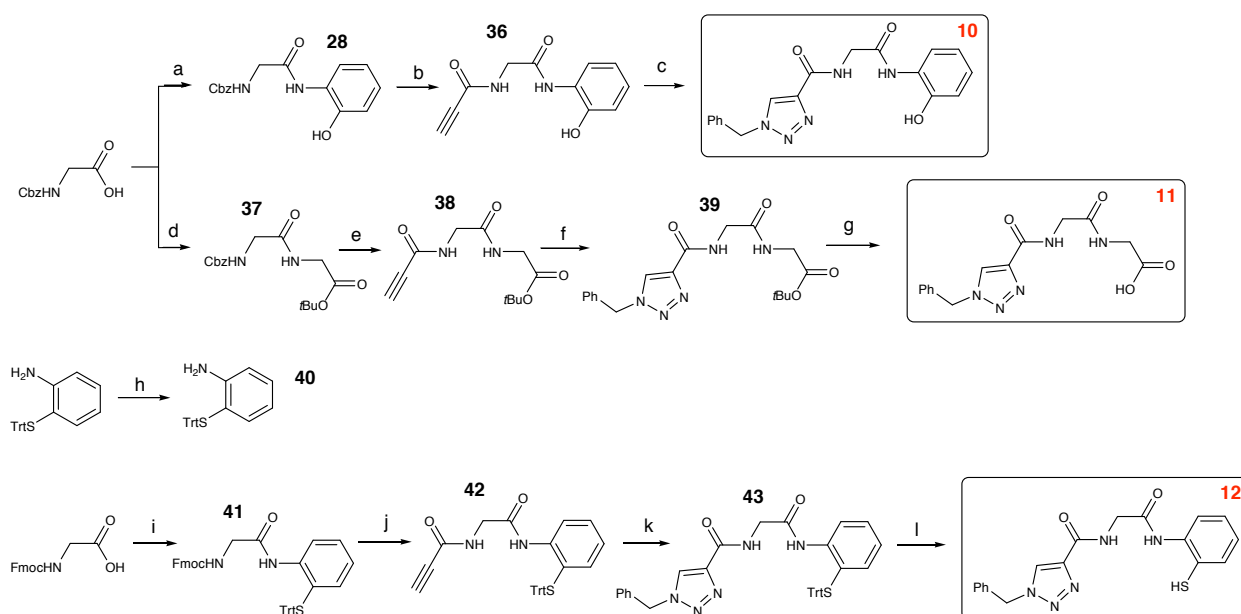


Fig. II.22. : Synthèse des ligands **10** à **12** : (a) 2-aminophénol, DCC, DIPEA, THF, rt, 6h, 86% ; (b) 1) H₂, Pd/C, MeOH, 1.5h, 2) acide propiolique, DCC, DCM, 0°C, 1h, puis rt, 24h, 7% ; (c) CuAAC, Procédure n°2, 58% ; (d) Chorohydrate de *tert*-butylglycine, DCC, DIPEA, THF, rt, 5h, 46% ; (e) 1)H₂, Pd/C, MeOH, 1.5h, 2) acide propiolique, DCC, DCM, 0°C, 1h, puis rt, 24h, 12% ; (f) CuAAC, Procédure n°2, 56% ; (g) TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5), rt, 2h ; (h) TrtOH, TFA, DCM, rt, 2h, 88% ; (i) **40**, DCC, THF, rt, 24h, 72% ; (j) 1) DMF/Pipéridine (4/1), 2) acide propiolique, DCC, DCM, 0°C, 1h, puis rt, 24h, 28% ; (k) CuAAC, Procédure n°1, 22% ; (l) TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5), rt, 2h.

Les chromatogrammes en RP-HPLC analytique de ces 3 ligands sont indiqués sur la figure I.23. et permettent de noter, là encore, un phénomène d'oxydation dans le cas du ligand thiophenol **12**, ce qui tend bien à accréditer la thèse de l'oxydation.

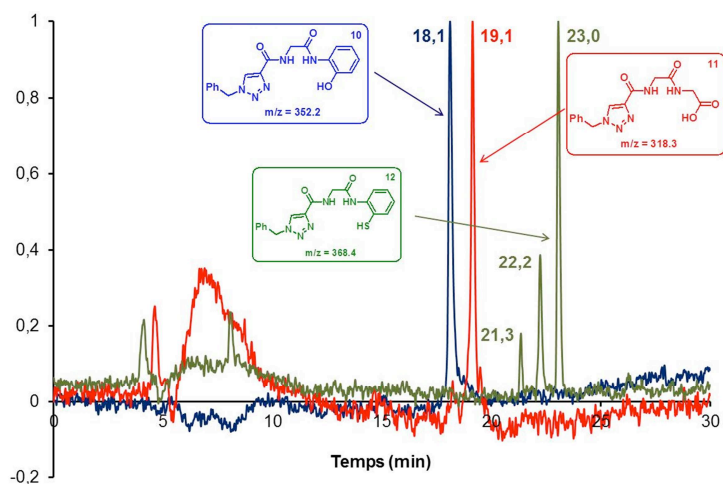


Fig. II.23.: Chromatogrammes RP-HPLC analytique des ligands **10** - **12** (UV 220 nm). (■ : **10**, ■ : **11**, ■ : **12**)

II.3.4. Synthèses des deux ligands références

Les deux références **13** et **14** ont été synthétisées grâce à une synthèse convergente en phase solide sur résine 4-méthoxytrityl cystéamine par un double couplage peptidique.

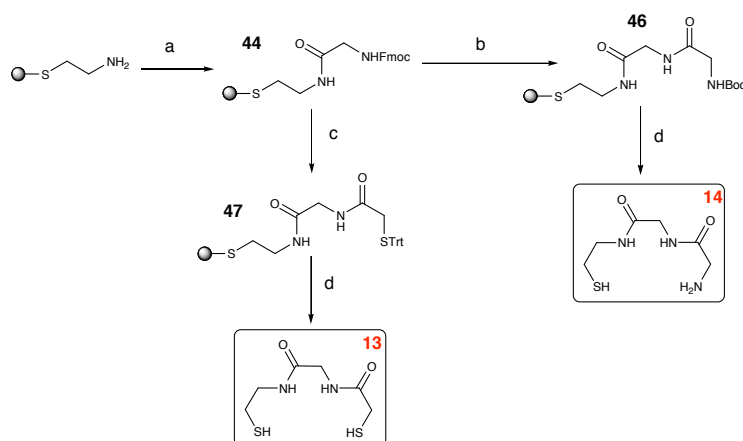


Fig. II.24.: Synthèse des ligands références **13** (N₂S₂) et **14** (N₃S) sur phase solide : (a) FmocGlyOH, DCC, rt, 3h ; (b) 1) DMF/Pipéridine (4/1), 2) BocGlyOH, DCC, DIPEA, NMP, rt, 24h ; (c) 1) DMF/Pipéridine (4/1), 2) **15**, DCC, DIPEA, NMP, rt, 24h ; (d) TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5), rt, 2x30 min.

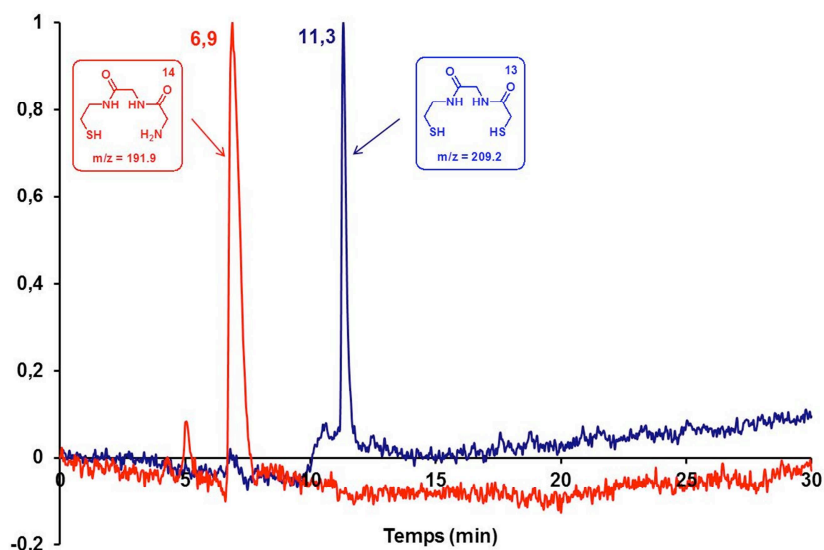


Fig. II.25.: Chromatogrammes RP-HPLC analytique des ligands **10** - **12** (UV 220 nm). (■ : **13**, ■ : **14**)

Dans le cas du composé **13**, un seul pic est observé, il n'y a donc probablement pas cyclisation par formation d'un pont disulfure dans ces conditions.

II.3.5. Conclusion

Nous avons réalisé ici la synthèse de 12 ligands tétradentates du technétium à noyau triazole (**1** – **12**) et de deux ligands références non triazole, respectivement de type N_2S_2 (**13**) et N_3S (**14**). Tous ces composés ont été obtenus avec une pureté de plus de 93% mesurée par HPLC (détection UV 220 nm). Comme on pouvait s'y attendre, les ligands thiols et thiophenol ont tendance à s'oxyder avec le temps. La complexation du technetium s'effectuant en milieu réducteur (voir chapitre 3), il n'est pas nécessaire de purifier à nouveau ces ligands juste avant leur utilisation. (Tableau II.1.).

Lors de ces synthèses, les rendements obtenus à l'étape de cycloaddition sont relativement faibles et en contradiction avec les travaux antérieurs portant sur la chimie click. Ce phénomène pourrait être la conséquence de la structure même des produits de cette réaction puisque les composés de structure N_3S ou N_3O sont eux-mêmes des ligands potentiels du cuivre utilisé pour catalyser la réaction de cycloaddition dipolaire [46] (Fig. II.26.). La majorité des précurseurs acétyléniques engagés dans la cycloaddition de Huisgen, sont protégés. Par exemple, lors de la formation du

triazole, les fonctions thiols sont protégées par un groupement trityle. Néanmoins, on peut penser, comme cela a déjà été observée en présence de technétium ou de rhénium [19], que la chélation peut entraîner leur déprotection. Il est donc possible que le catalyseur soit rendu « inactif » par le produit diminuant ainsi considérablement les rendements.

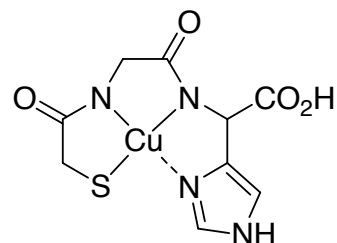


Fig. II.26. : Les ligands N₃S peuvent aussi complexer le cuivre [46].

	Ligand	Fonction caractéristique	HPLC analytique (t _r en min)	Pureté HPLC	Dégradation	MS (MH ⁺) observé)
Type A	1	SH	14,6	99%	x	319,9
	2	NH ₂	17,3	99%		303,2
	3	NHAc	14,4	93%		345,2
	4	Phénol	19,4	93%		338,2
	5	COOH	14,3	97%		304,1
	6	SH	14,1	97%	x	306,2
Type B	7	Phénol	19,8	93%		338,2
	8	COOH	15,7	98%		304,2
	9	SH	19	94%	x	306,4
Type C	10	Phénol	18,1	96%		352,2
	11	COOH	19,1	100%		318,3
	12	Thiophénol	23	98%	x	368,4
Références	13	N ₂ S ₂	11,3	97%		191,9
	14	N ₃ S	6,9	95%		209,2

Tableau II.1. : Bilan des ligands et références synthétisés.

II.4. Références bibliographiques

1. Le Gal, J., et al., *Chelate oxorhenium to assemble new integrin antagonists*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2011. **105**(6): p. 880-886.
2. Clavaud, C., et al., *Dynamic Combinatorial Self-Assembly of Cyclophilin hCyp-18 Ligands through Oxorhenium Coordination*. ChemBioChem, 2008. **9**(11): p. 1823-1829.
3. Aufort, M., et al., *Synthesis, in vitro screening and in vivo evaluation of cyclic RGD analogs cyclized through oxorhenium and oxotechnetium coordination*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2011. **46**(5): p. 1779-1788.
4. Samuelsson, M., L. Vainikka, and K. Öllinger, *Glutathione in the blood and cerebrospinal fluid: a study in healthy male volunteers*. Neuropeptides, 2011. **45**: p. 287-292.
5. Aufort, M., et al., *Oxorhenium-Mediated Assembly of Noncyclic Selective Integrin Antagonists: A Combinatorial Approach*. ChemBioChem, 2011. **12**(4): p. 583-592.
6. Bao, A., et al., *¹⁸⁶Re-Liposome Labeling Using ¹⁸⁶Re-SNS/S Complexes: In Vitro Stability, Imaging, and Biodistribution in Rats*. J Nucl Med, 2003. **44**(12): p. 1992-1999.
7. Moura, C., et al., *Rhenium(V) oxocomplexes with novel pyrazolyl-based N₄- and N₃S-donor chelators*. Dalton Transactions, 2006(47): p. 5630-5640.
8. Perera Pintado, A., et al., *^{99m}Tc-labeling and in vitro characterization of N₄- and N₃S-RGDS-derivative peptides*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2008. **275**(3): p. 619-626.
9. Syhre, R., et al., *Stability versus reactivity of "3+1" mixed-ligand technetium-99m complexes in vitro and in vivo*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 1998. **25**(7): p. 793-796.
10. Nock, B.A., et al., *Glutathione-Mediated Metabolism of Technetium-99m SNS/S Mixed Ligand Complexes: A Proposed Mechanism of Brain Retention*. Journal of Medicinal Chemistry, 1999. **42**(6): p. 1066-1075.
11. Mindt, T.L., et al., *"Click to Chelate": Synthesis and Installation of Metal Chelates into Biomolecules in a Single Step*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(47): p. 15096-15097.
12. Struthers, H., et al., *"Click-to-Chelate": Design and Incorporation of Triazole-Containing Metal-Chelating Systems into Biomolecules of Diagnostic and Therapeutic Interest*. Chemistry – A European Journal, 2008. **14**(20): p. 6173-6183.
13. Mindt, T.L., et al., *A Click Approach to Structurally Diverse Conjugates Containing a Central Di-1,2,3-triazole Metal Chelate*. ChemMedChem, 2009. **4**(4): p. 529-539.
14. Rajagopalan, R., et al., *Preparation, Characterization, and Biological Evaluation of Technetium(V) and Rhenium(V) Complexes of Novel Heterocyclic Tetradentate N₃S Ligands*. Bioconjugate Chemistry, 1997. **8**(3): p. 407-415.

15. Jurisson, S.S. and J.D. Lydon, *Potential Technetium Small Molecule Radiopharmaceuticals*. Chemical Reviews, 1999. **99**(9): p. 2205-2218.
16. Liu, S. and D.S. Edwards, *^{99m}Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals*. Chemical Reviews, 1999. **99**(9): p. 2235-2268.
17. Valliant, J.F., et al., *The solid phase synthesis and NMR spectroscopy of a ⁹⁹Tc chelate-bombesin derived peptide conjugate*. Inorganica Chimica Acta, 2001. **325**(1-2): p. 155-163.
18. Jones, A.G., et al., *Chemical and In Vivo Studies of the Anion oxo[N,N'-ethylenebis(2-mercaptoacetimido)]Technetate(V)*. Journal of Nuclear Medicine, 1982. **23**(9): p. 801-809.
19. Le Gal, J., et al., *Design and synthesis of a novel family of semi-rigid ligands: versatile compounds for the preparation of ^{99m}Tc radiopharmaceuticals*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2004. **2**(6): p. 876-883.
20. Le Gal, J., et al., *Synthesis, metal complexation and biological evaluation of a novel semi-rigid bifunctional chelating agent for ^{99m}Tc labelling*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006. **14**(9): p. 2904-2909.
21. Dorbes, S., et al., *Synthesis, characterization and in vitro evaluation of new oxorhenium- and oxotechnetium-CCK4 derivatives as molecular imaging agents for CCK2-receptor targeting*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2010. **45**(2): p. 423-429.
22. Okarvi, S.M., *Synthesis, radiolabeling and in vitro and in vivo characterization of a technetium-99m-labeled alpha-M2 peptide as a tumor imaging agent*. The Journal of Peptide Research, 2004. **63**(6): p. 460-468.
23. Gourni, E., et al., *Structural Assessment and Biological Evaluation of Two N₃S Bombesin Derivatives*. Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **52**(14): p. 4234-4246.
24. Blok, D., et al., *New chelation strategy allows for quick and clean ^{99m}Tc-labeling of synthetic peptides*. Nuclear Medicine and Biology, 2004. **31**(6): p. 815-820.
25. Huisgen, R., *Proceedings of the Chemical Society. October 1961*. Proceedings of the Chemical Society, 1961(October): p. 357-396.
26. Donald, J.R. and S.F. Martin, *Synthesis and Diversification of 1,2,3-Triazole-Fused 1,4-Benzodiazepine Scaffolds*. Organic Letters, 2011. **13**(5): p. 852-855.
27. Kelly, A.R., et al., *Accessing Skeletal Diversity Using Catalyst Control: Formation of n and n + 1 Macrocyclic Triazole Rings*. Organic Letters, 2009. **11**(11): p. 2257-2260.
28. Rostovtsev, V.V., et al., *A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes*. Angewandte Chemie International Edition, 2002. **41**(14): p. 2596-2599.
29. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless, *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*. Angewandte Chemie International Edition, 2001. **40**(11): p. 2004-2021.

30. Ghosh, K., et al., *Solid phase combinatorial synthesis of a xanthone library using click chemistry and its application to an embryonic stem cells probe*. Chemical Communications, 2011. **47**: p. 7488-7490.
31. Gong, Y., K. Min, and T. Lee, *An efficient solid-phase synthesis of α -1,2,3-triazoloamide derivatives via click chemistry*. Bull Korean Chem Soc, 2011. **32**(7): p. 2453-2456.
32. Kulkarni, S., et al., *Screening of protein-protein interaction modulators via sulfo-click kinetic target-guided synthesis*. ACS Chem Biol, 2011. **6**: p. 724-732.
33. Shelke, S., et al., *A fragment-based in situ combinatorial approach to identify high-affinity ligands for unknown binding sites*. Angewandte Chemie International Edition, 2010. **49**: p. 5721-5725.
34. Mamidyala, S. and M. Finn, *In situ click chemistry: probing the binding landscapes of biological molecules*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**: p. 1252-1261.
35. Girard, C., et al., *Reusable Polymer-Supported Catalyst for the [3+2] Huisgen Cycloaddition in Automation Protocols*. Organic Letters, 2006. **8**(8): p. 1689-1692.
36. Liu, M. and O. Reiser, *A Copper(I) Isonitrile Complex as a Heterogeneous Catalyst for Azide-Alkyne Cycloaddition in Water*. Organic Letters, 2011. **13**(5): p. 1102-1105.
37. Brotherton, W.S., et al., *Apparent Copper(II)-Accelerated Azide-Alkyne Cycloaddition*. Organic Letters, 2009. **11**(21): p. 4954-4957.
38. Bock, V.D., H. Hiemstra, and J.H. van Maarseveen, *CuI-Catalyzed Alkyne-Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective*. European Journal of Organic Chemistry, 2006. **2006**(1): p. 51-68.
39. Klein, M., et al., *Synthesis of 3-(1,2,3-triazol-1-yl)- and 3-(1,2,3-triazol-4-yl)-substituted pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amines via click chemistry: potential inhibitors of the Plasmodium falciparum PfPK7 protein kinase*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2009. **7**(17): p. 3421-3429.
40. Bouillon, C., et al., *Microwave Assisted "Click" Chemistry for the Synthesis of Multiple Labeled-Carbohydrate Oligonucleotides on Solid Support*. The Journal of Organic Chemistry, 2006. **71**(12): p. 4700-4702.
41. Appukkuttan, P., et al., *A Microwave-Assisted Click Chemistry Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles via a Copper(I)-Catalyzed Three-Component Reaction*. Organic Letters, 2004. **6**(23): p. 4223-4225.
42. Feldman, A.K., B. Colasson, and V.V. Fokin, *One-Pot Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles from In Situ Generated Azides*. Organic Letters, 2004. **6**(22): p. 3897-3899.
43. Aufort, M., et al., *Synthesis and antibiotic activity of a small molecules library of 1,2,3-triazole derivatives*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008. **18**(3): p. 1195-1198.

44. Neukamm, M.A., A. Pinto, and N. Metzler-Nolte, *Synthesis and cytotoxicity of a cobaltcarbonyl-alkyne enkephalin bioconjugate*. *Chemical Communications*, 2008(2): p. 232-234.
45. Kleinert, M., et al., *A modular approach for the construction and modification of glyco-SAMs utilizing 1,3-dipolar cycloaddition*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2008. **6**(12): p. 2118-2132.
46. Sugiura, Y., *Newly synthesized sulfhydryl- and imidazole-containing tripeptides with a specific copper-binding site*. *Inorganic Chemistry*, 1978. **17**(8): p. 2176-2182.

Chapitre II – Partie expérimentale

Les procédures générales sont regroupées en annexe, en particulier les techniques de purification (HPLC), d'analyse (RMN, RP-HPLC), et de synthèse sur support solide en stratégie Fmoc.

IIe.1. Procédures de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen

Procédure n°1

L'alcyne (1.0 équiv.) est mis en solution dans le minimum d'un mélange DMSO/H₂O (9/1). La L-Proline (0.2 équiv.), le carbonate de sodium (0.2 équiv.), le bromure de benzyle (1.0 équiv.), l'ascorbate de sodium (0.2 équiv., solution aqueuse molaire) sont ajoutés successivement. CuSO₄·5H₂O (0.2 équiv., solution aqueuse molaire) et l'azoture de sodium (1.2 équiv.) sont ajoutés au mélange qui devient vert pâle. Le mélange est agité durant 24h à 65°C sous atmosphère d'argon. La solution brune obtenue est versée dans de l'eau glacée, agitée durant 30 minutes puis extraite à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite pour conduire au composé désiré.

Procédure n°2

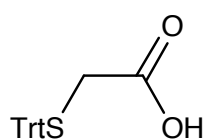
L'alcyne (1.0 équiv.) est mis en solution dans le minimum d'un mélange EtOH/H₂O (7/3). La L-Proline (0.2 équiv.), le carbonate de sodium (0.2 équiv.), le bromure de benzyle (1.0 équiv.), l'ascorbate de sodium (0.2 équiv., solution aqueuse molaire), CuSO₄·5H₂O (0.2 équiv., solution aqueuse molaire) et l'azoture de sodium (1.4 équiv.) sont ajoutés au mélange qui devient vert

pâle. Le mélange est placé sous agitation au micro-onde (300W, 80°C) dans un flacon scellé durant 30 minutes. Le solvant est alors éliminé sous pression réduite et la solution brune obtenue est reprise dans l'acétate d'éthyle puis lavée par une solution saturée de NaCl. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite pour conduire au composé désiré.

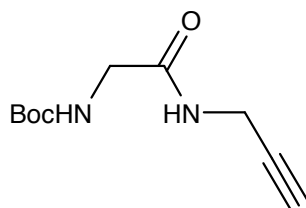
IIe.2. Synthèses des 12 ligands et 2 références :

IIe.2.1. Synthèses des 6 ligands de la série A

Série A1 : ligands 1 - 3

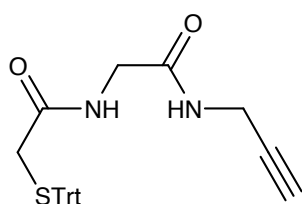


15. Le triphenylméthanol (5.2 g, 20.0 mmol) est dissous dans 60 mL de TFA et l'acide mercaptoacétique (1.39 mL, 20.0 mmol, 1.0 équiv.) est ajouté. Après 3h d'agitation à température ambiante sous atmosphère d'argon, le TFA est éliminé sous pression réduite. Du toluène est chassé à 3 reprises sur le solide orange obtenu conduisant à **15** sous la forme d'un solide blanc (6.12 g, 18.3 mmol, 92%). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ 7.31 (m, 15H, Trt), 3.05 (s, 2H, CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) : δ 176.0 (CO), 143.9 (C, Ph), 129.7 (C, *meta* Trt), 128.2 (C, *ortho* Trt), 127.1 (C, *para* Trt), 67.3 (C, Trt), 34.6 (CH₂).

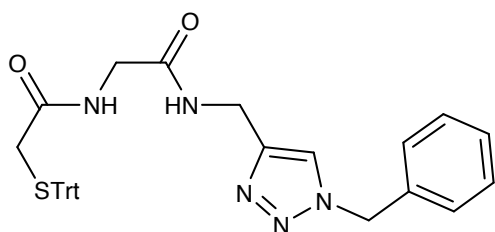


16. La Boc-Glycine (2.63 g, 15.0 mmol) est dissoute dans 20 mL de THF. La propargylamine (960 μL; 15.0 mmol, 1.0 équiv.) est additionnée, suivie de la DIPEA (3.9 mL, 22.5 mmol, 1.5 équiv.) et du DCC (3.71 g, 18.0 mmol, 1.2 équiv.) puis l'ensemble est agité à température ambiante durant une nuit. Après filtration du précipité, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est dissous dans le DCM et lavé par une solution d'acide citrique 10% (3 fois) et par une solution saturée de NaCl. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de sodium anhydre, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Une purification par chromatographie-flash (éluant : hexane/AcOEt 6/4, R_f = 0.37) conduit au composé **16** (2.04 g, 9.62 mmol, 64 %). ¹H NMR

(CDCl_3 , 250 MHz) : δ 6.41 (s, 1H, N-CO), 5.30 (s, 1H, NH-COO), 4.08 (dd, $J = 5.2$, $J' = 2.5$, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}$), 3.82 (d, $J = 5.8$, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$), 2.24 (t, $J = 2.5$, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 1.46 (s, 9H, Boc) ; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz) : δ 169.3 (CO amide), 79.3 (C, Boc), 77.4 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 71.9 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 29.2 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 28.4 (CH_3 , Boc).

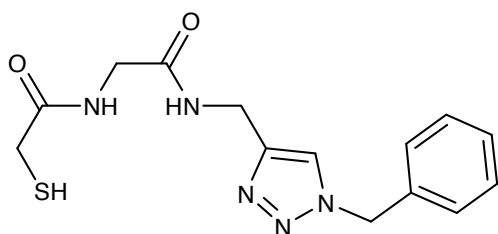


17. Le composé **16** (950 mg, 4.5 mmol) est déprotégé par 30 mL d'un mélange DCM/TFA (2/1) durant 1h30 à 0°C. Après évaporation du solvant, du toluène est chassé à 3 reprises. Le réactif déprotégé est séché sous pression réduite et ajouté à 20 mL de DCM contenant le composé **15** (1.503 g, 4.5 mmol ; 1.0 équiv.), la DIPEA (4.7 mL, 27.0 mmol, 6.0 équiv.) et le DCC (1.114 g, 5.4 mmol, 1.2 équiv.). Le mélange est agité une nuit à température ambiante. Après filtration du précipité, le filtrat est lavé par une solution d'acide citrique 10% à 3 reprises et par une solution saturée de NaCl. Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de sodium anhydre et filtrées. Le solvant est éliminé sous pression réduite et l'huile obtenue est purifiée par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 4/6) pour conduire au composé **17** sous la forme d'un solide brun (0.963 g, 2.25 mmol, 50%). ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 7.27 (m, 15H, Trt), 3.99 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), 3.59 (s, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CO}$), 3.17 (s, 2H, S- $\text{CH}_2\text{-CO}$), 2.15 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$) ; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz) : δ 169.1, 168.0 (2 CO), 143.8 (C, Trt), 129.4, 128.2, 128.0 (CH, Trt), 77.2 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 71.8 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 43.5 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 35.5 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 29.1 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$).



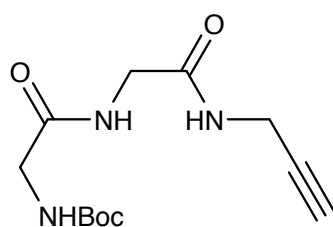
18. Le composé **17** (214 mg, 0.5 mmol) est dissout dans 2.5 mL de DMSO/eau (9/1) et la L-proline (11.5 mg, 0.1 mmol, 0.2 équiv.), le bromure de benzyle (59.4 μL , 0.5 mmol, 1.0 équiv.), le carbonate de sodium (63.6 mg, 0.6 mmol, 1.2 équiv.), l'ascorbate de sodium (50 μL de solution 1M, 0.1 équiv.), $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (25 μL de solution 1M, 0.1 équiv.) et l'azoture de sodium (39.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 équiv.) sont ajoutés suivant la procédure de cycloaddition n°1 pour conduire au composé **18** sous

la forme d'un solide brun (107 mg, 0.19 mmol, 38%). **¹H NMR (d₆-DMSO, 250 MHz)** : δ 8.34 (t, J = 5.5, 1H, NH-CO), 8.17 (t, J' = 5.7, 1H, NH-CO), 7.92 (s, 1H, CH triazole), 7.32 (m, 20H, CH Trt + Ph), 5.54 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.26 (d, J = 5.5, 2H, N-CH₂-CO), 3.58 (d, J = 5.5, 2H, N-CH₂-C=C), 2.83 (s, 2H, S-CH₂-CO) ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 169.01 168.0 (CO, amide), 143.7 (C, triazole), 129.4 – 127.8 (CH Ar, Trt + Ph), 127.0 (CH, triazole), 71.6 (C, Trt), 60.3 (CH₂, Bn), 35.4 (CH₂-C=C), 33.8 (N-CH₂-CO), 29.0 (S-CH₂-CO) ; **ES (positive mode)** : m/z = 562.2 (MH⁺, 54%), 584.2 (MNa⁺, 100%), 600.1 (MK⁺, 21%).



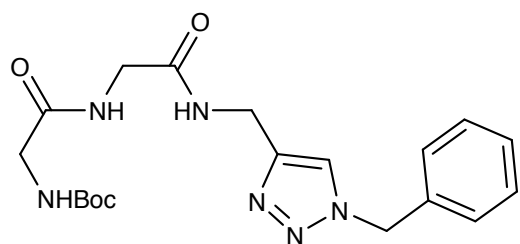
1. Le composé **18** est déprotégé par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) pendant 2h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit est repris dans un mélange eau/ACN (4/1) et purifié par RP-HPLC semi-préparative (t_R = 17.4 min) pour conduire au composé **1** (3.0 mg). **RP-**

HPLC analytique : t_R = 14.6 min (pureté = 99%) ; **¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz)** : δ 7.45 (s, 1H, CH-N=N=N), 7.39 (m, 2H, NH-CO), 7.25 (m, 5H, CH Ar), 5.50 (s, 2H, CH₂Ph), 4.51 (d, J = 5.5 Hz, 2H, CH₂-C=C), 3.95 (d, J = 5.5 Hz, 2H, N-CH₂-CO), 3.27 (d, J = 9.0 Hz, 2H, S-CH₂-CO). ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 168.5, 167.6 (CO), 145.1 (C, triazole), 144.0, 129.1, 128.8, 128.1 (CH Ar), 123.0 (CH triazole), 65.9 (CH₂ Bn), 40.0 (CH₂, Gly). **MALDI/TOF** : m/z = 319.9 (MH⁺, 100%).



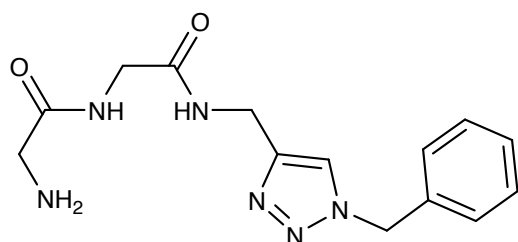
19. Le composé **16** (424.2 mg, 2.0 mmol, 1.0 équiv.) est déprotégé par une solution de TFA/DCM 1/1 (5 mL) durant 1h à température ambiante. Après évaporation sous pression réduite, du toluène est chassé sur le produit pour conduire à une huile rouge. Après dissolution dans le DCM, la solution est neutralisée par ajout de triéthylamine puis le solvant est évaporé pour conduire à une huile jaune qui est utilisée sans purification. Cette huile est reprise dans 20 mL de DMF sec, la Boc-Gly-OH (350 mg, 2.0 mmol, 1.0 équiv.) est ajoutée puis le pH est ajusté à 8 par addition de

DIPEA. La DIPEA (420 μ L, 2.4 mmol, 1.2 équiv.), est ajoutée suivie du DCC (0.454 g, 2.2 mmol, 1.1 équiv.). Le mélange est agité durant 2 jours à température ambiante. Après filtration du précipité, le solvant est éliminé sous pression réduite. Le produit obtenu est dissout dans le DCM est lavé par une solution d'acide citrique 10% à trois reprises, et par une solution saturée de NaCl. Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est précipité dans l'hexane à 0°C et le composé **19** est obtenu par filtration sous la forme d'un solide blanc (390 mg, 1.45 mmol, 73%). **¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz)** : δ 7.15 (s, 1H, NH-CO), 7.07 (s, 1H, NH-CO), 5.44 (s, 1H, NH Boc), 4.04 (m, 4H, CH₂ Gly + CH₂C \equiv C), 3.85 (d, J=5.7, 2H, BocN-CH₂), 2.20 (t, 1H, J = 2.5, C \equiv CH), 1.46 (s, 9H, Boc) ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 170.5 (N-COO), 168.7 (N-CO), 71.5 (C \equiv CH), 43.1 (CH₂ Gly), 29.2 (CH₂-C \equiv C), 28.4 (CH₃ Boc).



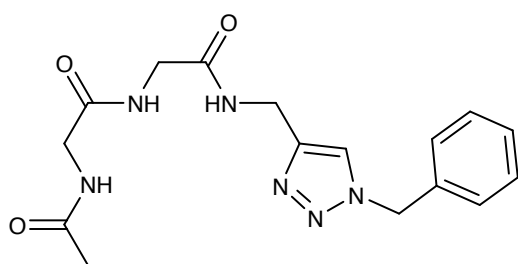
20. Le composé **19** (161.5 mg, 0.6 mmol) est dissous dans 4 mL d'EtOH/eau 7/3 et traité par la L-proline (11.5 mg, 0.1 mmol, 0.2 équiv.), Na₂SO₄ (10.6 mg, 0.1 mmol, 0.2 équiv.), le bromure de benzyle (59.4 μ L, 0.5 mmol, 1.0 équiv.), l'ascorbate de sodium (39.6 mg, 0.2 mmol, 0.2 équiv.), CuSO₄·5H₂O (100 μ L de solution 1M, 0.2 équiv.), et l'azoture de sodium (45.5 mg, 0.7 mmol, 1.4 équiv.) selon la procédure de cycloaddition n°2 pour conduire à **20** sous la forme d'une huile jaune (45.5 mg, 0.39 mmol, 78%). **¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz)** : δ 7.82 (s, 1H, CH triazole), 7.54 (s, 2H, NH-CO), 7.33 (m, 5H, Ph), 5.77 (s, 1H, NH-COO), 5.44 (s, 2H, CH₂ Bn), 4.43 (s, 2H, CH₂-C \equiv C), 3.94 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.78 (d, J = 4.3, 2H, CH₂ Gly), 1.39 (s, 9H, Boc) ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 170.3, 169.2 (CO amide), 134.3 (C, triazole), 129.0 – 128.1 (CH Ar, Bn), 80.0 (C, *t*Bu), 54.2 (CH₂, Bn), 49.1 (N-CH₂-CO), 44.2 (CH₂-C \equiv C), 42.8 (N-CH₂-CO), 28.2 (CH₃, *t*Bu).

2. Le composé **20** est traité par 10 mL d'un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) pendant 2h à



température ambiante puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est dissous dans 5 mL d'un mélange ACN/eau (1/4) et purifié par RP-HPLC semi-préparative ($t_R = 15.0$ min) pour conduire à 9.2 mg de composé **2**. **RP-HPLC**

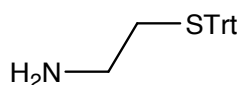
analytique : $t_R = 14.4$ min, pureté = 99% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 7.69 (s, 1H, CH triazole), 7.37 (m, 5H, Ar Bn), 5.50 (s, 2H, CH_2 Bn), 4.40 (s, 2H, CH_2), 3.87 (s, 2H, CH_2 Gly), 3.72 (s, 2H, CH_2 Gly); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz) : δ 182.8 (CO), 155.1 (CH triazole), 128.4, 127.8, 127.4 (Ar CH), 46.6 (CH_2 Gly), 40.3 ($\text{CH}_2\text{-C=C}$) ; **MALDI/TOF** : $m/z = 303.2$ (MH^+ , 100%).



3. Le composé **2** (4.6 mg, 0.015 mmol) est dissous dans 200 μL de DCM sec et traité successivement par la DIPEA (15.6 μL , 0.090 mmol, 6.0 équiv.) et l'anhydride acétique (4.25 μL , 0.045 mmol, 3.0 équiv.). Le mélange est agité durant 2h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous

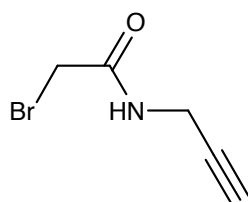
pression réduite, le composé **3** est obtenu sous forme d'un solide blanc (4.8 mg, 13.9 μmol , 93%). **RP-HPLC analytique** : $t_R = 17.3$ min, pureté = 100% ; $^1\text{H NMR}$ (CD_3CN , 250 MHz) : δ 7.67 (s, 2H, 2 NH-CO), 7.25 (m, 5H, Ph), 6.83 (s, 1H, CH triazole), 5.48 (s, 2H, Bn), 4.58 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-C=C}$), 2.02 (s, 3H, CH_3) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz) : δ 168.9 (CO), 154.9 (C, triazole), 131.4, 128.4, 127.4 (CH Ar), 123.9 (CH triazole), 39.2 (CH_2 Gly), 22.4 (CH_3 Ac) ; **ES/MS (mode positif)** : $m/z = 345.3$ (MH^+ , 100%), 367.3 (MNa^+ , 25%) , 383.2 (MK^+ , 7%).

Série A2 : ligands 4 - 6

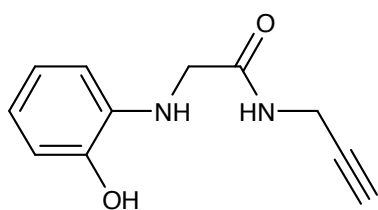


21. Le chlorure de cystéamine (4.99g, 44.0 mmol, 1.1 equiv.) est traité par le triphénylméthanol (10.41 g, 40.0 mmol) dans le TFA (100 mL) à température ambiante durant 2h. Une coloration orange intense se forme.

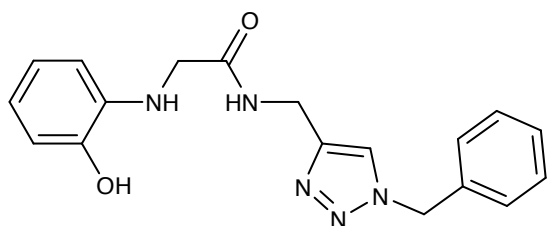
Le TFA est éliminé sous pression réduite et 100 mL d'eau puis 50 mL de DCM sont ajoutés. Une solution saturée de NaHCO₃ est ajoutée jusqu'à pH 7, un précipité blanc se forme. Après filtration, le solide blanc est séché sous pression réduite pour conduire au composé **21** (15.45 g, 34.5 mmol, 86%). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ 7.24 (m, 15H, Trt), 4.24 (s, 3H, NH₃), 2.47 (d, J = 5.5, 2H, CH₂-N), 2.35 (d, J = 5.5, CH₂-S) ; ¹³C NMR (CD₃OD, 62.5 MHz) : δ 145.4 (C, Ar Trt), 130.4 ; 128.9, 127.8 (CH, Ar Trt), 68.0 (C, Trt), 39.4 (CH₂, N-CH₂-CH₂-S), 30.3 (CH₂, N-CH₂-CH₂-S).



22. La propargylamine (320 μL, 5.0 mmol) est dissoute dans 10 mL de DCM sec à 0°C. Le chlorure de césium (3.258 g, 10.0 mmol, 2.0 équiv.) et le bromure de bromoacétyle (436 μL, 5.0 mmol) sont ajoutés et le mélange est agité durant 30 min à 0°C. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite et le composé **22** est isolé quantitativement sans purification. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ 6.70 (s, 1H, NH-CO), 4.09 (dd, J = 2.5, J' = 5.0, 2H, CH₂C≡C), 2.27 (t, J = 2.5, 1H, C≡CH) ; ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) : δ 167.0 (CO), 77.9 (C≡CH), 72.6 (C≡CH), 30.2 (CH₂-C≡C), 27.7 (CH₂-CO).



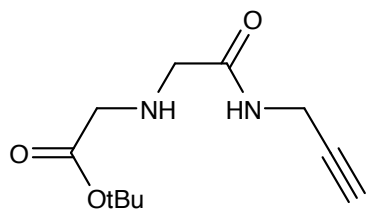
23. Le composé **22** (5.0 mmol) est mis en solution dans 10 mL de DMF et le carbonate de césium (1.629 g, 5.0 mmol, 1.0 équiv.) puis le 2-aminophénol (0.546 g, 5.0 mmol, 1.0 équiv.) sont ajoutés. Le mélange est placé sous agitation à 50°C pendant 7 jours. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit obtenu est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 6/4, R_f = 0.12) pour conduire au composé **23** (0.387 g, 1.9 mmol, 38%) : ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ 8.0 (s, 1H, OH), 7.25 (s, 1H, NH amide), 6.81 (m, 2H, CH arom), 6.68 (m, 1H, CH arom), 6.48 (m, 1H, CH arom), 4.06 (dd, J = 5.5 Hz, J' = 2.5 Hz, 2H, CH₂-C≡C), 3.83 (s, 2H, CH₂CO), 2.18 (t, J = 2.5 Hz, 1H C≡CH) ; ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) : δ 171.6 (CO) ; 143.9 (C_{ar}OH), 136.1 (C_{Ar}NH), 121.0-111.5 (CH arom), 79.0 (C≡CH), 71.6 (C≡CH), 48.8 (C-CO), 36.7 (CH₂-C≡C).



4. Le composé **23** (0.102 g, 0.5 mmol) est mis en solution dans 2 mL de DMSO/eau (9/1). La L-proline (11.5 mg, 0.1 mmol, 0.2 équiv.), Na₂CO₃ (63.6 mg, 0.6 mmol, 1.2 équiv.), le bromure de benzyle (59.4 μL, 0.5 mmol, 1.0 équiv.), l'ascorbate de sodium (100 μL de solution 1M, 0.2

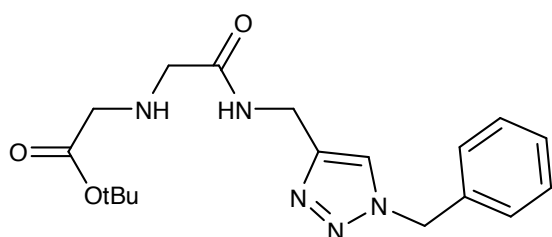
équiv.), CuSO₄·5H₂O (100 μL de solution 1M, 0.2 équiv), et l'azoture de sodium (39.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 équiv.) sont ajoutés successivement et le mélange est agité une nuit à 65°C sous argon selon la procédure de cycloaddition n°1 pour conduire au composé **4** (39 mg, 0.12 mmol, 24%).

RP-HPLC analytique : t_R = 19.4 min, pureté = 93% ; **¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz)** : δ 7.81 (s, 1H amide), 7.46 (s, 1H, CH triazole), 7.28 (m, 5H, Ar Bn), 6.89 (m, 4H, CH Ar), 5.42 (s, 2H, CH₂ Bn), 4.35 (s, 2H, CH₂-C=C), 4.08 (s, 2H, CH₂CO), 2.20 (s, 1H, NH amine); **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 171.8 (CO), 137.9 (CH-C=C, triazole), 136.9 (COH), 136.4 (CNH), 134.4 (C, Ph), 129.2 – 125.9 (CH Bn), 123.3 (CH-C=CH, triazole), 122.5 – 116.3 (CH Phenol), 59.3 (CH₂ Bn), 57.6 (CCO), 32.0 (CH₂-triazole) ; MALDI/TOF : m/z = 338.2 (MH⁺, 100%).

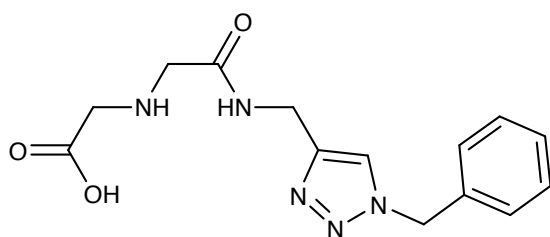


24. Le composé **22** (875 mg, 5.0 mmol) est mis en solution dans 20 mL de DMF et le carbonate de césium (3.258 g, 10.0 mmol, 2.0 équiv.) puis la *tert*-butylglycine (1.006g, 6.0 mmol, 1.2 équiv.) sont ajoutés. L'ensemble est agité durant 3 jours à 50°C. Après filtration, le solvant est éliminé sous pression réduite. Le produit obtenu est repris dans le DCM et lavé par une solution

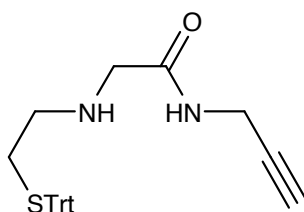
d'acide citrique 10% à 3 reprises puis par une solution saturée de NaCl. Les phases organiques sont regroupées et séchées sur sulfate de sodium anhydre. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans le DCM et purifié par chromatographie flash (éluant hexane/AcOEt 4/6) pour conduire au composé **24** (256 mg, 1.13 mmol, 19%). **¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz)** : δ 3.99 (2H, dd, J = 5.75 Hz, J' = 3.25 Hz, 2H, CH₂-CC), 3.89 (d, J = 5.25 Hz, 2H, CH₂-CON), 3.24 (s, 2H, CH₂COO), 2.17 (t, J = 2.5 Hz, 1H, C≡CH), 1.39 (s, 9H, *t*Bu) ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 171.2 (CO-N), 161.2 (CO-O), 81.8 (C, *t*Bu), 79.6 (C≡CH), 71.3 (C≡CH), 52.1 (C-CON), 51.6 (C-COO), 28.6 (C-C≡C), 28.0 (CH, *t*Bu).



25. Le composé **24** (113 mg, 0.5 mmol) est dissout dans 2 mL de DMSO/eau (9/1). La L-proline (11.5 mg, 0.1 mmol, 0.2 équiv.), Na₂CO₃ (63.6 mg, 0.6 mmol, 1.2 équiv.), le bromure de benzyle (59.4 μL, 0.5 mmol, 1.0 équiv.), l'ascorbate de sodium (100 μL de solution 1M, 0.2 équiv.), CuSO₄·5H₂O (100 μL de solution 1M, 0.2 équiv.) et l'azoture de sodium (39.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 équiv.) sont ajoutés successivement selon la procédure de cycloaddition n°2 pour conduire au composé **25** (113 mg, 0.314 mmol, 63%). **¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz)** : δ 8.11 (s, 1H, NH-CO), 7.44 (s, 1H, CH triazole), 7.35 (m, 5H, Ph), 5.49 (s, 2H, CH₂Ph), 4.52 (d, J = 5.8, 2H, CH₂-C≡C), 3.29 (s, 2H, CH₂), 2.93 (s, 2H, CH₂-CO₂tBu), 2.02 (s, 1H, NH amine), 1.48 (s, 9H, tBu) ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 166.2, 164.8 (CO), 132.0 – 126.5 (CH Ar, Bn), 122.3 (CH, triazole), 80.2 (C, tBu), 61.7 (CH₂, Bn), 36.1 (CH₂-C=C), 28.2 (CH₃, tBu).

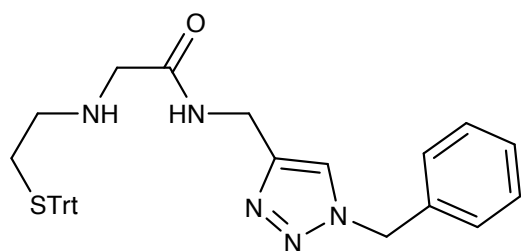


5. Le composé **25** est déprotégé par une solution de TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) à température ambiante durant 2h. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le solide obtenu est dissout dans un mélange eau/ACN (4/1) et purifié par RP-HPLC semi-préparative (t_R = 14.6 min) pour conduire au composé **5** (7.1 mg). **RP-HPLC analytique** : t_R = 14.3 min (pureté = 97%) ; **¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz)** : δ 7.35 (m, 5H, Ph), 5.48 (s, 2H, CH₂Ph), 4.47 (s, 2H, CH₂-C=C), 4.25 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.81 (s, 2H, CH₂COO) ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 163.4, 162.0 (2 CO), 129.5, 128.4, 127.3 (CH Ar), 121.5 (CH triazole), 53.2 (CH₂Ph), 51.8 (CH₂-CO-N), 48.9 (CH₂-CO₂H), 42.0 (CH₂-C=C) ; **MALDI/TOF** : m/z = 304.1 (MH⁺, 100%).

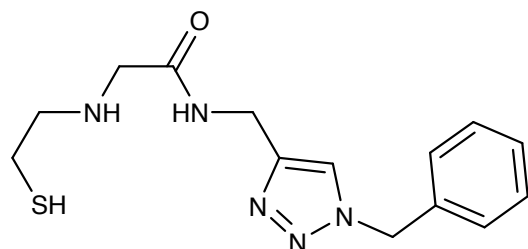


26. Le composé **22** (5.0 mmol, 1.0 equiv.) est mis en solution dans 20 mL de DMF et traité par NaCO₃ (1.06 g, 10.0 mmol, 2.0 équiv.). Après agitation durant 10 min à température ambiante, le composé **21** (2.58

g, 6.0 mmol, 1.2 équiv.) est ajouté. L'ensemble est agité durant 24h à température ambiante puis le milieu réactionnel est filtré et le DMF est évaporé sous pression réduite pour conduire à une huile incolore. Après purification par chromatographie flash, le composé **26** (0.986 g, 2.38 mmol, 48%) est obtenu. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 7.60 (s, 1H, NH-CO), 7.23 (m, 15H, Trt), 3.99 (dd, $J = 5.5$, $J' = 2.5$, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), 3.10 (s, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CO}$), 2.42 (m, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 2.36 (m, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 2.11 (t, $J = 2.5$, 1H, $\text{C}\equiv\text{C-H}$), 1.79 (s, 1H, NH-Trt) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz) : δ 170.7 (CO), 144.7 (C, Trt), 126.8-129.6 (CH, Trt), 79.4 (C, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 71.5 (CH, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 66.9 (C, Trt), 51.4 (N- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), 48.3 (S- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 32.0 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), 28.8 (S- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$).



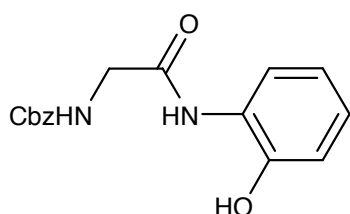
27. Le composé **26** (248.7 mg, 0.6 mmol, 1.2 équiv.) est dissout dans 2.5 mL d'un mélange EtOH/eau (7/3). La L-proline (11.5 mg, 0.1 mmol, 0.2 équiv.), Na_2CO_3 (10.6 mg, 0.1 mmol, 0.2 équiv.), le bromure de benzyle (59.4 μL , 0.5 mmol, 1.0 équiv.), l'ascorbate de sodium (39.6 mg, 0.2 mmol, 0.2 équiv.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (100 μL de solution 1M, 0.2 équiv.) et l'azoture de sodium (45.5 mg, 0.7 mmol, 1.4 équiv.) sont introduits successivement selon la procédure de cycloaddition n°2. L'huile brune obtenue est précipitée dans l'hexane à 0°C pour conduire au composé **27** sous la forme d'un solide brun (176 mg, 0.32 mmol, 54%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 7.81 (s, 1H, CH triazole), 7.35 (m, 15H, Trt), 5.37 (s, 2H, Ar Bn), 4.46 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}=\text{C}$), 3.40 (s, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CO}$), 2.93 (s, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 2.47 (s, 2H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$); **MALDI/TOF** : $m/z = 548.2$ (MH^+ , 100%)



6. Le composé **27** est déprotégé par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) durant 2h à température ambiante. Après élimination du solvant sous pression réduite, le solide est repris dans un mélange eau/ACN (4/1) et purifié par RP-HPLC semi-préparative ($t_R = 15.7$ min) pour conduire au composé **6** (7.7 mg). **RP-HPLC analytique** : $t_R = 14.1$ min (pureté = 97 %) ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 ,

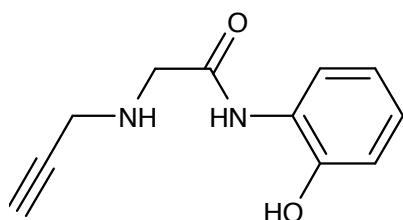
250 MHz) : δ $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , **250 MHz**) : δ 7.46 (s, 1H, CH-N-N=N), 7.34 (m, 4H, Ph), 5.44 (s, 2H, CH_2Ph), 4.42 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C=C}$), 3.84 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO-N}$), 3.24 (m, 2H, CH_2 , N- $\underline{\text{CH}_2}$ - $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.87 (m, 2H, CH_2 , N- $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2\text{-S}}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , **62.5 MHz**) : δ 168.6 (CO amide), 137.3 (C, Triazole), 134.4 (C, Ar), 129.0 – 127.6 (CH Ar, Bn), 122.1 (CH, triazole), 59.1 (CH_2 , Bn), 57.9 (N- $\underline{\text{CH}_2\text{-CO}}$), 56.1 (S- $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2\text{-N}}$), 40.5 ($\underline{\text{CH}_2\text{-C=C}}$), 34.4 (S- $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}}$); **MALDI/TOF** : $m/z = 306.2$ (MH^+ , 100%).

IIe.2.2. Synthèses des ligands de la série B1



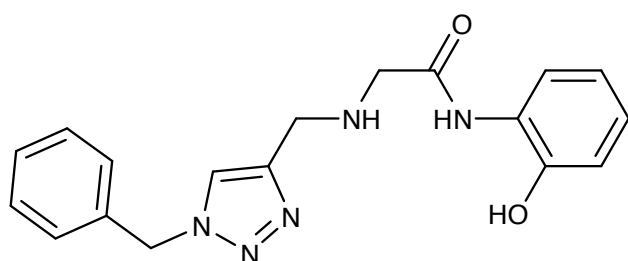
28. La Cbz-Glycine (4.18 g, 20.0 mmol) est mise en solution dans 60 mL de THF anhydre. Le 2-aminophenol (2.18 g, 20.0 mmol, 1.0 équiv.), et le DCC (5.54 g, 22.0 mmol, 1.1 équiv.) sont ajoutés et le mélange est ajouté à température ambiante durant 6h. Après filtration du précipité, le solvant est évaporé sous pression réduite.

Le résidu obtenu est précipité dans un mélange AcOEt /huile de pétrole 2/1 (200 mL) pour conduire au composé **28** sous la forme d'un solide blanc (5.15 g, 17.1 mmol, 86%). $^1\text{H NMR}$ ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, **250 MHz**) : δ 7.87 (s, 1H, amide), 7.35 (m, 5H, Ar Cbz), 7.22 (s, 1H, carbamate), 6.90 (m, 2H, CH Ar), 6.79 (m, 1H, CH Ar), 5.05 (s, 2H, CH_2 Cbz), 3.83 (s, 2H, CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , **62.5 MHz**) : δ 170.1 (CO amide), 148.9 (CO carbamate), 127.3 – 119.9 (CH Ar, Cbz, Ar), 56.5 (CH_2 , Cbz), 43.6 (CH_2 , Gly).



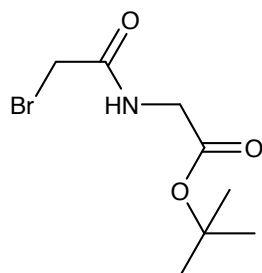
29. Le composé **28** (0.9 g, 3.0 mmol) est dissous partiellement dans 35 mL de méthanol. Du Pd/C 10% (135 mg, 15% w/w) est ajouté et le mélange est agité vigoureusement sous atmosphère d'hydrogène (4 bar) durant 1.5 h jusqu'à dissolution complète du composé **28**. Après filtration sur célite, le solvant est évaporé sous pression réduite pour conduire à un solide jaune pale (447 mg, 2.68 mmol, 89%). Dissout dans 15 mL de DMF, ce

solide est traité par le bromure de propargyle (0.289 mL, 2.68 mmol, 1.0 équiv.) durant 2 jours à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le composé obtenu est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 7/3, R_f = 0.32) pour conduire au composé **29** (0.132 g, 0.65 mmol, 24%). **¹H NMR (d₆-DMSO, 250 MHz)** : δ 9.22 (s, 1H, NH amide), 7.0 (m, 4H, CH Ar), 3.55 (d, J = 2.5, 2H, CH₂), 3.43 (s, 2H, CH₂), 2.32 (t, J = 2.3, 1H, alcyne) ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 171.6 (CO), 148.3 (C-OH, Ar), 126.7 – 118.8 (CH Ar), 80.5 (CH₂-C≡C), 72.6 (CH₂-C≡C), 50.9 (N-CH₂-CO), 38.3 (CH₂-C≡C)



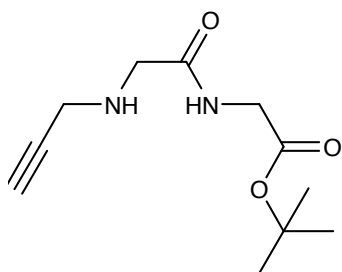
7. Le composé **29** (113 mg, 0.55 mmol) est mis en solution dans 1 mL d'un mélange DMSO/eau (9/1). La L-proline (12.6 mg, 0.11 mmol, 0.2 équiv.), Na₂CO₃ (70.1 mg, 0.66 mmol, 1.2 équiv.), le bromure de benzyle (65.4 μL, 0.55 mmol, 1.0 équiv.),

l'ascorbate de sodium (110 μL de solution aqueuse molaire, 0.2 équiv.), CuSO₄·5H₂O (110 μL de solution aqueuse molaire, 0.2 équiv.) et l'azoture de sodium (42.9 mg, 0.66 mmol, 1.2 équiv.) sont ajoutés successivement selon la procédure de cycloaddition n°1 pour conduire au composé **7** sous la forme d'un solide blanc. Ce solide est dissout dans 5 mL de mélange eau/ACN (4/1) et purifié par RP-HPLC semi-préparative (t_R = 21.7 min, 3.6 mg). **RP-HPLC analytique** : t_R = 19.8, pureté = 93% ; **¹H NMR (d₆-DMSO, 250 MHz)** : δ 8.11 (s, 1H, CH triazole), 7.25 (m, 5H, Ph), 7.18 (m, 4H, CH Ar), 5.53 (s, 2H, CH₂-Ph), 3.78 (s, 2H, CH₂), 3.18 (s, 2H, CH₂) ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 170.2 (CO amide), 147.9 (C-OH, Ar), 137.0 (C=C-CH₂), 134.2 – 127.8 (CH Ar), 125.6 (C=C-CH₂), 59.1 (CH₂, Bn), 49.1 (CH₂-CO), 45.6 (C=C-CH₂) ; MALDI/TOF : m/z = 338.2 (MH⁺, 100%).

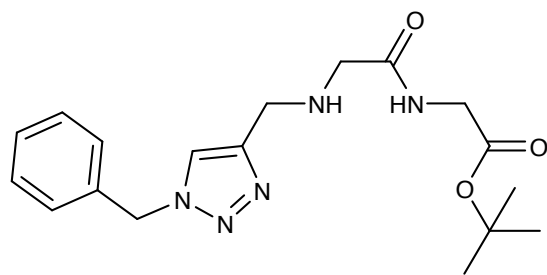


30. L'hydrochlorure de *tert*-butyl glycine (0.546 g, 5.0 mmol) est traité par la DIPEA (1.39 mL, 10.0 mmol, 2.0 équiv.) dans 10 mL de DCM durant 20 min à température ambiante. Le solvant est éliminé sous pression réduite et le résidu est dissout dans le DCM sec. Le carbonate

de césium (3.2 g, 10.0 mmol, 2.0 équiv.) puis le bromure de bromoacétyle (426 μL , 5.0 mmol, 1.0 équiv.) sont ajoutés successivement et le mélange est agité à 0°C pendant 30 min. Après filtration, le solvant est éliminé sous pression réduite pour conduire quantitativement au composé **30** sous la forme d'un solide blanc utilisé directement. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 7.00 (s, 1H, NH amide), 3.93 (d, $J = 5.0$, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.89 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Br}$), 1.45 (s, 9H, ^tBu) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz) : δ 170.1, 168.9 (CO), 82.6 (C, ^tBu), 41.5 ($\text{CH}_2\text{-COO}$), 30.6 (CH_2Br), 28.1 (CH_3 , ^tBu).

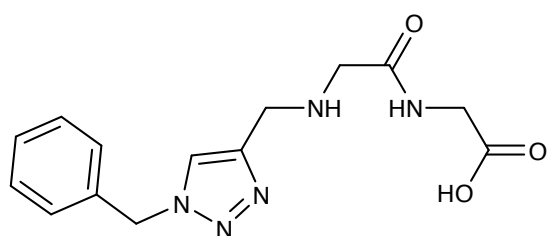


31. Le composé **30** (5.0 mmol, 1.0 équiv) est mis en solution dans 10 mL de DMF. Le carbonate de césium (3.2 g, 10.0 mmol, 2.0 équiv.) et la propargylamine (386 μL , 6.0 mmol, 1.2 équiv.) sont ajoutés successivement et le mélange est agité pendant 5 jours à 50°C. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit obtenu est repris dans le DCM puis lavé trois fois par une solution d'acide citrique 10% et par une solution saturée de NaCl. Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de sodium anhydre, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 3/7) pour donner le composé **31** (434 mg, 1.92 mmol, 38%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 7.49 (s, 1H, NH amide), 3.97 (d, $J = 5.5$, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}_2^t\text{Bu}$), 3.46 (d, $J' = 2.5$, 2H, $\text{CH}_2\text{-CC}$), 3.33 (s, 2H, CH_2 Gly), 2.24 (t, $J' = 2.5$, 1H, alcyne), 1.82 (s, 1H, NH amine). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz) : δ 165.8, 164.3 (CO), 84.6 (C ^tBu), 79.5 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 78.0 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 39.0 (CH_2 Gly), 29.9 (CH_3 ^tBu); ES/positive mode : $m/z = 360.3$ (MH^+ , 100%).



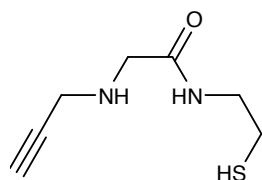
32. Le composé **31** (135.7 mg, 0.36 mmol, 1.2 équiv.) est mis en solution dans 1.5 mL d'un mélange éthanol/eau (7/3). La L-proline (6.9 mg, 0.06 mmol, 0.2 équiv.), Na_2CO_3 (6.36 mg, 0.06 mmol, 0.2 équiv.), le bromure de benzyle (35.6 μL , 0.3 mmol), l'ascorbate de sodium (23.7 mg,

0.12 mmol, 0.2 équiv.), CuSO₄·5H₂O (60 μL d'une solution aqueuse molaire, 0.2 équiv.) et l'azoture de sodium (28.1 mg, 0.45 mmol, 1.5 équiv.) sont ajoutés successivement selon la procédure de cycloaddition n°2 pour conduire au composé **32** (57 mg, 0.169 mmol, 50%). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ 7.46 (s, 1H, CH triazole), 7.40 (s, 1H, NH, amide), 7.35 (m, 5H, Ar Bn), 5.53 (s, 2H, CH₂ Bn), 3.96 (d, J = 5.5, 2H, CH₂CON), 3.92 (s, 2H, CH₂COO), 1.48 (s, 9H, ^tBu); ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) : δ 129.6, 129.2, 128.9 (CH Ar), 57.4 (CH₂ Bn), 54.3 (CH₂CON), 49.8 (CH₂-CC), 41.5 (CH₂COO), 28.5 (^tBu); ES/mode positif : m/z = 360.3 (MH⁺, 100%).



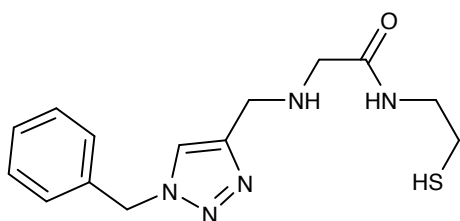
8. Le composé **32** est déprotégé par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) à température ambiante pendant 2h puis le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit obtenu est séché. Le solide obtenu est dissous dans 5 mL d'un mélange eau/ACN (4/1) et purifié par RP-

HPLC semi-préparative (t_R = 17.3 min) pour mener au composé **8** (7.6 mg). RP-HPLC analytique : t_R = 15.7 min, pureté = 98% ; ¹H NMR (CD₃OD, 62.5 MHz) : δ 8.07 (s, 1H, CH-N=N=N), 7.37 (m, 5H, Ar, Ph), 4.26 (s, 2H, N-CH₂-CO-O), 3.87 (s, 2H, CH₂-C=C), 3.74 (s, N-CH₂-CO-N), 2.16 (s, 1H, NH amine); ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) : δ 171.0 (CO, acide), 169.0 (CO, amide), 144.6 (C=C-CH₂), 137.4 – 127.4 (CH Ar, Bn), 122.8 (C=C-CH₂), 58.7 (CH₂, Bn), 54.1 (CH₂-CO-N), 49.2 (C=C-CH₂), 41.3 (CH₂-COOH) ; (ES/mode positif : m/z = 304.2 (MH⁺, 100%).



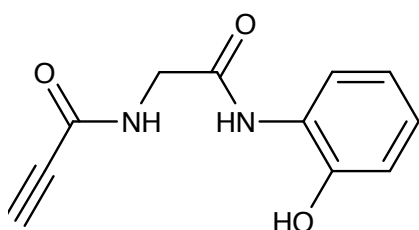
35. La résine 4-méthoxytrityl cystéamine (0.7 mmol.g⁻¹, 1.0 g, 0.7 mmol) est conditionnée dans le DCM (3 x 1 min) puis le DMF (3 x 1 min). Une solution de Fmoc-Gly-OH (2.08 g, 7.0 mmol, 1.0 équiv.) dans 15 mL de DMF puis de la DIPEA (1.2 mL, 7.0 mmol, 10.0 équiv.) sont ajoutés et le mélange est agité durant 10 min. Le DCC (1.45 g, 7.0 mmol, 10 équiv.) est ajouté et le mélange est agité durant une nuit à température ambiante. Le test Kaiser

est alors négatif. Les réactifs sont éliminés par filtration et la résine est lavée successivement par le DMF (3 x 1 min), le DCM (3 x 1 min), et le méthanol (3 x 1 min). La résine est ensuite conditionnée dans le DCM (3 x 1 min) puis le DMF (3 x 1 min) et traitée par un mélange pipéridine/DMF (1/4) (3 x 5 min) puis lavée successivement par le DMF (3 x 1 min), le DCM (3 x 1 min) et à nouveau le DMF (3 x 1 min). Le test Kaiser est alors positif. La résine est traitée par le chlorure de propargyle (774 μ L de solution à 70% dans le toluène, 7.0 mmol, 10.0 équiv.) et la DIPEA (1.2 mL, 10.0 équiv.) dans 10 mL de DMF à température ambiante durant une nuit. Le test Kaiser est alors négatif. Après lavage par le DMF (3 x 1 min) et le DCM (3 x 1 min), le composé est décroché de la résine par une solution de TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) durant 2 x 1h. Les filtrats sont réunis et le solvant est évaporé sous pression réduite pour mener au composé **35**. **$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 62.5 MHz) :** δ 4.11 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$), 4.02 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 3.47 (m, 1H, SH), 3.02 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.92 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$); **$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz) :** δ 164.4 (CO), 78.1 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 72.2 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 56.2 (CH_2CO), 37.6 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), 32.4 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 29.7 ($\text{CH}_2\text{-S}$); **MALDI/TOF :** $m/z = 414.2$ (MH^+ , 100%).

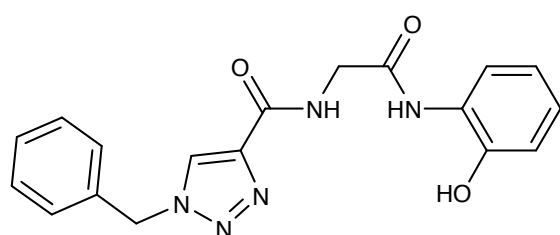


9. Le composé **35** (103 mg, 0.6 mmol, 1.2 équiv.) est mis en solution dans 2.5 mL d'un mélange EtOH/eau (7/3). La L-proline (11.5 mg, 0.1 mmol, 0.2 équiv.), Na_2CO_3 (39.6 mg, 0.2 mmol, 0.2 équiv.), le bromure de benzyle (59.4 μ L, 0.5 mmol, 1.0 équiv.), l'ascorbate de sodium (39.6 mg, 0.2 mmol, 0.2 équiv.), $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (100 μ L d'une solution aqueuse molaire, 0.2 équiv.) et l'azoture de sodium (45.5 mg, 0.7 mmol, 1.4 équiv.) sont ajoutés successivement selon la procédure de cycloaddition n°2 pour conduire à une huile brune (36 mg) qui est purifiée par RP-HPLC semi-préparative ($t_R = 21.2$ min) pour mener au composé **9** (5.2 mg). **RP-HPLC analytique :** $t_R = 19.0$ min, pureté = 94%; **$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 62.5 MHz) :** δ 7.89 (s, 1H, CH-N-N=N), 7.34 (m, 5H, Ar Ph), 5.55 (s, 2H, CH_2Ph), 4.49 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), 3.87 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CO}$), 3.42 (t, $J = 6.75$ Hz, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 3.09 (t, $J = 6.75$ Hz, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$); **MALDI/TOF :** $m/z = 306.4$ (MH^+ , 100%).

IIe.2.3. Synthèses des ligands de la série B2

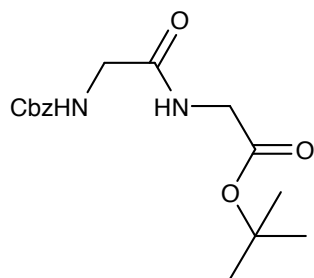


36. Le composé **28** (1.50 g, 5.0 mmol) est mis en solution dans 50 mL de méthanol et le Pd/C 10% (225.0 mg, 15% w/w) est ajouté. Le mélange est agité pendant 2h sous atmosphère d'hydrogène (4 bar). Après filtration sur célite, le solvant est évaporé sous pression réduite et le composé obtenu (833 mg, 5.0 mmol, quant.) est dissout dans 20 mL de DCM. L'anhydride symétrique est préalablement préparé par agitation durant 10 min à 0°C d'un mélange d'acide propiolique (307.5 μ L, 5.0 mmol, 1.0 équiv), et de DCC (1.134 mg, 5.5 mmol, 1.1 équiv.) dans 25 mL de DCM). L'anhydride symétrique ainsi formé est ajouté au composé **36** déprotégé et agité durant 1h à 0°C puis une nuit à température ambiante. Après filtration de la DCU, le solvant est éliminé sous pression réduite et le composé obtenu est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 3/7) pour mener au composé **27** (78.5 mg, 0.36 mmol, 7%). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ 7.44 (d, J = 7.5, 1H, amide), 7.25 (s, 1H, amide), 7.07 – 6.80 (m, 4H, CH Ar), 4.19 (s, 2H, CH₂), 2.90 (s, 1H, CH alcyne).

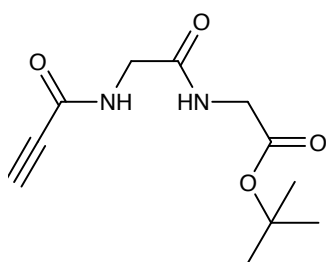


10. Le composé **27** (78.5 mg, 0.36 mmol, 1.2 équiv.) est mis en solution dans 1.5 mL de mélange EtOH/eau (7/3). La L-proline (6.9 mg, 0.06 mmol, 0.2 équiv.), Na₂CO₃ (6.36 mg, 0.06 mmol, 0.2 équiv.), le bromure de benzyle (35.6 μ L, 0.3 mmol, 1 équiv.), l'ascorbate de sodium (23.7 mg, 0.06 mmol, 0.2 équiv), CuSO₄·5H₂O (60 μ L de solution aqueuse molaire, 0.2 équiv.) et l'azoture de sodium (28.1 mg, 0.45 mmol, 1.5 équiv.) sont ajoutés successivement selon la procédure de cycloaddition n°2 pour conduire au composé **10** (73 mg, 0.21 mmol) qui est dissout dans 5 mL d'un mélange ACN/eau (4/1). La solution est purifiée par RP-HPLC semi-préparative (t_R = 22.5 min) pour mener au composé **16** (7.6 mg). **RP-HPLC analytique** : t_R = 18.1 min,

pureté = 96%); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 8.92 (s, 1H, NH amide), 8.20 (s, 1H, NH amide), 7.99 (s, 1H, CH triazole), 7.40 – 6.60 (m, 9H, Bn, Ar), 5.49 (s, 2H, CH_2 Bn), 4.30 (s, 2H, CH_2); **MALDI/TOF** : $m/z = 352.2$ (MH^+ , 100%).

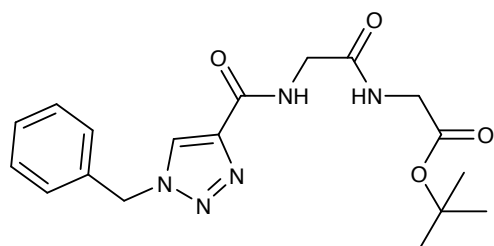


37. la Cbz-Gly-OH (2.09 g, 10.0 mmol) est mise en solution dans 20 mL de THF sec puis l'hydrochlorure de *tert*-butyl glycine (1.67 g, 10.0 mmol, 1.0 équiv.) et le DCC (2.27 g, 11.0 mmol, 1.1 équiv.) sont successivement ajoutés. Le mélange est agité durant 5h à température ambiante sous atmosphère d'argon. Après filtration de la DCU, le solvant est évaporé sous pression réduite et l'huile incolore obtenue est purifiée par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 5/5, $R_f = 0.32$) pour mener au composé **37** (1.48 g, 4.6 mmol, 46%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 7.44 (s, 1H, NH amide), 7.34 (m, 5H, Ph), 6.52 (s, 1H, NH carbamate), 5.12 (s, 2H, CH_2 -Ph), 3.92 (m, 4H, 2 CH_2 -CO), 1.47 (s, 9H, tBu) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz) : δ 169.7, 168.6 (CO amide), 156.5 (CO carbamate), 135.9 (C Ph), 127.9 – 127.5 (CH Ar), 81.4 (C tBu), 66.3 (CH_2 Bn), 43.7 (CH_2CON), 41.3 (CH_2COO), 27.4 (CH_3 , tBu).



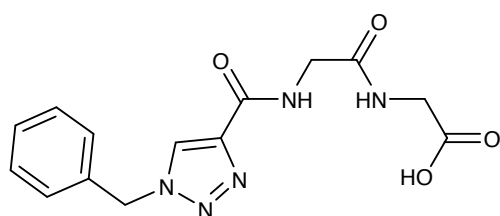
38. Le composé **37** (1.135 g, 3.0 mmol) est mis en solution dans 20 mL de méthanol et le Pd/C 10% (170 mg, 15% w/w) est ajouté. Le mélange est agité durant 1h30 sous atmosphère d'hydrogène (4 bar). Après filtration sur célite, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est dissout dans 10 mL de DCM. L'anhydride symétrique de l'acide propiolique est préalablement préparé par action du DCC (0.742 g, 3.6 mmol, 1.2 équiv.) sur l'acide propiolique (221.4 μL , 3.0 mmol, 1.0 équiv.) dans 15 mL de DCM. L'anhydride symétrique est ajouté au composé **38** déprotégé et le mélange est agité durant une nuit à température ambiante. Après filtration du précipité, le solvant est éliminé par pression réduite et le produit obtenu est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 3/7) pour mener au composé **38** (84 mg, 0.35 mmol, 12 %). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 4.03 (s, 2H, CH_2), 3.93 (d, $J = 5$, 2H,

CH₂), 1.45 (s, 9H, *t*Bu) ; ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) : δ 168.8, 168.5 (CO, amide + ester), 152.7 (C=C-CO), 82.5 (C≡CH), 74.8 (C≡CH), 42.8 (CH₂-CO-N), 42.0 (CH₂-CO-O), 24.7 (CH₃, *t*Bu).



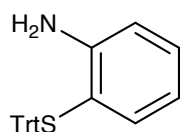
39. Le composé **38** (60.0 mg, 0.25 mmol) est mis en solution dans 1.5 mL d'un mélange DMSO/eau (9/1). La L-proline (5.7 mg, 0.05 mmol, 0.2 équiv.), Na₂CO₃ (31.8 mg, 0.3 mmol, 1.2 équiv.), le bromure de benzyle (29.7 μL, 0.25 mmol, 1.0 équiv.), l'ascorbate de sodium (50 μL de solution aqueuse molaire, 0.2

équiv.), CuSO₄·5H₂O (50 μL de solution aqueuse molaire, 0.2 équiv.) et l'azoture de sodium (19.5 mg, 0.3 mmol, 1.2 équiv.) sont ajoutés successivement selon la procédure de cycloaddition n°1 pour mener au composé **39** (52 mg, 0.14 mmol, 56%). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ 7.95 (s, 1H, CH-N=N=N), 7.32 (m, 5H, Ar Ph), 5.54 (s, 2H, CH₂Ph), 4.33 (s, 2H, CH₂-CO-O), 3.78 (s, 2H, CH₂-CO-N), 1.24 (s, 9H, *t*Bu) ; ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) : δ 168.9, 168.8 (CO, amide + ester), 160.8 (C=C-CO), 142.9 (C=C-CO), 133.8 (C=C-CO), 129.4 – 125.8 (CH Ar, Bn), 82.6 (C, *t*Bu), 54.7 (CH₂, Bn), 43.0 (CH₂-CO-N), 42.1 (CH₂-CO-O), 28.1 (CH₃, *t*Bu)

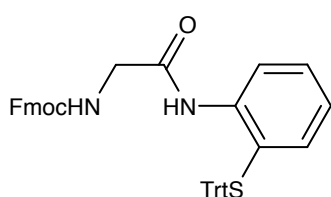


11. Le composé **39** est déprotégé par 10 mL d'un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) pendant 2h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit obtenu est repris dans 5 mL d'un mélange eau/ACN (4/1) puis purifié par RP-

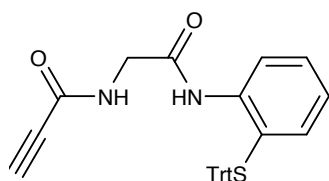
HPLC analytique (*t*_R = 21.7 min) pour mener au composé **11** (5.1 mg). **RP-HPLC analytique** : *t*_R = 19.1 min, pureté = 100% ; ¹H NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) : δ 7.72 (s, 1H, CH-N=N=N), 7.35 (m, 5H, Ar Ph), 5.59 (s, 2H, CH₂Ph), 4.18 (s, 2H, CH₂-CO-O), 3.62 (s, 2H, N-CH₂-CO-N) ; ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) : δ 167.1, 166.0 (CO, amide + ester), 141.3 (C=C-CO), 128.7 (C=C-CO), 128.7 – 128.1 (CH, Bn), 54.6 (CH₂, Bn), 33.7 (CH₂-CO-N), 31.8 (CH₂-CO-O). **MALDI/TOF** : *m/z* = 318.3 (MH⁺, 100%).



40. Le 2-aminothiophenol (3.756 g, 30.0 mmol) est mis en solution dans 2.5 mL de DCM et traité par le triphénylméthanol (7.8 g, 30.0 mmol, 1.0 équiv.) dans 25 mL de TFA durant 2h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et l'huile obtenue est versée dans 200 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. Le produit est extrait au DCM à 3 reprises et les phases organiques sont réunies et lavées par une solution saturée de NaCl puis séchées sur sulfate de sodium anhydre. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le composé **40** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (9.64 g, 26.25 mmol, 88%). **¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) :** δ 7.25 – 7.35 (m, 15H, Trt), 7.04 (m, 2H, *meta* CH Ph), 6.55 (m, 1H, *ortho* CH Ph), 7.45 (m, 1H, *para* CH Ph), 3.85 (s, 2H, NH₂ amine) ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) :** δ 150.1 (C-N, Ph), 144.4, 130.0, 127.8, 126.9 (Trt), 118.9 (C-S, Ph), 117.2, 116.0 (CH, Ph), 71.0 (C, Trt).

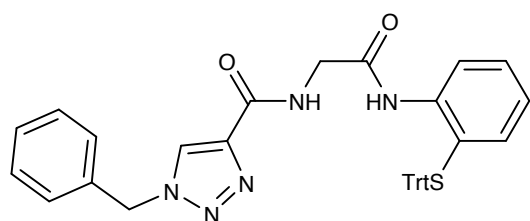


41. La Fmoc-Gly-OH (1.485 g, 5.0 mmol, 1.0 équiv.) est dissoute dans 20 mL de THF anhydre. Le composé **40** (1.83 g, 5.0 mmol, 1.0 équiv.) puis le DCC (1.135 g, 5.5 mmol, 1.1 équiv) sont ajoutés successivement et le mélange est agité durant une nuit à température ambiante. Après filtration de la DCU, le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est reprise dans le DCM et purifiée par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 7/3). Une huile incolore est alors obtenue qui précipite dans l'hexane à 0°C pour mener au composé **41** (2.334 g, 3.61 mmol, 72%) sous forme d'un solide brun. **¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) :** δ 7.75 (m, 2H, Fmoc), 7.59 (m, 2H, Fmoc), 7.40 (m, 2H, Fmoc), 7.27 (m, 18H, Trt + 3 CH Ar), 6.83 (m, CH Ar), 4.39 (d, J = 2.5, 2H, CH₂ Fmoc), 4.10 (t, J = 2.5, 1H, Fmoc), 3.62 (d, J = 5.0, 2H, CH₂) ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) :** δ 143.5 (C, Fmoc), 141.3 (C-N, Ph), 137.6 (C, Fmoc), 129.6 (CH *meta* Trt), 127.8 (CH, *ortho* Trt), 125.0 (CH, Ph), 123.7 (CH, Ph), 120.0 (CH, *para* Trt), 61.2 (CH₂, Fmoc), 44.9 (CH₂, Gly).



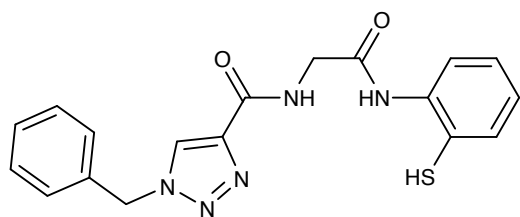
42. Le composé **41** (1.62 mg, 2.5 mmol) est déprotégé par 20 mL d'un mélange pipéridine/DMF (1/4). Après évaporation du solvant sous pression réduite, le produit brut obtenu est repris dans 10 mL

de DCM sec. L'anhydride symétrique de l'acide propiolique est préparé par la réaction de l'acide propiolique (184.5 μ L, 2.5 mmol, 1.0 équiv.) sur le DCC (257.9 mg, 1.25 mmol, 0.5 équiv.) dans 10 mL de DCM sec puis ajouté au composé 61 déprotégé. Le mélange est agité durant 10 minutes à 0°C puis une nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant, le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 3/7) pour mener au composé **42** (0.337 g, 0.71 mmol, 28%). **¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz)** : δ 8.21 (s, 1H, NH amide), 8.09 (s, 1H, NH amide), 7.25 (m, 15H, Trt), 3.68 (d, J = 5.0, 2H, CH₂), 2.84 (s, 1H, alcyne) ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 169.3 (CO, amide), 147.2 (HC=C-CO), 131.7 – 123.1 (CH, Ar), 88.1 (HC=C), 76.2 (HC=C), 62.3 (C, Trt), 47.1 (CH₂-CO-N).



43. Le composé **42** (0.238 g, 0.5 mmol, 1.0 équiv.) est mis en solution dans 2 mL d'un mélange DMSO/eau (9/1). La L-proline (11.5 mg, 0.1 mmol, 0.2 équiv.), Na₂CO₃ (63.6 mg, 0.6 mmol, 1.2 équiv.), le bromure de benzyle (59.4 μ L, 0.5 mmol, 1.0 équiv.), l'ascorbate de sodium (100 μ L

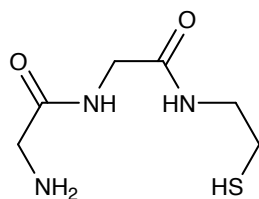
de solution aqueuse molaire, 0.2 équiv.), CuSO₄·5H₂O (100 μ L d'une solution aqueuse molaire, 0.2 équiv.) et l'azoture de sodium (39.0 mg, 0.6 mmol, 1.2 équiv.) sont ajoutés successivement selon la procédure de cycloaddition n°1 pour mener au composé **43** (69 mg, 0.11 mmol, 22%). **¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz)** : δ 8.48 (s, 1H, NH amide), 8.32 (d, J = 8.2, 1H, NH amide), 8.10 (s, 1H, CH triazole), 7.30 (m, 22H, Trt + 2 CH Ar + Ph), 6.82 (t, J = 7.4, 2H, CH Ar), 5.55 (s, 2H, CH₂-Ph), 3.91 (d, J = 8.2, 2H, CH₂ Gly) ; **¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 164.9 (CO, amide), 152.0 (C=C-CO), 143.4 (C Arom, Trt), 141.4 (C=C-CO), 137.6 (C=C-CO), 129.6 – 119.4 (CH, Ar), 59.0 (C, Trt), 53.5 (CH₂, Bn), 43.3 (CH₂-CO-N).



12. Le composé **43** est déprotégé par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) durant 2h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le composé brut obtenu est repris

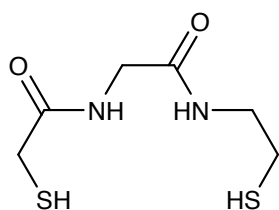
dans 5 mL d'un mélange eau/ACN (4/1) et purifié par RP-HPLC semi-préparative ($t_R = 23.9$ min) pour conduire au composé **12** (4.7 mg). **RP-HPLC analytique** : $t_R = 23.0$ min, pureté = 98% ; **^1H NMR (CDCl₃, 250 MHz)** : δ 8.24 (s, 1H, NH-CO), 8.03 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH-CO), 7.88 (s, 1H, CH-N=N=N), 7.25 (m, 7H, Ar Bn + Ar), 6.78 (m, 2H, Ar), 5.50 (s, 2H, CH₂Ph), 3.41 (s, 2H, CH₂-CO-N) ; **^{13}C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz)** : δ 164.9 (CH₂-C=O), 162.1 (C=C-CO), 146.7 (C-NH, Ph), 141.1 (C=C-CO), 130.8, 129.2, 127.1 (CH, Ar), 121.9 (C=C-CO), 52.3 (CH₂-Ph), 43.0 (CH₂-CO) ; **MALDI/TOF** : m/z = 368.4 (MH⁺, 100%).

IIe.1.2. Synthèses des références 13 et 14



14. La résine méthoxytrityle cystéamine (1.0 g, 0.7 mmol.g⁻¹, 0.7 mmol) est conditionnée dans le DCM (3 x 1 min), puis le DMF (3 x 1 min). La Fmoc-Gly-OH (2.08 g, 7.0 mmol, 10.0 équiv.), la DIPEA (1.2 mL, 7.0 mmol, 10.0 équiv.), puis le DCC (1.45 g, 7.0 mmol, 10.0 équiv.) sont ajoutés successivement dans 20 mL de DMF et l'ensemble est agité durant 3h à température ambiante. La réaction est répétée une seconde fois pour assurer un couplage quantitatif (mêmes quantités de réactifs). Le test Kaiser est alors négatif. Les réactifs sont éliminés par filtration et la résine est lavée par le DMF (3 x 1 min), le DCM (3 x 1 min) puis le DMF (3 x 1 min). La résine est ensuite déprotégée par une solution de pipéridine dans la DMF (20%, 3 x 5 min). Le test Kaiser est alors positif. Après des lavages successifs par le DMF (3 x 1 min), le DCM (3 x 1 min), et la NMP (3 x 1 min), la Boc-Gly-OH (1.23 g, 7.0 mmol, 10.0 équiv.) en solution dans 20 mL de NMP puis la DIPEA (1.2 mL, 7.0 mmol, 10.0 équiv.) et le DCC (1.45 g, 7.0 mmol, 10.0 équiv.) sont successivement ajoutés. L'ensemble est agité durant une nuit à température ambiante. La résine est alors lavée par la NMP (3 x 1 min) et le DCM (3 x 1 min). Le test Kaiser est alors négatif. La résine est traitée à deux reprises par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) durant 30 min. Les solutions sont regroupées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut ainsi obtenu est alors repris dans 5 mL d'un mélange eau/ACN (4/1) et purifié par RP-HPLC semi-préparative ($t_R = 11.5$ min) pour mener au composé **14** (9.4 mg). **RP-HPLC analytique** : $t_R = 7.1$ min, pureté =

97%) ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 4.33 (d, $J = 6.8$, N-CH₂-CO), 4.01 (s, 2H, NH₂-CH₂-CO), 3.29 (m, 2H, CH₂-N), 2.92 (s, 2H, CH₂-S) $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz) : δ 171.7, 169.4 (CO, amide), 44.2 (N-CH₂-CO-N), 43.4 (S-CH₂-CO-N), 41.2 (N-CH₂-CH₂-S), 26.2 (N-CH₂-CH₂-S). ; **ES/mode positif** : $m/z = 191.9$ (MH^+ , 100%), 213.9 (MNa^+ , 24.5%), 229.9 (MK^+ , 7.1%).



13. La résine méthoxytrityle cystéamine (1.0 g, 0.7 mmol.g⁻¹, 0.7 mmol) est conditionnée dans le DCM (3 x 1 min), puis le DMF (3 x 1 min). La Fmoc-Gly-OH (2.08 g, 7.0 mmol, 10.0 équiv.), la DIPEA (1.2 mL, 7.0 mmol, 10.0 équiv.), puis le DCC (1.45 g, 7.0 mmol, 10.0 équiv.) sont ajoutés successivement dans 20 mL de DMF et l'ensemble est agité durant 3h à température ambiante. La réaction est répétée une seconde fois pour assurer un couplage quantitatif (mêmes quantités de réactifs). Le test Kaiser est alors négatif. Les réactifs sont éliminés par filtration et la résine est lavée par le DMF (3 x 1 min), le DCM (3 x 1 min) puis le DMF (3 x 1 min). La résine est ensuite déprotégée par une solution de pipéridine dans la DMF (20%, 3 x 5 min). Le test Kaiser est alors positif. Après des lavages successifs par le DMF (3 x 1 min), le DCM (3 x 1 min), et le DMF (3 x 1 min), le composé **52** (2.08 g, 7.0 mmol, 10.0 équiv.) dans 15 mL de DMF, la DIPEA (1.2 mL, 7.0 mmol, 10.0 équiv.) et le DCC (1.45 g, 7.0 mmol, 10.0 équiv.) sont successivement ajoutés et l'ensemble est agité durant une nuit à température ambiante. Les réactifs sont éliminés par filtration et la résine est lavée par le DMF (3 x 1 min) et le DCM (3 x 1 min). Le test Kaiser est alors négatif. La résine est alors traitée par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5), les filtrats sont regroupés et le solvant est évaporé sous pression réduite pour conduire à un produit brut qui est repris dans 5 mL d'un mélange eau/ACN (4/1) et purifié par RP-HPLC semi-préparative ($t_R = 11.5$ min) pour conduire au composé **13** (12.0 mg). **RP-HPLC analytique** : $t_R = 11.5$ min, pureté = 95% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 4.38 (s, 2H, N-CH₂-CO), 3.88 (t, $J = 7.0$, 2H, CH₂-N), 3.80 (s, 2H, S-CH₂-CO), 3.14 (t, $J = 7.0$, CH₂-S) ; MALDI/TOF : $m/z = 209.2$ (MH^+ , 100%) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz) : δ 172.4, 170.1 (2x CO, amide), 43.4 (N-CH₂-CO-N), 41.8 (N-CH₂-CH₂-S), 27.9 (S-CH₂-CO-N), 24.0 (N-CH₂-CH₂-S).

Chapitre III

Marquage des ligands et étude des complexes

Dans cette troisième partie, nous avons évalué l'aptitude des ligands synthétisés au chapitre 2 à être utilisés comme base de départ pour la réalisation de traceurs technétiés. Pour cela, nous avons effectué un double criblage de ces 12 ligands. En premier lieu, seuls les ligands complexant efficacement et sans sous-produit le technétium ont été retenus. Parmi ceux-ci, nous n'avons conservé que ceux ayant une stabilité intéressante en milieu biologique. Le composé ayant passé avec succès ces deux étapes de sélection a alors été étudié *in vivo*.

III.1. Complexation de ^{99m}Tc par les ligands

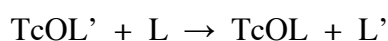
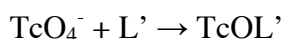
Dans un premier temps, les complexes formés par l'ensemble des 12 ligands et deux références ont été préparés. Pour effectuer cette première sélection nous avons utilisé un protocole de complexation simple répondant aux impératifs d'une utilisation en milieu hospitalier.

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, le technétium est élué à partir d'un générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ sous forme d'une solution de pertechnétate de sodium NaTcO_4 de nombre d'oxydation + VII très diluée (concentration de l'ordre du nanomolaire). La préparation de complexes du cœur oxotechnétium (+V) impose donc de procéder à la réduction de ce dernier.

Il existe un grand nombre de protocoles employés pour former des complexes de Tc(V) qui peuvent être regroupés en deux grandes catégories : la voie directe et la voie indirecte.

III.1.1. Complexation par voie indirecte

La méthode de complexation indirecte du technétium est la plus répandue. Elle consiste à préparer un complexe intermédiaire de stabilité moyenne qui subira un échange de ligand pour conduire au complexe désiré selon l'enchaînement suivant :



Cette méthode de complexation est particulièrement adaptée lorsque le complexe désiré (TcOL) est favorisé thermodynamiquement mais a une cinétique de formation lente. Dans ce cas, le complexe intermédiaire TcOL' qui a une vitesse de formation plus élevée est lentement transformé en TcOL par transchélation. En l'absence de cet intermédiaire, le technétium réduit réagirait en milieu aqueux pour conduire à un cœur dioxotechnétium TcO_2^+ . Cette méthode est fréquemment utilisée pour la préparation de complexes de type N_4 à N_2S_2 . Elle peut aussi être employée pour préparer des complexes bimoléculaires 3+1 [1-3]. Différents ligands intermédiaires peuvent être utilisés, les deux principaux étant le gluconate et le tartrate (Fig. III.1.) de sodium (Tableau III.1.).

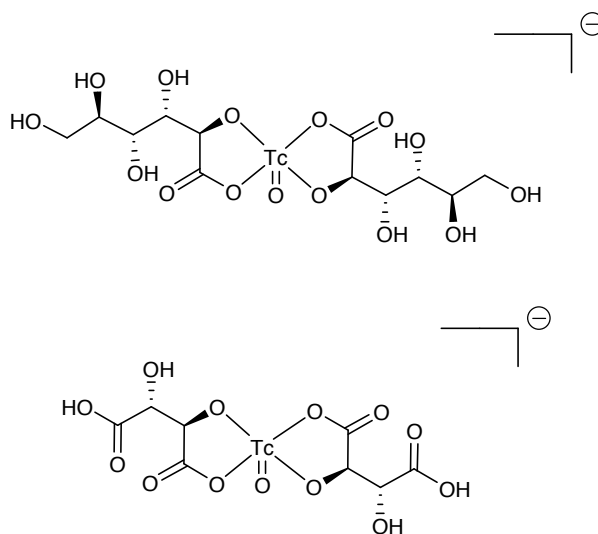


Fig. III.1.: Les complexes intermédiaires $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Gluconate (en haut) et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tartrate (en bas).

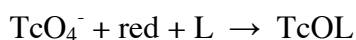
Ligand intermédiaire	Agent réducteur	Structure du ligand	Rendement	Référence
Gluconate de sodium		N ₃ S	60% -98%	[4-7]
		N ₃ S / N ₂ S ₂	80%	[8]
Tartrate de sodium	SnCl ₂	N ₄		[9]
		N ₃ S	45-60%	[10] [11] [12]
		N ₂ S ₂		[13]
		N ₃ S	90%	[14]
Glucoheptonate de sodium		N ₂ S ₂		[15]
Glutarate de sodium		N ₃ S	NA	[16]

Tableau III.1. : Formation de complexes Tc-N_xS_{4-x} par la méthode indirecte : intermédiaires les plus utilisés.

III.1.2. Complexation par voie directe

Lorsque la formation du complexe désiré est favorisée cinétiquement et thermodynamiquement, il est possible d'utiliser une voie de synthèse dite directe consistant à réduire le pertechnétate de sodium directement en présence du ligand. Une fois le technétium réduit, il est piégé par le ligand en solution.

Le bilan de la formation du complexe est donc le suivant :



En règle générale la préparation du complexe s'effectue en milieu aqueux ou dans l'alcool lorsque le ligand n'est pas suffisamment hydrophile. L'agent réducteur employé est le plus souvent le chlorure d'étain (SnCl₂) mais d'autres réducteurs comme l'hydrosulfite de sodium sont parfois employés (Tableau III.2.).

Ligand	Réducteur	Solvant	Référence
N ₄	SnCl ₂	H ₂ O	[17]
		MeOH	[18]
N ₃ S	Na ₂ S ₂ O ₄	H ₂ O	[7]
N ₂ S ₂	SnCl ₂	MeOH	[19]
		Na ₂ S ₂ O ₄	EtOH

Tableau III.2. : Formation de complexes Tc-N_xS_{4-x} par la méthode directe : quelques conditions utilisées.

Les concentrations en agent réducteur et en ligand doivent être particulièrement élevées par rapport à la concentration en pertechnétate de façon à favoriser la réduction de ce dernier mais aussi faciliter le piégeage du cœur technétié par le ligand. Lors de la préparation de complexes de ^{99m}Tc, la solution de pertechnétate éluée est très diluée (10⁻⁸ – 10⁻⁹ M) et ces deux conditions sont facilement remplies. En revanche, lors de la préparation des mêmes complexes en rhénium ou en ^{99g}Tc en quantités de l'ordre du milligramme afin d'effectuer des caractérisations, le métal et le ligand sont engagés en quantités stœchiométriques. Ce changement de conditions peut se traduire par une cinétique de formation du complexe plus lente et entraîner une diminution de l'efficacité de complexation.

III.1.2. Protocole employé pour le marquage des ligands

Tous les complexes seront formés en utilisant le même protocole de complexation. L'objectif de ce travail étant de développer une plateforme de base pour la réalisation de traceurs pour l'imagerie médicale utilisable aussi bien pour des traceurs BFCAs que pour des traceurs Tc-essentiels (voir Chap. I, I.1.3.b), il est important que le protocole de préparation des composés soit simple, efficace et réalisable en milieu hospitalier. Seuls les ligands complexant le technétium efficacement dans ces conditions seront étudiés ultérieurement.

Certaines études de marquage de peptides ou oligomères par la méthode indirecte utilisant des motifs aussi efficaces que MAG₃ (Chap. I, fig. I.10.e) mentionnent la présence de complexes intermédiaires résiduels [11]. Il s'agit d'une part de complexe Tc-Tartrate (Fig. III.1.bas) dont l'apparition a pu être réduite en chauffant légèrement pendant la complexation, et de complexe Tc-MAG3 non conjugué à la biomolécule. Une optimisation des conditions

suivie d'une repurification a permis d'éviter une perte de contraste consécutive à l'injection d'un mélange hétérogène de complexes.

Le protocole que nous avons employé est réalisé en milieu aqueux. La déprotonation des différents sites de chélation est assurée par l'ajout de soude (pH = 8.0 à 9.0 environ) et le pertechnétate de sodium est réduit par le chlorure d'étain, agent réducteur le plus répandu dans la littérature (Tableaux III.1. et III.2.). Le ligand et l'agent réducteur sont introduits en concentrations millimolaires, très supérieures à la concentration de la solution nanomolaire de pertechnétate utilisée (Tableau III.3.). Ces concentrations sont donc parfaitement adaptées à un marquage direct efficace.

Ligand	1 équiv.	
SnCl ₂	3 équiv.	millimolaire
NaOH	100 équiv.	
Na ^{99m} TcO ₄	75 μL de solution éluee	nanomolaire
5 minutes à température ambiante		
Tableau III.3. : Conditions expérimentales de complexation utilisées		

Le marquage a été réalisé à température ambiante en 5 minutes. Ces conditions permettent de ne retenir que les ligands les plus performants pour la complexation du métal. Néanmoins, dans le cas où la complexation n'a pas lieu, celle-ci est testée à nouveau dans des conditions plus drastiques : 1h à 80°C afin de déterminer si l'absence de complexation est liée aux exigences du protocole ou au ligand lui-même. Dans chaque cas, le milieu de complexation est ensuite analysé par RP-HPLC analytique couplée à un détecteur gamma après avoir été neutralisé par ajout d'un volume d'HCl (1M). L'étude des radiochromatogrammes obtenus permet alors d'évaluer :

- La formation du complexe
- La formation d'éventuels sous-produits radiomarqués et/ou d'isomères du complexe
- La présence de technétium réduit témoignant d'une complexation non quantitative du métal.

III.1.3. Problème de l'asymétrie des complexes

Selon le type de ligand étudié, la formation de couples d'énantiomères et de diastéréomères est possible du fait de la présence simultanée du cœur oxotechnétium d'une part et d'une ou plusieurs amines tertiaires contraintes d'autre part. Ainsi, dans le cas des

ligands à structure diamide, tels que **3**, la présence dans le complexe d'un plan d'asymétrie conduit à un couple d'énantiomères (Fig.II.2.). Bien qu'indifférentiables par les techniques de chromatographie utilisées, ce facteur est à prendre en compte lorsque le traceur vise une cible biologique hautement stéréosélective.

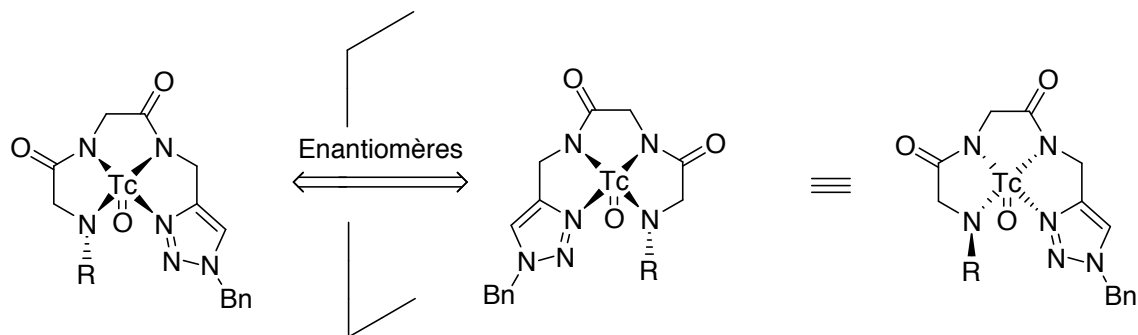


Fig. III.2. : Couple d'énantiomères dans le cas de ligands diamides

D'autre part, dans le cas des ligands à structures amine-amide, l'amine secondaire intervenant dans la complexation du métal possède un doublet pouvant alors adopter une position axiale ou équatoriale par rapport au plan fictif de la molécule (Fig. III.3.).

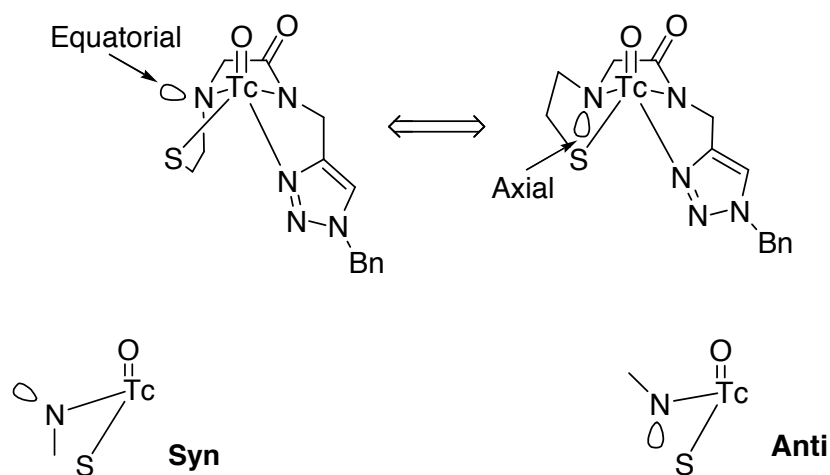


Fig. III.3. : Couple d'énantiomères dans le cas de ligands amine-amide

Malgré le possible « flip-flop » du doublet de l'amine qui entraîne une racémisation rapide, on se doit d'envisager une possible coexistence d'énantiomères non interconvertibles du fait de l'existence de barrières énergétiques trop élevées liées à la forte contrainte stérique.

En outre, il est également possible d'envisager la formation de complexes aussi bien neutres que chargés, la liaison Tc-N pouvant impliquer simplement le doublet de l'azote d'une amine (liaison dative au sens strict) ou au contraire résulter d'une déprotonation qui génère une charge négative globale. (Fig. III.4.). Ainsi il est probable que la forme observée *in vivo*, à pH physiologique diffère de celle visualisée par HPLC (solvants contenant 0.1% de TFA). La charge d'un complexe est un des facteurs pouvant influencer grandement son excrétion: les complexes chargés ont tendance à être éliminés par voie rénale, contrairement aux complexes neutres.



Fig. III.4. : Un même ligand peut conduire à des complexes neutres ou chargés

III.1.3 Résultats et conclusions

Les tableaux III.4. à III.7. regroupent les résultats des tests de complexation des ligands **1** à **12** ainsi que des deux composés références **13** et **14** via le protocole décrit ci-dessus. La complexation dans des conditions « douces » (température ambiante, 5 min) a été testée sur l'ensemble des ligands. L'indication de conditions « dures » (80°C, 1h) signifie que la complexation n'a pas lieu à température ambiante.

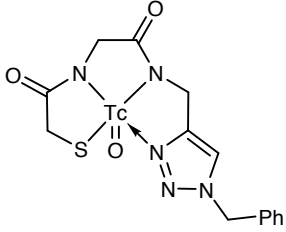
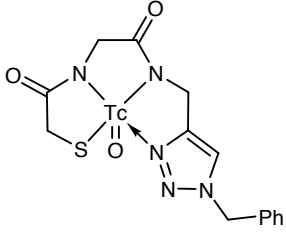
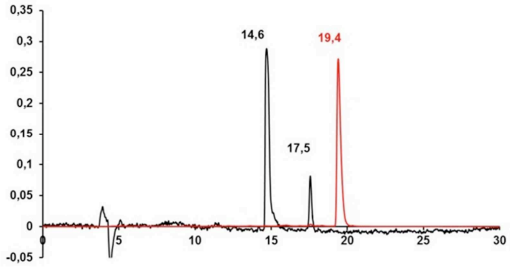
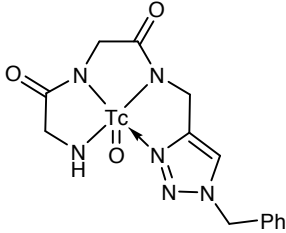
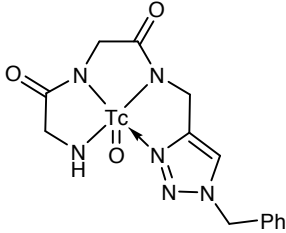
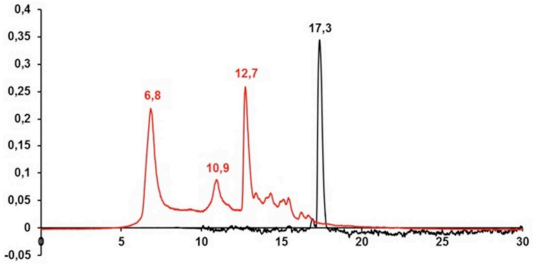
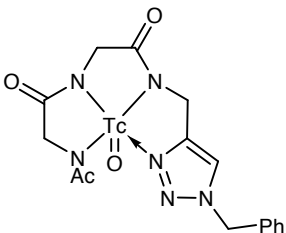
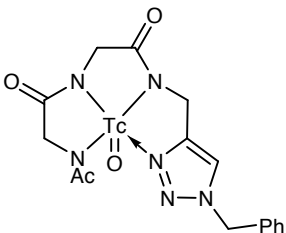
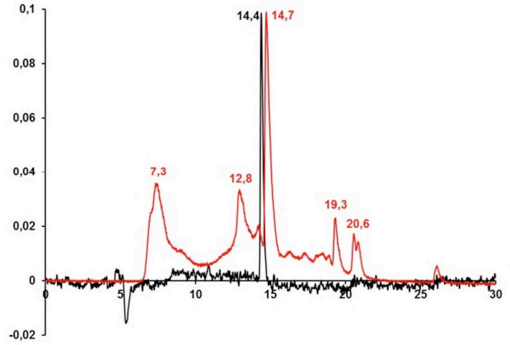
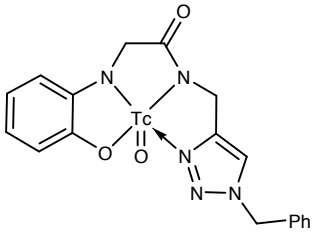
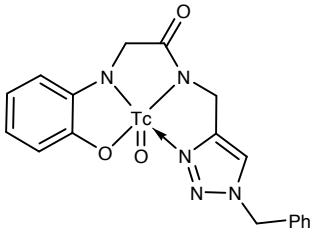
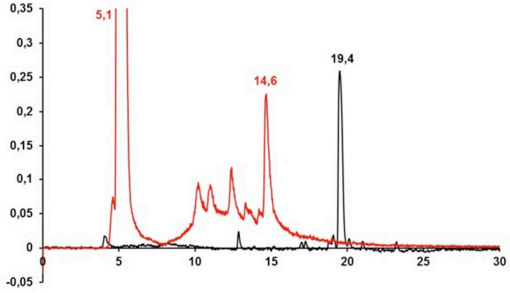
Ligand	Complexe	Conditions	Radio-HPLC du complexe (H ₂ O + 0.1% TFA → ACN + 0.1% TFA en 30 min)
<p>1</p> 		<p>rt 5 min</p>	
<p>2</p> 		<p>80°C 1h</p>	
<p>3</p> 		<p>rt 5 min</p>	
<p>4</p> 		<p>80°C 1h</p>	

Tableau. III.4. : Complexation du ^{99m}Tc par les ligands **1** à **4** (Ligand : ■, Complexe : ■).

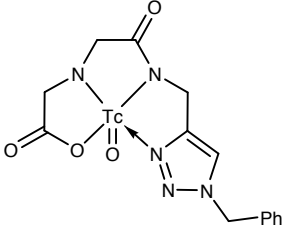
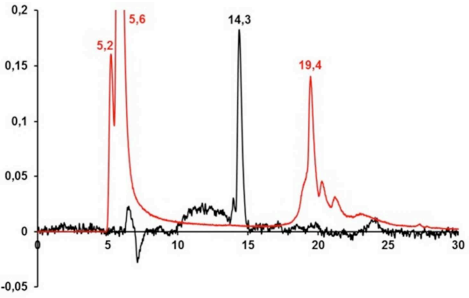
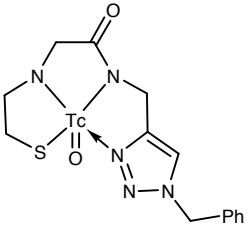
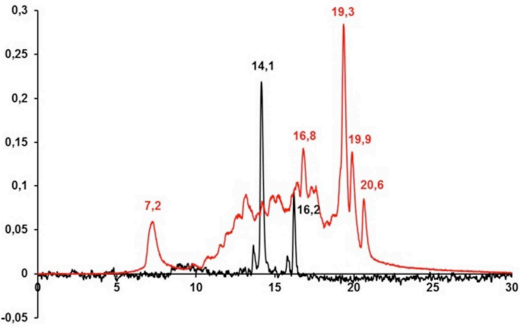
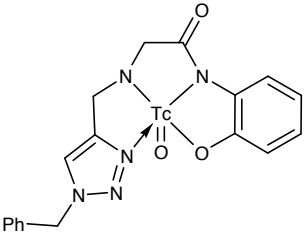
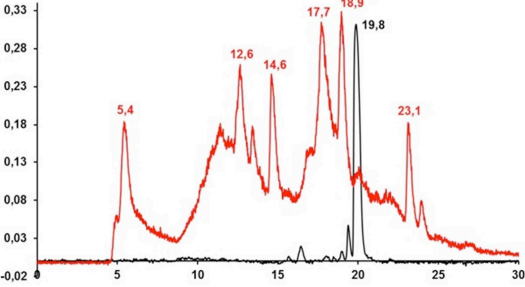
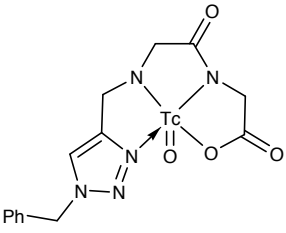
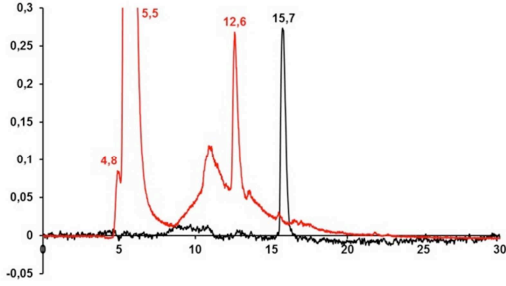
Ligand	Complexe	Conditions	Radio-HPLC du complexe (H ₂ O + 0.1% TFA → ACN + 0.1% TFA en 30 min)
<p>5</p> 	<p>80°C 1h</p>		
<p>6</p> 	<p>80°C 1h</p>		
<p>7</p> 	<p>80°C 1h</p>		
<p>8</p> 	<p>80°C 1h</p>		

Tableau. III.4. : Complexation du ^{99m}Tc par les ligands **5** à **8** (Ligand : ■, Complexe : ■).

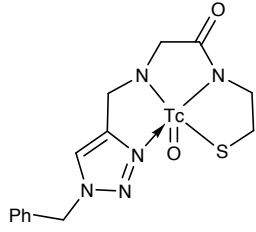
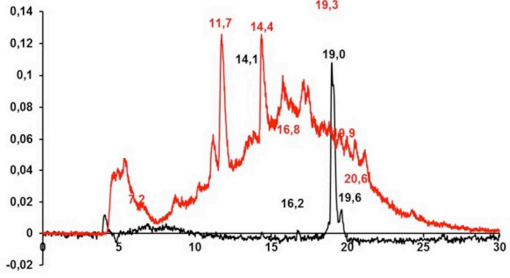
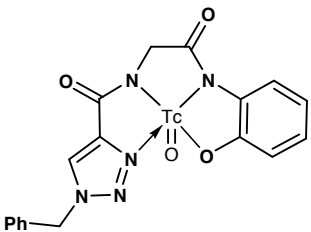
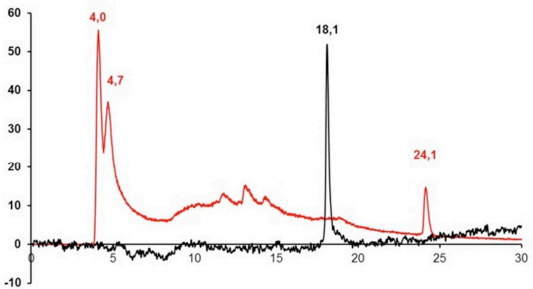
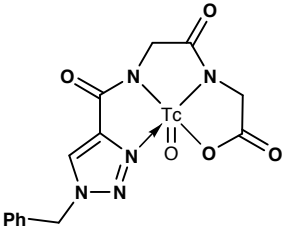
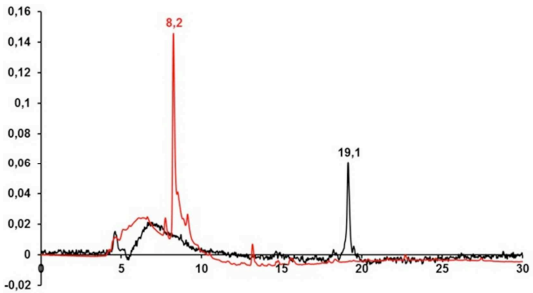
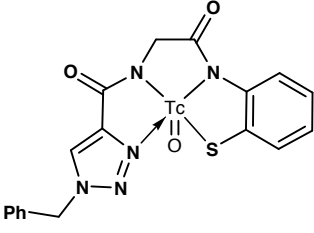
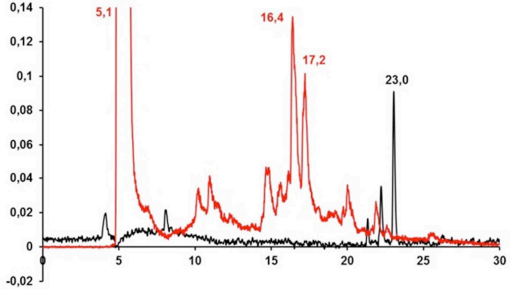
Ligand	Complexe	Conditions	Radio-HPLC du complexe (H ₂ O + 0.1% TFA → ACN + 0.1% TFA en 30 min)
<p>9</p> 		<p>80°C 1h</p>	
<p>10</p> 		<p>80°C 1h</p>	
<p>11</p> 		<p>80°C 1h</p>	
<p>12</p> 		<p>80°C 1h</p>	

Tableau. III.6. : Complexation du ^{99m}Tc par les ligands 9 à 12 (Ligand : ■, Complexe : ■).

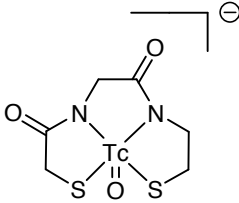
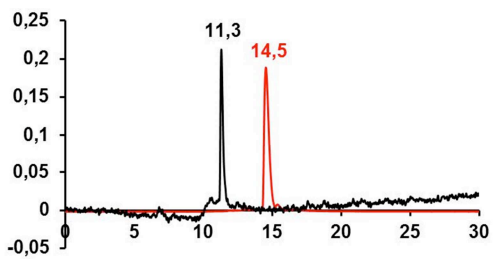
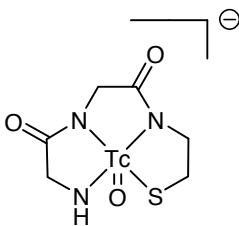
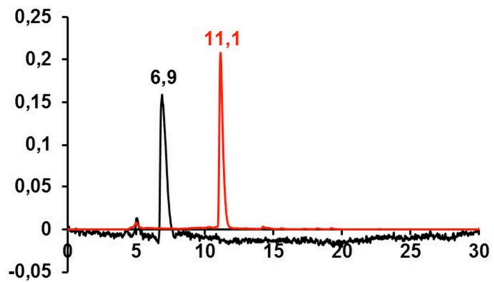
Ligand	Complexe	Conditions	Radio-HPLC du complexe (H ₂ O + 0.1% TFA → ACN + 0.1% TFA en 30 min)
13		rt 5 min	
14		rt 5 min	

Tableau III.7. : Complexation du ^{99m}Tc par les ligands les référence N₂S₂ et N₃S (Ligand : ■, Complexe : ■).

On constate que 10 des 12 ligands étudiés ont nécessité des conditions réactionnelles plus drastiques (80°C, 1h) car aucune complexation n'était observée dans les conditions initiales (température ambiante, 5 min). Dans le cas des ligands, **4**, **5**, **8**, **10**, et **12** ces conditions réactionnelles plus sévères n'ont pas permis d'obtenir une complexation quantitative. A chaque fois, nous avons observé un pic majoritaire (voire largement prépondérant) vers 5 à 6 min correspondant au technétium réduit libre [21]. Dans le cas des ligands **2**, **3**, **6**, **7** et **9**, le chauffage et un temps de réaction plus long permettent d'observer la disparition du technétium libre qui suggère que la complexation a bien eu lieu. Néanmoins, plusieurs pics sont observés indiquant la formation de divers sous-produits ou de diastéréomères du complexe. Le chauffage à 80°C, s'il permet de mener la réaction à complétion peut également favoriser la formation de plusieurs diastéréomères, l'énergie fournie favorisant alors leur interconversion (conditions thermodynamiques). Ces ligands ne sont pas adaptés à notre étude car les complexes associés nécessiteraient une purification avant utilisation qui s'avère gênante du fait de la courte demi-vie de ^{99m}Tc et des volumes

élués en solution très acide et à haute teneur en acétonitrile, impropre pour une injection *in vivo*.

Dans le cas des deux ligands **1** et **11**, aucun technétium réduit résiduel n'est observé. Le complexe $^{99m}\text{Tc-1}$ est obtenu quantitativement en 5 minutes sans nécessiter de chauffage tandis que l'obtention de $^{99m}\text{Tc-11}$ est incomplète dans ces conditions. Un chauffage à 80°C durant une heure permet néanmoins de finaliser la réaction. Ce résultat peut être comparé à ceux décrits dans la littérature concernant la complexation d'un cœur oxotechnétium par des ligands N_3S présentant un noyau imidazole ou pyridyle impliqués dans la chélation du métal (Fig. III.5.) qui sont obtenus avec des rendements de marquage respectifs de 82 et 75 % dans des conditions optimisées [22]. Le ligand **1**, qui complexe quantitativement le technétium, est donc particulièrement performant.

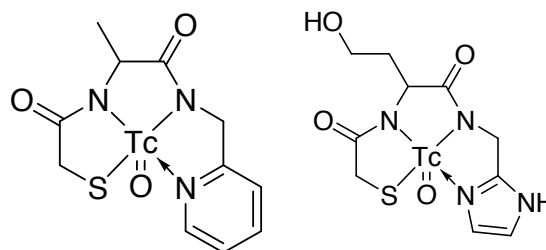


Fig. III.5. : Complexes de ^{99m}Tc à noyau pyridyle ou imidazole [22]

Les deux références, choisies pour leur aptitude à chélater le cœur oxotechnétium conduisent effectivement aux complexes $^{99m}\text{Tc-13}$ et $^{99m}\text{Tc-14}$ quantitativement sans nécessiter de chauffage ou un temps de réaction prolongé, comme cela a été décrit dans la littérature.

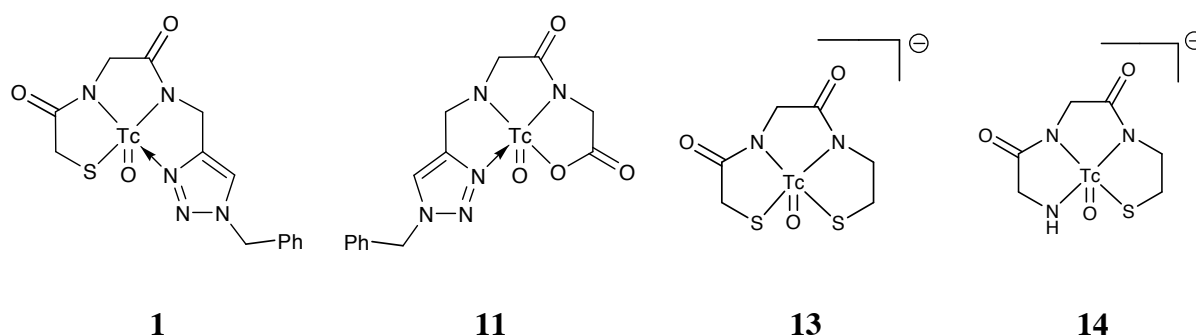


Fig. III.6. : Les complexes $^{99m}\text{Tc-1}$ et $^{99m}\text{Tc-10}$ ainsi que les deux complexes références $^{99m}\text{Tc-13}$ et $^{99m}\text{Tc-14}$.

Dans la suite de cette étude, nous nous intéresserons aux complexes $^{99m}\text{Tc-1}$ obtenu quantitativement, au complexe $^{99m}\text{Tc-11}$, qui se forme relativement aisément, et les comparerons aux complexes références $^{99m}\text{Tc-13}$ et $^{99m}\text{Tc-14}$ (Fig. III.3.).

III.2. Etude *in vitro* des ligands retenus

Un radiopharmaceutique est généralement injecté au patient par voie intraveineuse. C'est alors le sang qui va permettre sa biodistribution dans l'organisme. Les complexes technétiés ont tendance à s'accumuler préférentiellement dans certains organes et tissus qui forment le tractus gastro-intestinal (foie, intestin, estomac). L'un des objectifs du développement de traceurs est de limiter cette tendance à l'accumulation non souhaitée qui vient parasiter le signal au niveau de la cible visée et diminue le contraste des images obtenues. Il nous fallait donc nous assurer que les complexes retenus étaient bien stables dans le milieu circulant *in vivo* avant d'aller plus loin dans cette étude.

Le sang est un milieu biologique très complexe. Chez l'homme, il est composé de plasma à hauteur de 55% et d'éléments figurés ou cellules du sang (globules rouges, globules blancs, plaquettes) à hauteur de 45% (Fig. III.7.). Le plasma est lui-même constitué à 90% d'eau, les 10% restant étant un mélange de protéines, de nutriments... Chez l'homme, les trois principales protéines présentes dans le plasma sont l'albumine (environ 55%), les globulines et le fibrinogène.

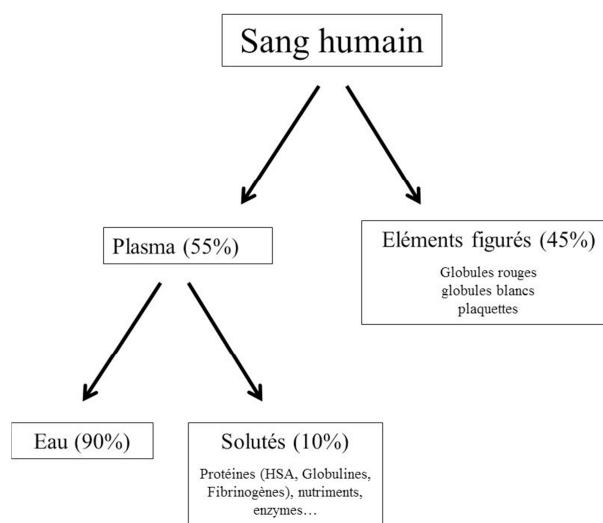


Fig. III.7. : Composition moyenne du sang humain

Le devenir d'un radiopharmaceutique dans le sang est variable. Si le composé ne subit aucune dégradation chimique et aucun métabolisme, il subsiste intact jusqu'à son élimination de l'organisme et peut être considéré comme stable. A l'inverse, un composé peut être dégradé par certains composés présents dans le sang : glutathion [23, 24], nombreuses protéines du plasma [25]. A titre d'exemple, la Serum Albumine Humaine (HSA) peut réagir

non enzymatiquement par la fonction thiol libre (Cys 34) qui peut entraîner une dissociation réversible ou non du complexe. La transferrine, protéine du sang dont le rôle biologique est d'assurer le transport du fer, peut également entraîner la dégradation de complexes technétiés par transchélation [25]. La transferrine ayant la propriété d'être très présente au niveau des foyers d'inflammation, cette dégradation a d'ailleurs pu être mise à profit avec des traceurs tels que le ^{67}Ga -citrate. Dans l'organisme, ce traceur est dégradé pour conduire à ^{67}Ga -transferrine qui permet de visualiser l'inflammation [26, 27].

Enfin, il est possible d'observer un phénomène d'adsorption sur les protéines du plasma. Ce dernier cas n'est toutefois pas toujours un inconvénient. En effet certaines protéines et en particulier la serum albumine humaine (HSA) jouent un rôle de transporteur pour des composés chimiques ou certains cations. En outre l'albumine peut être dégradée au niveau de certaines cellules (en particulier les cellules tumorales) qui utilisent les acides aminés la constituant pour se développer. Ainsi certains radiopharmaceutiques sont développés actuellement dans le but d'atteindre les tumeurs en utilisant l'albumine comme vecteur [28].

Afin de déterminer parmi les composés que nous avons préalablement sélectionné ceux qui feront l'objet d'une étude *in vivo*, nous avons étudié la stabilité des complexes $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -**1** et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -**11** en plasma murin et avons comparé les résultats à la même étude effectuée sur les deux références $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -**13** et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -**14**.

III.2.1. Protocole et résultats des études cinétiques.

Le sang est composé à 55% de plasma contenant des protéines plasmatiques (Fig. III.4.) dont le rôle est de transporter des substances dans l'organisme telles que les molécules alimentaires (glucose, lipides, ...), et les déchets du métabolisme (urée, ...). C'est aussi le plasma qui va transporter dans l'organisme les radiopharmaceutiques injectés au patient. C'est pour cette raison que des études de stabilité *in vitro* en plasma murin précèdent en règle générale toute étude *in vivo* afin d'évaluer la résistance du complexe en milieu circulant.

Cette étude consiste en l'incubation à 37°C d'un volume de plasma murin contenant le complexe étudié à haute dilution, reproduisant les conditions *in vivo*. A intervalles de temps réguliers, un aliquot est prélevé et sa composition est analysée par radio-HPLC. Afin d'être injecté en HPLC, il est indispensable de se débarrasser préalablement des protéines de grande taille présentes dans le plasma. Il existe plusieurs techniques permettant de précipiter ces

protéines. Les deux plus courantes sont la précipitation par ajout d'un solvant miscible à l'eau : méthanol, éthanol, isopropanol, ou acétonitrile [29-31], et la précipitation par acidification : acide trifluoroacétique (TFA), acide trichloroacétique (TCA), acide dichloroacétique (DCA) [32]. La technique utilisée jusqu'à présent au laboratoire consistait à précipiter les protéines au méthanol [21]. Cette méthode présente cependant un inconvénient majeur : la présence du méthanol entraîne la majeure partie du produit dans le pic d'injection lors d'une étude par HPLC. La solution pour s'affranchir de ce problème consiste à diluer fortement l'échantillon dans l'eau, mais elle introduit un biais dans la mesure lié à une baisse de résolution des radiochromatogrammes. Nous nous sommes donc tournés vers une méthode de précipitation par acidification au moyen d'une solution de TFA (10%).

Afin de nous assurer que la méthode de précipitation employée n'avait aucun effet sur les complexes étudiés, et en particulier qu'aucune dissociation des complexes n'avait lieu, nous avons effectué une étude de stabilité dans les conditions de précipitation en l'absence de plasma (remplacé par un volume équivalent d'eau). Les radiochromatogrammes indiqués à la figure III.8. ont ainsi été obtenus avec le composé $^{99m}\text{Tc-1}$.

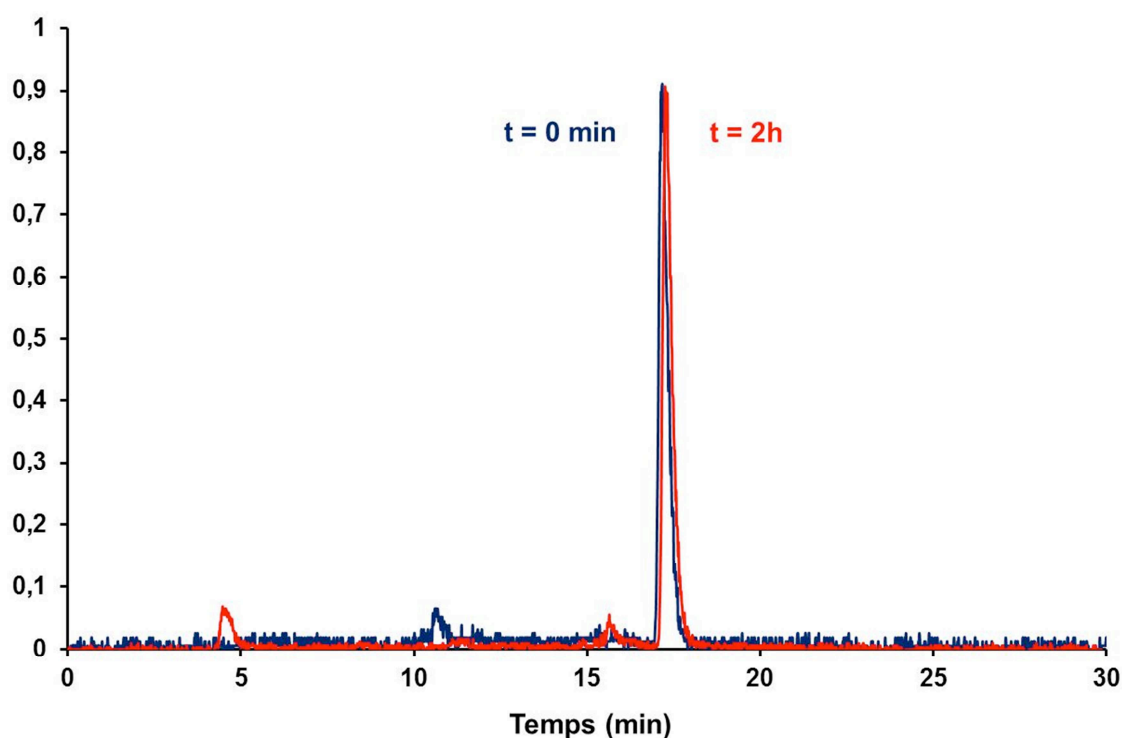


Fig. III.8. : Stabilité de $^{99m}\text{Tc-1}$ en milieu acide dans les conditions de précipitations des protéines plasmatiques.

On constate qu'après 2h, les échantillons prélevés ne contiennent aucun produit de dégradation, le complexe est toujours présent et intact (Fig. III.8.). L'emploi de cette méthode de précipitation a donc été validée. Une fois les protéines précipitées, le surnageant est légèrement dilué de façon à réduire la proportion d'acide, puis étudié par radio-HPLC.

Les études cinétiques réalisées sur les deux composés et deux références ont été réalisées en utilisant du plasma murin frais de souris Balb-C obtenu par centrifugation de prélèvements sanguins. Une solution fraîchement préparée de complexe (nanomolaire) est ajoutée au plasma (complexe/plasma 1/9) et incubée à 37°C pendant 6h. A intervalles de temps réguliers, un échantillon de la solution est prélevé et les protéines sont séparées par précipitation et centrifugation. L'échantillon est alors analysé par radio-HPLC. La figure III.9. montre l'allure des chromatogrammes obtenus, ici dans le cas de $^{99m}\text{Tc-1}$ en tenant compte de la décroissance du technétium entre les deux injections.

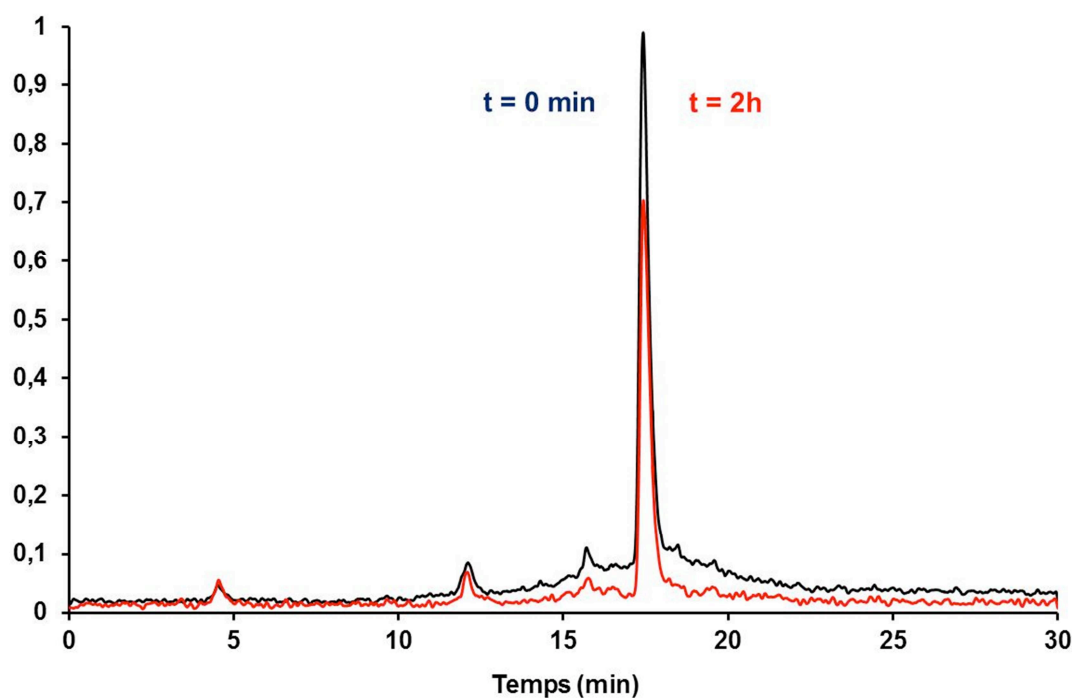


Fig. III.9. : Radiochromatogrammes de $^{99m}\text{Tc-1}$ après incubation en plasma murin à 37°C.

La proportion de technétium résiduel dans l'échantillon peut alors être évaluée en mesurant le rapport de l'aire correspondant au complexe à l'instant $t = 2$ h et de cette même aire à $t = 0$ min. Dans le cas de la figure III.9., la valeur de ce rapport est de 0.9. Cela signifie

que seuls 90% de l'activité a été retrouvée deux heures après le mélange dans un échantillon prélevé et étudié de la même façon. Ces radiochromatogrammes permettent également de suivre l'apparition d'éventuels produits de dégradation caractérisés par des pics nouveaux.

Toutes ces mesures permettent de tracer les courbes reflétant l'évolution en fonction du temps d'incubation à 37°C du pourcentage de complexe résiduel dans les échantillons prélevés (fig. III.10.).

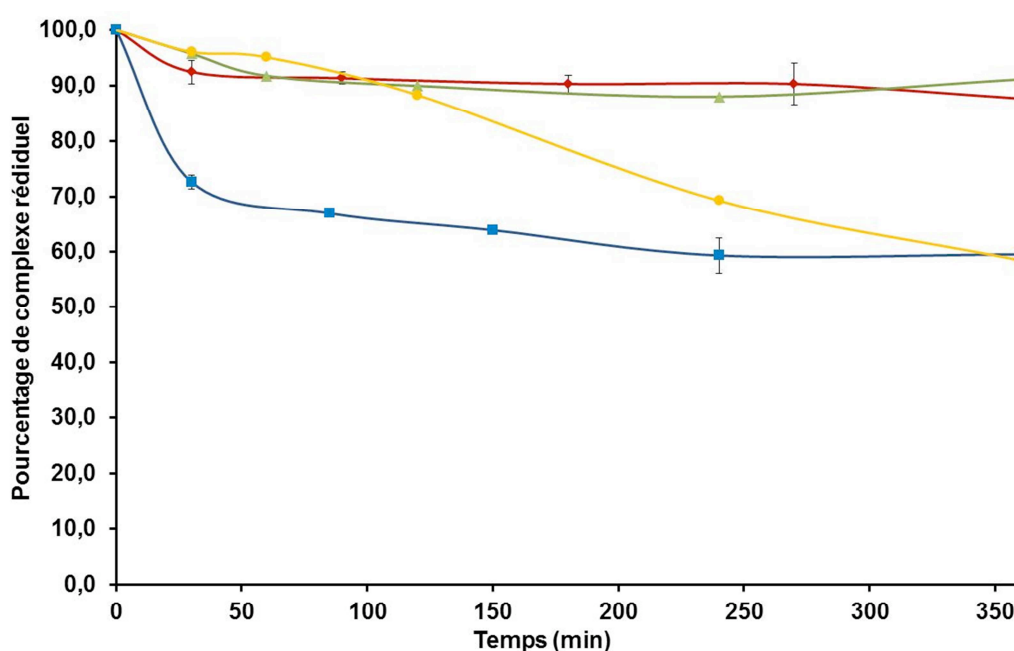


Fig. III.10. : Cinétiques de dégradation en plasma murin (concentration nanomolaire, 37°C, 6h) des complexes présélectionnés ($^{99m}\text{Tc-1}$: ◆, $^{99m}\text{Tc-11}$: ■) et des deux références (N_2S_2 , $^{99m}\text{Tc-13}$: ▲ et N_3S , $^{99m}\text{Tc-14}$: ●)

La première indication donnée par ces courbes est que chacun des complexes étudiés présente une stabilité supérieure à 60% après 6h d'incubation en plasma murin à 37°C.

Le complexe référence $^{99m}\text{Tc-13}$, obtenu à partir du ligand N_2S_2 est plus stable que son homologue $^{99m}\text{Tc-14}$ obtenu à partir du ligand N_3S (90% contre 63%). Cette différence de stabilité entre complexes $\text{Tc-N}_2\text{S}_2$ et $\text{Tc-N}_3\text{S}$ a déjà été décrite dans la littérature [20] et s'explique par un recouvrement particulièrement favorable des orbitales d du métal et p du soufre dans les complexes à géométrie pyramidale à base carrée.

Le complexe $^{99m}\text{Tc-11}$ présente une stabilité d'environ 60% à 6h. Cette stabilité reste intéressante mais bien inférieure à celle observé pour $^{99m}\text{Tc-1}$ et comparable au résultat obtenu avec la référence N_3S . On peut donc penser que la présence d'un seul thiol chélatant explique cette diminution de stabilité. Dans la suite de cette étude nous porterons uniquement notre attention sur le complexe $^{99m}\text{Tc-1}$.

Ainsi le complexe $^{99m}\text{Tc-1}$ donne des résultats très encourageants puisque l'on observe plus de 90% de complexe résiduel après 6h d'incubation. Compte tenu des difficultés techniques inhérentes à la mesure effectuée à $t = 0$ min et de l'allure de pallier observée par la suite, on peut penser que cette variation soudaine dans la première demi-heure d'incubation est le résultat d'un artefact lié à l'expérience. Cette analyse est d'autant plus légitime que les radiochromatogrammes obtenus lors de l'étude cinétique n'indiquent aucune formation de produit de dégradation (fig. III.6.), toute l'activité mesurée dans le surnageant correspondant au complexe.

III.2.2. Etude du pallier

Après une brusque mais légère décroissance, la courbe de stabilité de $^{99m}\text{Tc-1}$ en plasma murin présente une allure de pallier au-delà d'une heure d'incubation à 37°C (Fig. III.7.). Cette allure pourrait suggérer qu'un des constituants du plasma interagit avec le complexe en le dégradant ou en l'entraînant par adsorption. La figure III.6. indique qu'aucun complexe de dégradation n'est observé. Il ne reste donc que la possibilité d'une adsorption, délétère ou non, du complexe sur une protéine plasmatique comme l'albumine, ou une réaction d'échange de ligand entre le complexe et une protéine (avec la Cys 34 de la HSA par exemple). Dans les deux cas, une baisse d'activité dans le surnageant après précipitation des protéines plasmatiques et une augmentation de celle mesurée dans le culot de protéines obtenu devraient être observée.

Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons évalué l'effet sur ce pallier d'une variation du rapport initial [solution de $^{99m}\text{Tc-1}$] / Plasma. Dans les conditions de l'étude de stabilité, le volume de solution de complexe fraîchement préparée correspond à 10% du volume total de l'échantillon. Pour cette étude du pallier, nous avons fait varier cette proportion de 2 à 30%. Comme pour la figure III.9., les radiochromatogrammes correspondant aux temps $t = 0$ min et $t = 2$ h ont été obtenus pour chacun des échantillons et le taux de complexe résiduel (correspondant à la hauteur du pallier) a été estimé. La valeur $t =$

2h a été choisie car à cet instant, le pallier est clairement établi et ne varie plus dans la suite de l'étude cinétique.

La figure III.11. montre l'évolution du pourcentage résiduel de complexe $^{99m}\text{Tc-1}$ après 2h d'incubation en plasma murin à 37°C. On constate que ce pourcentage résiduel n'évolue pas et reste égal à la valeur obtenue dans le cas de l'étude cinétique (10% de solution de complexe dans le plasma) malgré les dilutions successives qui correspondent à une augmentation du ratio [Protéines plasmatiques] / [Complexe]. Ce premier résultat montre que la quantité de protéines plasmatiques, en particulier la serum albumine, présentes dans le milieu d'incubation ne sont pas responsables de la nette diminution observée dans la première demi-heure de l'étude cinétique.

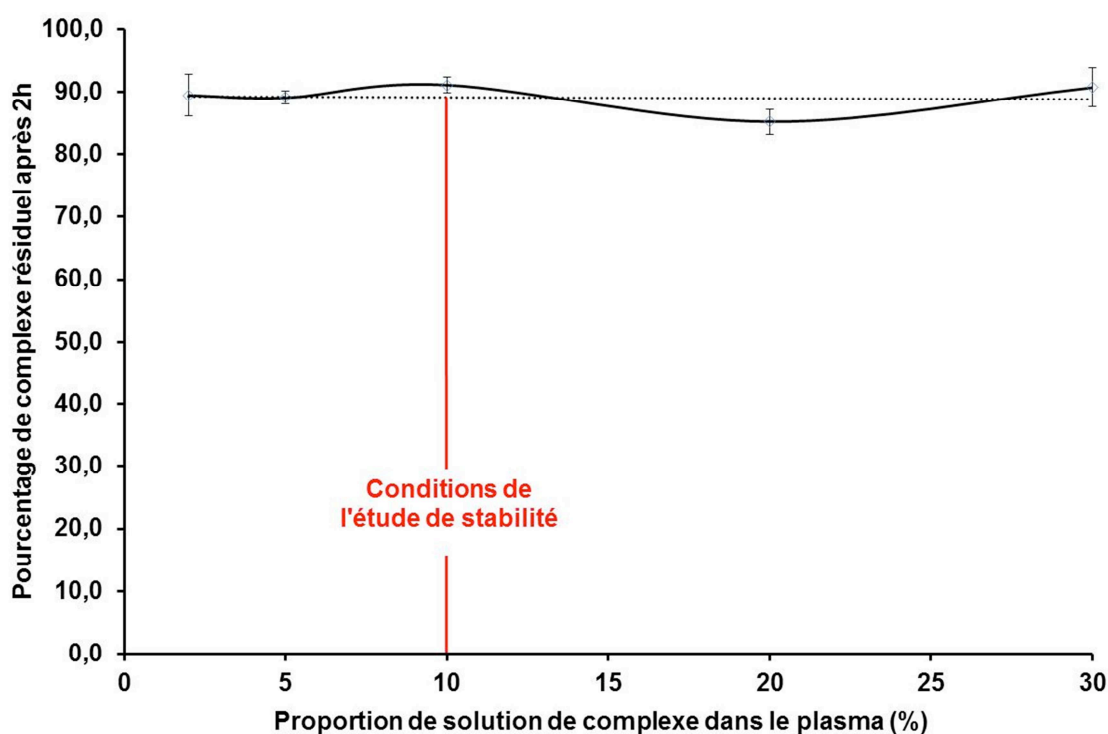


Fig. III.11. : Evolution du pourcentage de complexe résiduel après 2h d'incubation en plasma murin lorsque la proportion initiale de complexe varie.

Durant cette étude, les activités des précipités et surnageants ont également été mesurées après précipitation des protéines du plasma et séparation par centrifugation afin d'étudier une éventuelle adsorption du complexe sur une protéine plasmatique [25].

L'évolution de la proportion d'activité recueillie dans le surnageant est reportée sur la figure III.12. En cas d'adsorption du complexe sur les protéines du plasma, l'activité mesurée dans le culot de protéines devrait augmenter lorsque le ratio [Protéines plasmatiques] / [Complexe] augmente. Les courbes obtenues indiquent que l'activité mesurée au niveau du culot de protéine évolue très peu après deux heures d'incubation en plasma. L'adsorption aux protéines du plasma est donc un phénomène très rapide, qui n'est pas visible du fait des conditions opératoires et du temps nécessaire pour précipiter les protéines et les isoler. D'autre part, le rapport [Activité du surnageant] / [Activité du culot de protéines] n'évolue quasiment pas (environ 10% d'augmentation). L'adsorption du complexe ou d'un produit de démétallation par une protéine du plasma ne semble donc pas être à l'origine de cette allure de pallier qui est plus vraisemblablement imputable à des erreurs de mesures aux temps courts.

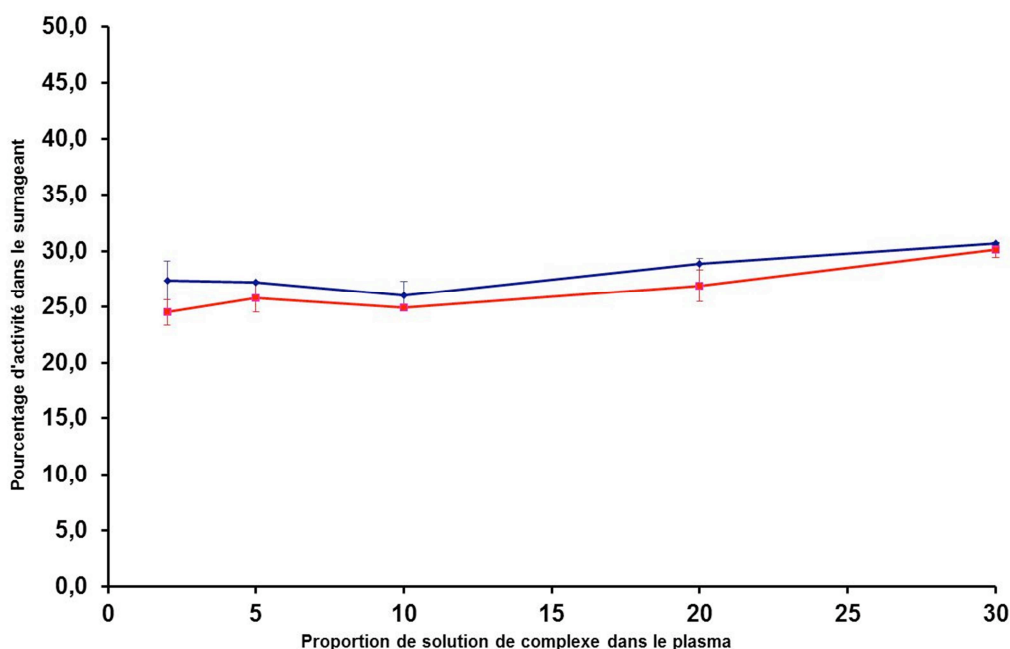


Fig. III.12. : Evolution du pourcentage d'activité mesurée dans le surnageant lors de la précipitation des protéines du plasma à t = 0 min (◆) et t = 2h (■).

Ainsi, à l'issue de la première sélection, deux complexes ($^{99m}\text{Tc-1}$ et $^{99m}\text{Tc-11}$) se distinguent des 10 autres par leur meilleure aptitude à complexer le cœur oxotechnétium. Parmi ces deux complexes, $^{99m}\text{Tc-1}$ a l'avantage de complexer quantitativement le métal en 5 minutes à température ambiante. L'étude de stabilité réalisée *in vitro* a mis en évidence une excellente stabilité en plasma murin du complexe $^{99m}\text{Tc-1}$, bien supérieure à celle observée pour $^{99m}\text{Tc-11}$ et comparable à un complexe référence à ligand N_2S_2 . Ce complexe est donc le

seul hit issu du double criblage décrit ci-dessus. Nous avons choisi de porter notre intérêt sur ce complexe pour les études *in vivo*. Pour des raisons pratiques, nous le mentionnerons désormais sous le nom de TriaS-^{99m}Tc, rappelant ainsi que sa structure présente un noyau triazole et un groupement thiol impliqués dans la complexation.

III.2.3. Etude de la compétition par la cystéine

Nous avons vu précédemment que l'albumine présente dans le plasma était considérée comme une des causes de l'adsorption des radiopharmaceutiques sur les protéines plasmatiques. Ceci est dû essentiellement à l'un de ses acides aminés, la cystéine 34 dont le groupement thiol très disponible peut réagir pour former des ponts disulfures par exemple [33]. Le sang contient également d'autres thiols circulants tels que la cystéine, l'homocystéine et le glutathion [34, 35]. Le glutathion en particulier est essentiel dans le sang puisque, sous sa forme réduite (GSH), il protège les cellules des agents oxydants et participe au métabolisme de certains composés. On le trouve à une concentration moyenne de 2.5 nM dans le sang humain, et de façon plus importante au niveau cérébral (3 mM). Il est impliqué dans les mécanismes permettant la dégradation des composés ayant traversé la barrière hémato-encéphalique, les rendant plus hydrophiles et inaptes à être rétrodiffusés.

Nous avons procédé à une étude de compétition avec la cystéine afin d'évaluer la sensibilité du complexe TriaS-^{99m}Tc vis-à-vis de l'échange de ligand avec des composés riches en thiols. Dans cette étude, réalisée en milieu tamponné (HEPES, 35 nM, pH = 7.8), la concentration en cystéine est 10⁶ fois supérieure à celle du complexe. La figure III.13. montre les radiochromatogrammes obtenus après 2h d'incubation dans ces conditions à 37°C.

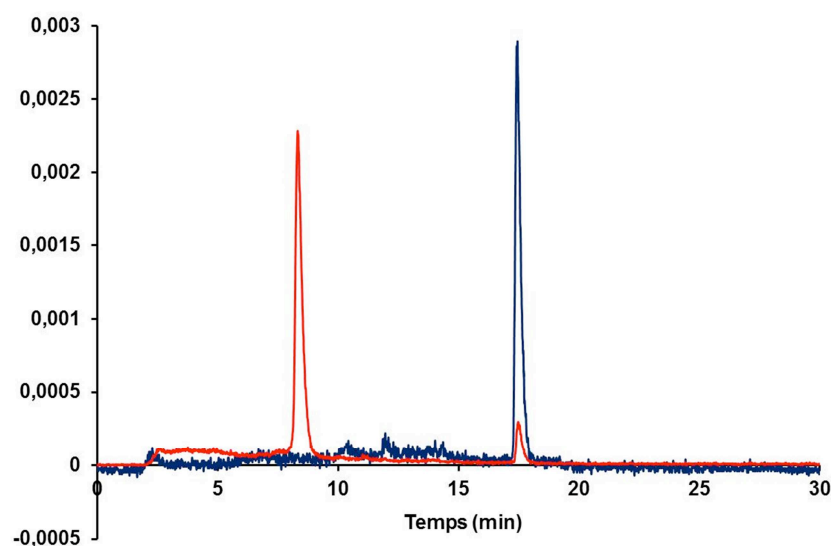


Fig. III.13. : Stabilité de TriaS-^{99m}Tc en milieu concentré en cystéine après 2h d'incubation
(contrôle : ■ ; milieu concentré en cystéine : ■)

Il apparaît que le complexe TriaS-^{99m}Tc est assez sensible à l'effet de la cystéine et qu'un produit de dégradation se forme avec un temps de rétention de 9 minutes environ. Néanmoins, les résultats très encourageant de l'étude de stabilité en plasma (qui ne contient qu'une faible concentration de thiols circulants) nous incitent à poursuivre avec le complexe TriaS-^{99m}Tc vers des études *in vivo*.

III.3. Caractérisation de TriaS-^{99g}Tc

Avant de procéder à l'étude *in vivo* de TriaS-Tc, nous avons effectué sa caractérisation par RMN du proton et spectrométrie de masse. Ces caractérisations ont été effectuées sur le complexe froid TriaS-^{99g}Tc qui peut être obtenu à l'échelle pondérale (de l'ordre de quelques milligrammes) et peut être analysé par les techniques classiques sans nécessiter de conditions de radioprotection supplémentaires. La préparation de TriaS-^{99g}Tc est effectuée en conservant les rapports [SnCl₂]/[TriaS] et [Soude]/[TriaS] tandis que le pertechnétate de sodium et TriaS sont introduits en conditions équimolaires. Dans ces conditions la formation de TriaS-^{99g}Tc n'est pas quantitative (rendement : 28 %).

Les figures III.14. et III.15. montrent respectivement les spectres RMN ^1H du ligand TriaS et du complexe TriaS- $^{99\text{g}}\text{Tc}$. Le spectre du ligand met en évidence un signal caractéristique à 7.45 ppm correspondant au noyau triazole.

Après formation de TriaS- $^{99\text{g}}\text{Tc}$, le spectre RMN change radicalement. D'une part, l'ensemble des signaux se déplacent vers les champs plus faibles. Ceci caractérise un premier effet de la chélation : les atomes du ligand les plus proches du métal sont déblindés par le métal électropositif. Ce déplacement vers les champs faibles des signaux correspondant aux groupements méthylènes situés en alpha des atomes chélatants est régulièrement observé dans la littérature [36]. D'autre part, le spectre RMN obtenu est beaucoup plus complexe: tous les singulets ou doublets correspondants aux groupements CH_2 apparaissent démultipliés. Ceci s'explique par la rigidité de structure induite par la complexation qui a pour effet de lever l'équivalence des protons de ces groupements, formant ainsi des signaux de type multiplets ou des systèmes AB.

Le ligand TriaS et le complexe TriaS- $^{99\text{g}}\text{Tc}$ ont également été caractérisés en masse (MALDI-TOF) : $m/z = 320.0$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ pour TriaS et $m/z = 431.9$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ pour le complexe associé (fig. III.16. et III.17.). Dans les deux cas les masses observées sont conformes aux masses exactes attendues (respectivement 319.1 et 431.2).

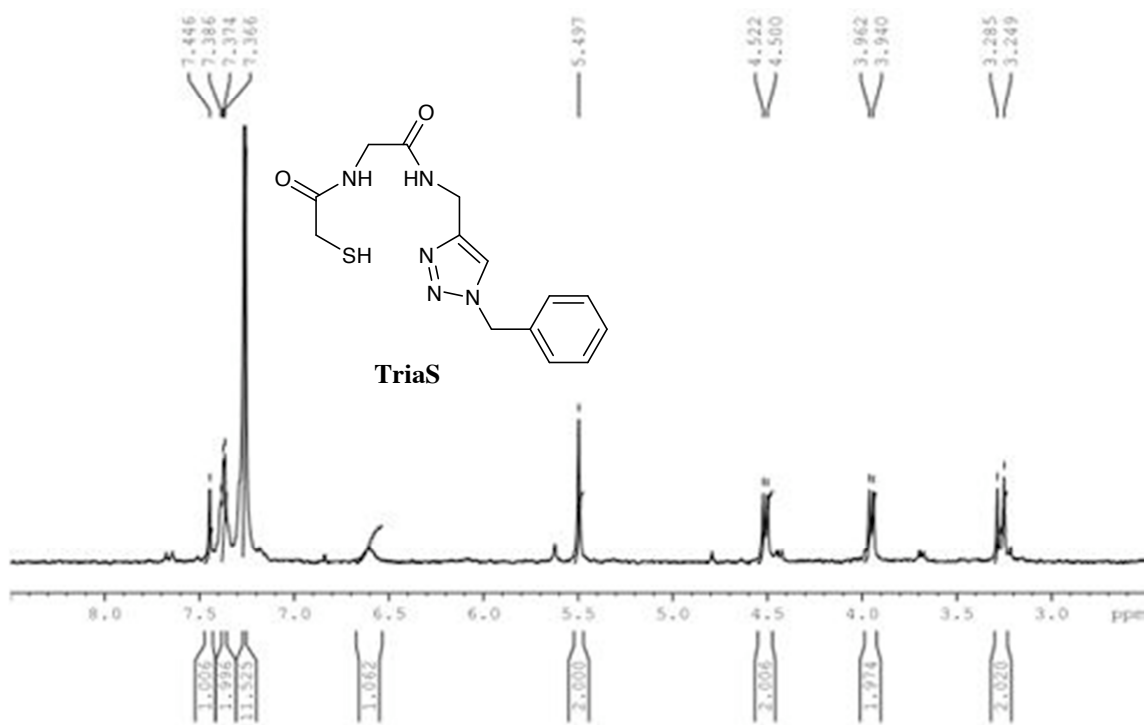


Fig. III.14.: Spectres RMN ^1H de TriaS (CDCl_3)

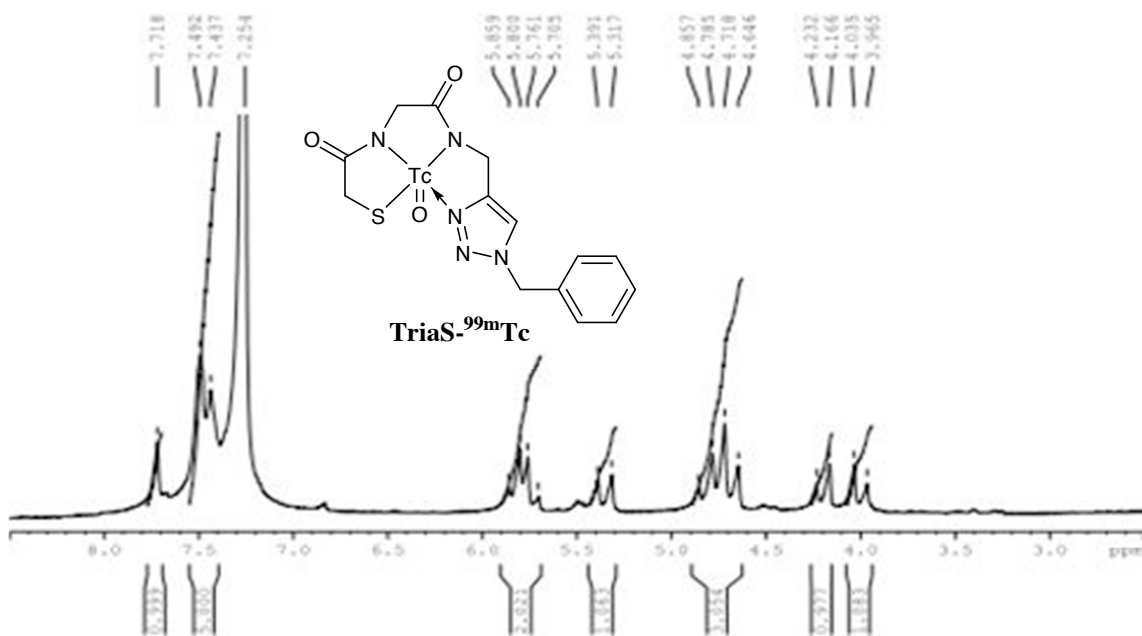


Fig. III.15.: Spectres RMN ^1H de TriaS et de TriaS- $^{99\text{m}}\text{Tc}$

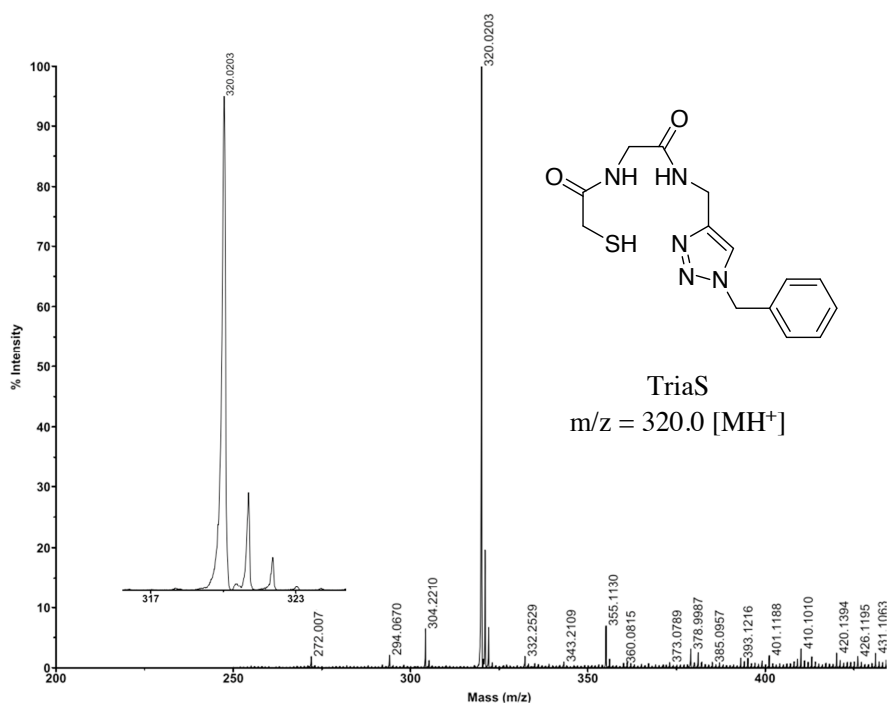


Fig. III.16. : Spectres de masse (MALDI-TOF) de TriaS

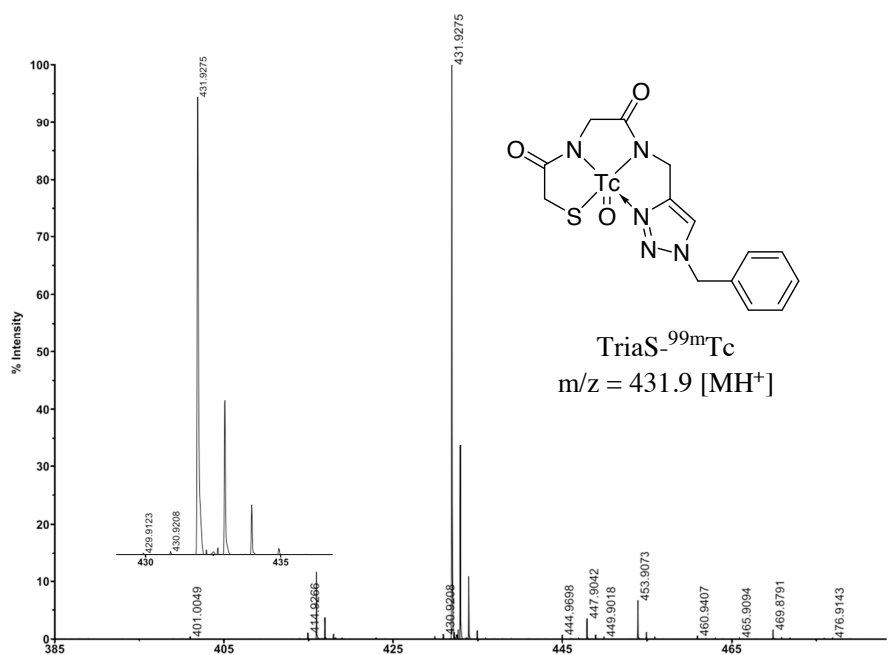


Fig. III.17. : Spectres de masse (MALDI-TOF) de TriaS (à gauche) et TriaS-^{99m}Tc (à droite).

III.4 Etude *in vivo* de Trias-Tc

Afin de compléter notre évaluation du complexe Trias-^{99m}Tc, nous en avons réalisé une étude *in vivo* chez la souris saine dans le but d'évaluer le comportement du traceur et sa biodistribution. En effet, les études précédemment réalisées sur des complexes du cœur oxotechnétiums avec des ligands similaires à Trias mais comportant un noyau pyridyle à la place du triazole ont révélé une rétention élevée du complexe dans les tissus, et une élimination lente du sang. En outre ces complexes étaient éliminés essentiellement par voie hépatobiliaire. Dans le cas de ligands à noyau imidazole, cette rétention dans les tissus s'est avérée être bien moindre et le complexe était éliminé beaucoup plus rapidement du sang [22]. Il était donc impossible de tirer des conclusions générales sur ce type de complexes et d'anticiper les résultats *in vivo* de Trias-^{99m}Tc. Nous avons donc réalisé une étude de la biodistribution de ce complexe chez la souris ainsi qu'une acquisition de clichés « full body » afin de caractériser la rétention dans les tissus et le sang et d'identifier la voie d'élimination de Trias-^{99m}Tc.

III.4.1. Biodistribution

L'étude de biodistribution du complexe Trias-^{99m}Tc a été réalisée sur un lot de 3 souris Balb-C femelles, lignée régulièrement utilisée lors d'études en modèle tumoral (tumeur xénogreffée sur des souris athymiques Balb-C Nu/Nu). Afin d'évaluer précisément l'influence de la complexation par le ligand Trias par rapport à du technétium libre réduit, la même étude a été réalisée après injection de ^{99m}Tc-réduit (^{99m}TcO³⁺) dans les mêmes conditions en l'absence de ligand. Deux heures après injection par voie intraveineuse caudale, les animaux sont sacrifiés par exsanguination et les différents organes sont prélevés, pesés et la radioactivité associée est mesurée par comptage γ .

La figure III.18. représente la biodistribution observée dans chaque cas (Trias-^{99m}Tc et ^{99m}Tc-réduit) deux heures après injection.

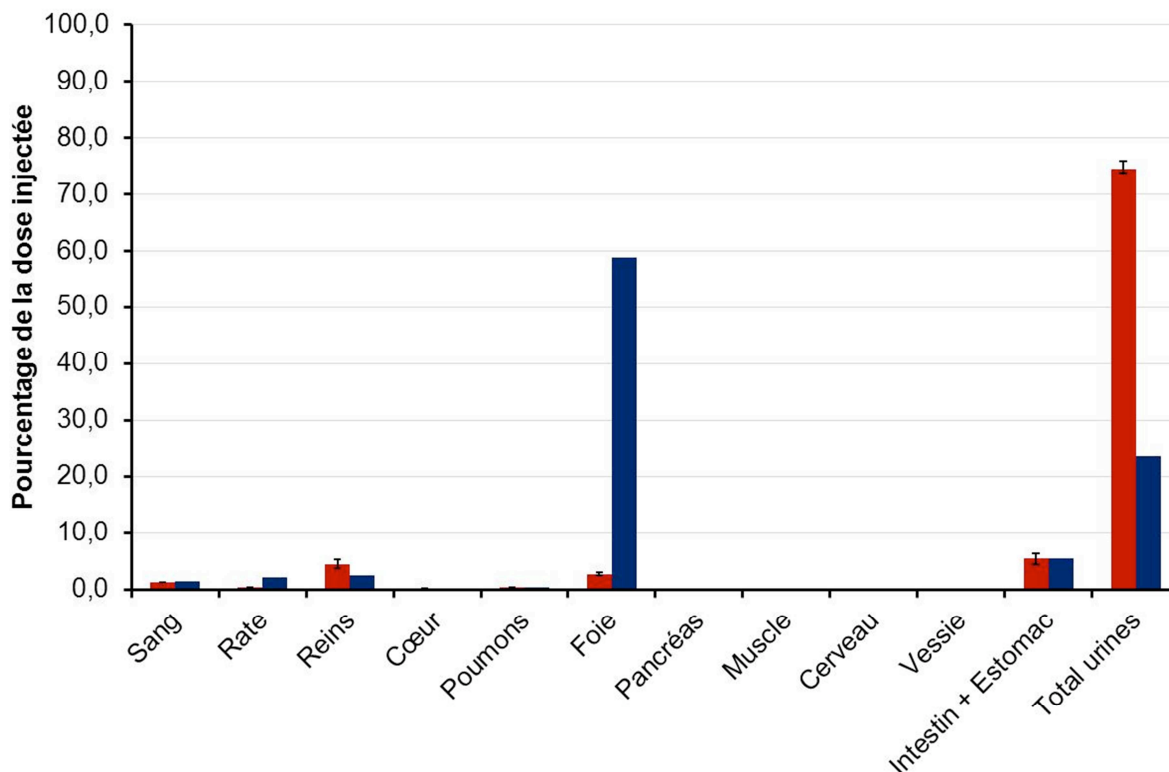


Fig. III.18.: Biodistribution 2h après injection chez la souris (n=3) de Trias-^{99m}Tc (■) et ^{99m}Tc-réduit (■).

On constate que le technétium libre (réduit en l'absence du ligand TriaS) s'accumule essentiellement dans le foie (60%) et l'estomac (5%), ce qui suggère une métabolisation hépatique de $^{99m}\text{TcO}^{3+}$ et de ses éventuels produits de réoxydation. En revanche, dans le cas de Trias-^{99m}Tc, l'activité mesurée dans le foie ne correspond qu'à environ 2% de l'activité injectée. L'essentiel de la dose injectée est récupérée dans les urines et les reins (80% au total). Le complexe semble donc être éliminé essentiellement par voie rénale et ne pas se répartir significativement dans les autres organes fixant habituellement les composés technétiés. Ce résultat est très intéressant car dans de nombreux cas, une part importante de l'activité est observée, quelques heures après injection, dans les organes du tractus gastro-intestinal [1], réduisant ainsi le contraste en imagerie et rendant même difficile voire impossible la visualisation d'une cible située dans la cavité abdominale.

Il convient à nouveau de comparer ces résultats à ceux observés dans le cas de complexes mettant en jeu des ligands à noyau pyridyles et imidazole. Le tableau III.8. présente une comparaison entre les biodistributions de Trias-^{99m}Tc et des complexes de ces deux types [22].

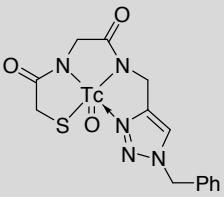
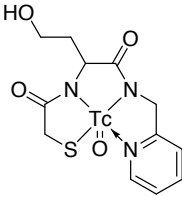
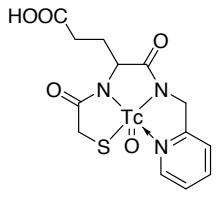
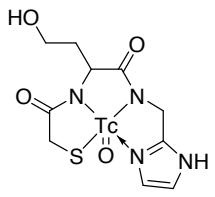
Organe	 TriaS- ^{99m} Tc	 A : Pyr-OH	 A' : Pyr-COOH	 B : Imi-OH
Sang	1.2	17.5	20.5	0.3
Foie	2.7	25.5	10.1	5.0
Reins	4.5	7.9	8.5	0.3
Rate	0.3	0.5	NA	NA
Muscle	0.0	8.6	10.2	0.3
Urine	74.4	24.5 ^(*)	35.2 ^(*)	44.4 ^(*)
Feces	NA	16.9 ^(*)	51.5 ^(*)	46.3 ^(*)
Total excrété	74.4	41.4 ^(*)	86.8 ^(*)	90.6 ^(*)

Tableau. III.8. : Comparaison des biodistributions à 2h de complexes à ligands triazole, pyridyle, et imidazole en pourcentage de la dose injectée (les valeurs d'excrétions marquées par ^(*) correspondent à une mesure effectuée 24h après injection).

On constate que deux heures après injection, les complexes à motifs pyridyles A et A' sont très présents dans le sang, le foie et les muscles. A l'inverse, dans les cas de complexes à ligands imidazoles B, aucune accumulation dans ces organes n'est observée : les complexes à ligands pyridyles ont donc une élimination lente. Ces complexes sont donc moins intéressants car après deux heures, ils conduiront à une visualisation moins efficace de la cible du fait d'un contraste plus faible.

Le complexe TriaS-^{99m}Tc donne des résultats comparables aux complexes à ligands imidazoles du point de vue de la rétention dans les tissus et les organes du tractus gastrointestinal. Nous pouvons aussi remarquer que les complexes à ligands pyridyle sont éliminés beaucoup moins efficacement de l'organisme que les complexes à ligand imidazole ou triazole (TriaS-^{99m}Tc) : après 24h, seule 41% de l'activité injectée a été éliminée de l'organisme. Cette valeur monte à 87% lorsqu'une fonction acide carboxylique est ajoutée à sa structure (A'). Cette donnée confirme qu'il sera possible d'améliorer l'élimination des complexes par l'ajout de groupements hydrophiles par exemple. TriaS-^{99m}Tc se démarque néanmoins de ces analogues puisque près de 75% de l'activité injectée a été éliminée après

seulement deux heures. Enfin, dans le cas de TriaS-^{99m}Tc, le complexe est essentiellement éliminé par voie rénale. Ceci contraste avec les résultats des trois autres complexes présentés pour lesquels 40 à 60 % de l'activité est détectée dans les feces, indiquant une élimination par la voie hépatobiliaire. TriaS-^{99m}Tc apparaît donc comme une structure de complexes très intéressante en comparaison à ses analogues pyridyle et imidazole car il bénéficie d'une faible accumulation dans les tissus et le sang et d'une élimination rénale rapide.

Afin de confirmer cette observation, une 4^{ème} souris ayant reçu le complexe TriaS-^{99m}Tc a été sacrifiée puis congelée afin de réaliser des coupes au microtome. Ces coupes ont ensuite été visualisées après une nuit d'acquisition au β -imager en utilisant le faible caractère émetteur β^- de ^{99m}Tc (E = 2 keV).

Le β -imager est un dispositif permettant de visualiser une émission β^- avec une extrême sensibilité (Fig. III.19.) et une résolution largement supérieure à celle d'une γ -caméra. L'échantillon à analyser est placé dans une chambre (3) dans laquelle circule un gaz (argon 98%, triéthylamine 2%) (4). Dans la chambre d'analyse, deux grilles permettent d'appliquer un fort champ électrique (5). Les particules β^- émises par l'échantillon ionisent le gaz, produisant une lumière ultraviolette détectée par la caméra CCD (8) qui reconstitue une image (source : biospacelab.com).

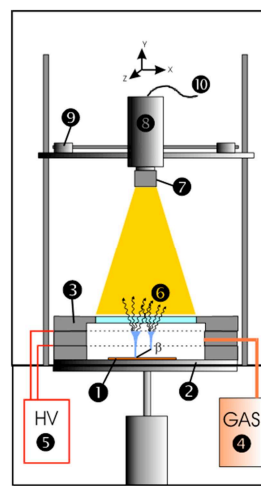


Fig. III.19. : Principe de fonctionnement du β -imager

La figure III.20.gauche. montre l'un des clichés obtenu lors de la visualisation d'une coupe de souris sacrifiée deux heures après injection de TriaS-^{99m}Tc. On y distingue très nettement la forme d'un rein plus lumineuse qui contraste avec le reste du corps. Pour cette mesure, la sensibilité choisie était très élevée, pourtant aucune radioactivité résiduelle significative n'est observée en dehors des reins. Ceux-ci sont donc visibles de façon très nette. A titre de comparaison, la figure III.20.droite. montre le cas d'un complexe présentant une forte accumulation dans les organes du tractus gastrointestinal : le contraste est moins bon et une cible située à proximité d'un de ces organes pourrait ne pas être visible. L'élimination rapide du complexe du milieu circulant est donc un résultat très positif.

Cette observation confirme les résultats de l'étude de biodistribution : le complexe TriaS-^{99m}Tc est donc éliminé très efficacement par voie rénale sans accumulation significative dans d'autres tissus.

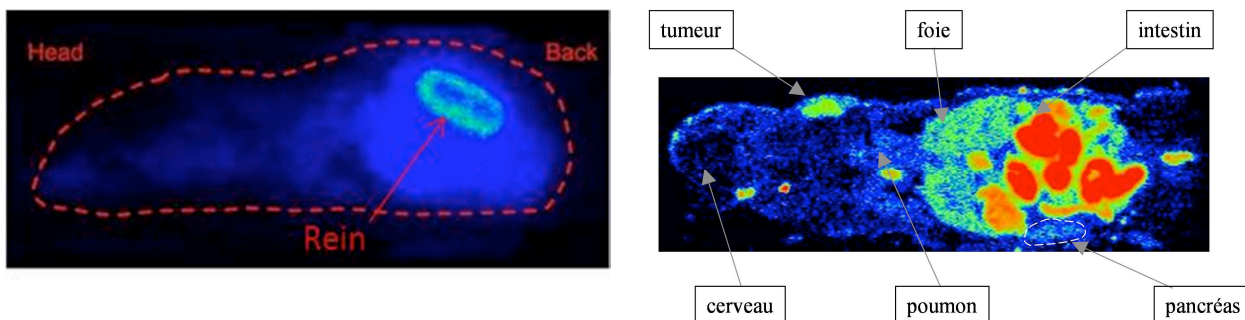


Fig. III.20.: Visualisation au β -imager. A gauche: coupe de souris sacrifiée 2h après injection de TriaS-^{99m}Tc ; A droite : coupe de souris après injection d'un complexe ayant une accumulation résiduelle importante dans les organes du tractus gastro-intestinal.

III.4.2. Analyse des urines

III.4.2.1. Analyse des urines recueillies deux heures après injection

Nous avons donc montré que le complexe TriaS-^{99m}Tc était éliminé chez la souris par voie rénale. Il restait à déterminer si ce complexe était excrété intact ou sous une forme métabolisée. Pour cela, nous avons analysé la composition des urines recueillies chez la souris 2h après injection de TriaS-^{99m}Tc. Les échantillons d'urine ont été neutralisés et injectés en radio-HPLC analytique (fig. III.21.).

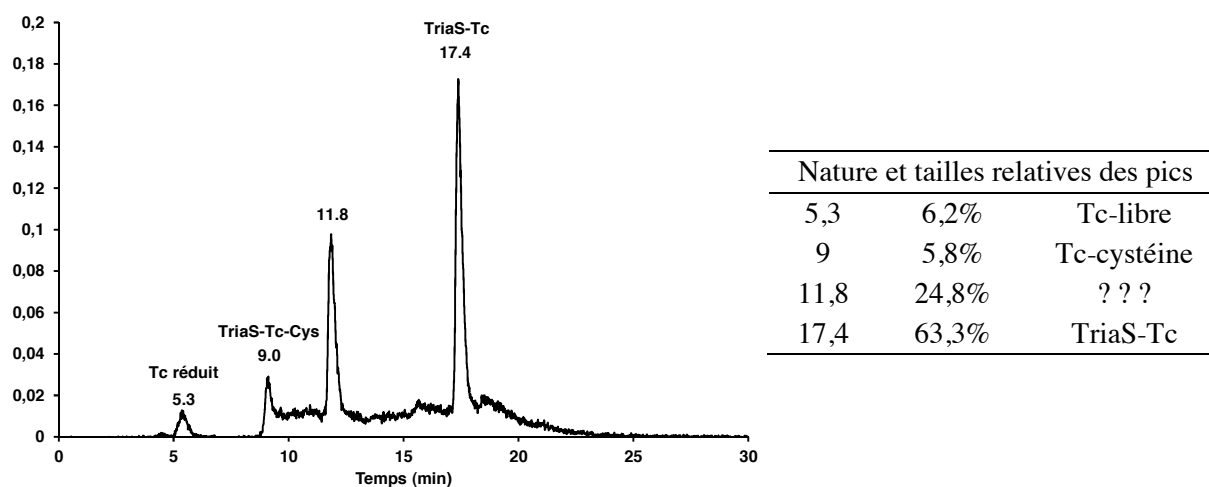


Fig. III.21.: Analyse par Radio-HPLC des urines de souris recueillies 2h après injection.

Il s'avère que plus de 60% de la dose recueillie dans les urines correspond au complexe Trias-^{99m}Tc excrété intact bien que trois autres pics moins importants correspondant à des composés plus hydrophiles soient observés. La majorité du complexe ne semble donc pas subir une quelconque dégradation métabolique. Le pic à environ 5 min (6% environ de la dose recueillie) peut être attribué au technétium libre réduit. A ce stade il restait à caractériser les pics correspondant aux temps de rétention $t = 9$ min et $t = 11.8$ min.

Deux possibilités ont été envisagées pouvant conduire à la formation de ces produits de dégradation. La première correspondait à une dégradation du complexe par un composé tel que la cystéine ou le glutathion endogènes qui sont très présents dans les urines [25, 37]. Cette dégradation interviendrait donc après filtration par les reins et ne serait pas dommageable pour l'efficacité du traceur car elle n'affecterait celui-ci qu'après élimination. La seconde hypothèse consistait en une métabolisation du complexe pouvant intervenir en amont de l'élimination rénale. Afin d'identifier cette voie de dégradation, nous avons effectué des études de stabilité de Trias-^{99m}Tc dans l'urine et dans le sang fraîchement prélevés.

III.4.2.2. Etude de stabilité de Trias-^{99m}Tc en urine de souris saine.

Dans un premier temps nous avons étudié la stabilité de Trias-^{99(m+g)}Tc dans l'urine d'une souris Balb-C de la même lignée que celle utilisée pour réaliser la biodistribution. L'utilisation d'un mélange ^{99m}Tc + ^{99g}Tc a permis de visualiser nettement par radio-HPLC les pics correspondants aux produits de métabolisation grâce à ^{99m}Tc tout en rendant possible leur caractérisation par MALDI-TOF après décroissance des fractions prélevées. Dans ces conditions, on parle de ligand marqué intégralement, Trias-^{99m}Tc étant en concentration nanolaire et Trias-^{99g}Tc en concentration micromolaire.

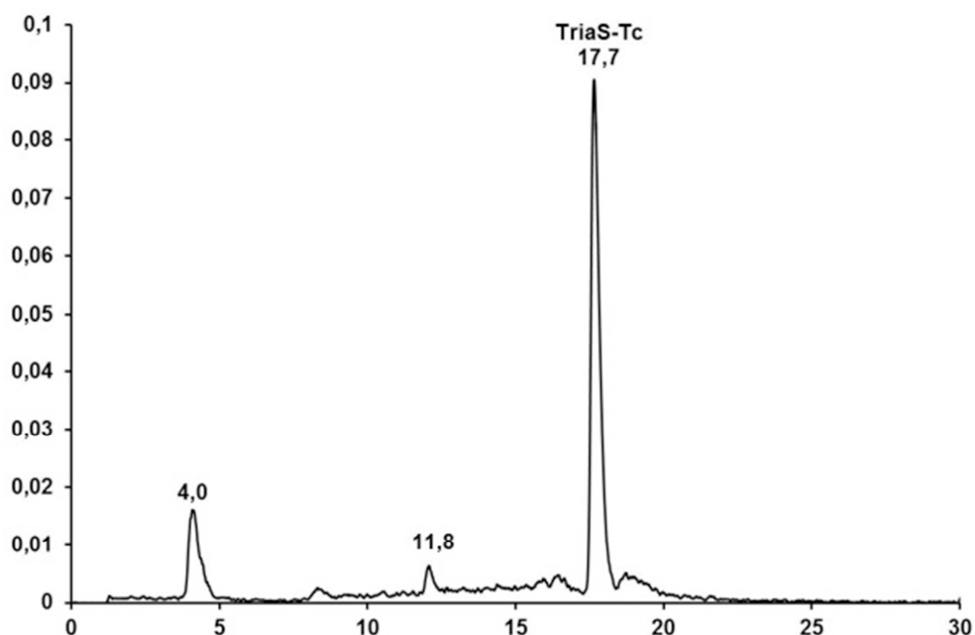


Fig. III.22.: Profil en radio-HPLC du complexe TriaS-^{99(m+g)}Tc après 2h d'incubation dans de l'urine de souris saine à 37°C.

La figure III.22. montre le radiochromatogramme obtenu dans ces conditions. Les quatre pics sont toujours présents dans des proportions différentes. Le composé identifié à 17.7 min s'est avéré avoir une masse $m/z = 432.1$, confirmant ainsi qu'il s'agit bien de TriaS-Tc excrété intact. Les masses des deux autres composés ont pu être déterminées : $m/z = 534.0$ pour le composé observé à 9 min, et deux masses $m/z = 713.3$ et $m/z = 743.3$ pour le composé observé à 11.8 min.

De nombreux travaux décrits dans la littérature rapportent que les complexes de technétium sont sensibles aux thiols endogènes tels que la cystéine [38], l'homocystéine, ou le glutathion [39] qui sont présents dans les reins et les urines ($[Cys] \sim 140 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $[hCys] \sim 6.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ [40]). En effet, nous avons pu constater que TriaS-Tc est très sensible à la transchélation dans un milieu très riche en cystéine. Dans ces conditions il se forme un complexe ayant un temps de rétention de 9 min (voir fig. III.13.).

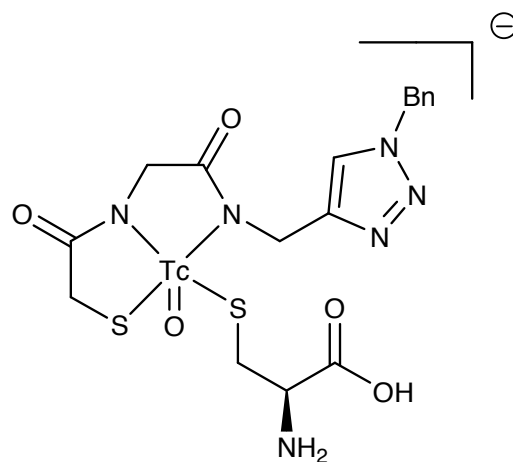


Fig. III.23.: Complexe mixte TriaS-Tc-Cys ($m/z = 534.0$ $[MH^+ - H_2O]$)

Ce résultat, associé à la masse $m/z = 534.0$ déterminée précédemment, suggère la formation d'un complexe mixte TriaS-Tc-Cys dont la structure serait celle indiquée à la figure III.23. Ce composé a une structure très proche des complexes mixtes 3+1 (Cf chapitre 1) qui sont actuellement très étudiés pour le développement de radiopharmaceutiques [1, 41, 42] et sa formation peut avoir entraîné la dégradation partielle de TriaS-^{99m}Tc. La formation d'adduits mixtes dans lesquels le ligand monodentate est un thiol endogène a déjà été observée dans le cas de complexes NS₂/S [23, 43]. Dans le cas présent, le pic correspondant à ce composé mixte après incubation dans l'urine de souris saine est beaucoup moins marqué que celui observé dans les urines après injection à l'animal. Il semble donc que ce composé de dégradation soit plutôt issu d'une métabolisation en amont que d'une dégradation liée à un composant de l'urine.

III.4.3. Etude de stabilité de TriaS-^{99m}Tc dans le sang

En 1999, une étude réalisée sur des complexes mixtes SNS/S a mis en évidence leur stabilité en plasma murin qui contrastait avec la présence d'un complexe de dégradation unique dans les urines. Lors de l'étude de la dégradation du complexe mixte dans le sang, il est apparu que le traceur était complètement dégradé pour conduire à un métabolite coéluant avec le composé observé dans les urines. Cette étude a conclu à une pénétration du complexe dans les érythrocytes où ils subissaient un métabolisme résultant de l'action du glutathion dont les adduits étaient rétrodiffusés hors de la cellule [23]. Cette observation nous a incité à effectuer une étude de stabilité du complexe TriaS-^{99m}Tc dans du sang de souris fraîchement prélevé. Le complexe a été incubé dans le sang à 37°C pendant 2h. A l'issue de cette période d'incubation, l'échantillon a été centrifugé à 1600 tr.min⁻¹ afin de séparer le plasma sanguin des érythrocytes et des autres cellules sanguines. Après précipitation des protéines plasmatiques par la méthode décrite en III.2.1., celui-ci a été analysé par radio-HPLC et les radiochromatogrammes de la figure III.24 ont été obtenus.

On observe la formation d'un produit de dégradation ayant un temps de rétention de

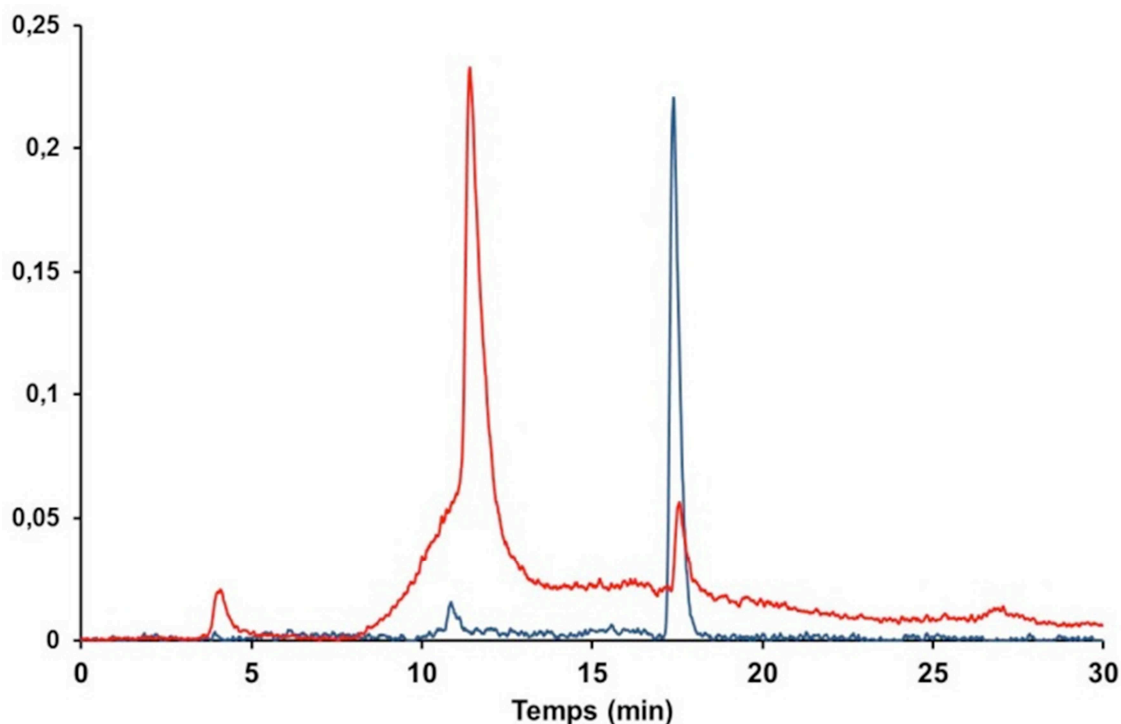


Fig. III.24. : Etude de la stabilité de TriaS-^{99m}Tc dans le sang murin (37°C, 2h).

11.4 min qui semble correspondre au dernier pic visible dans l'urine excrétée. D'après la figure III.24., la dégradation dans le sang semble très importante, le produit de dégradation étant très largement majoritaire après 2h d'incubation. Cependant, dans cette expérience, l'ensemble du complexe reste au contact du sang durant les deux heures d'incubation, il est donc normal d'observer une dégradation bien supérieure. Cette dégradation dans le sang, pourra être mise à profit dans le cas d'une cible protéique extracellulaire, le traceur non lié à la cible étant dégradé et éliminé par voie rénale.

Sans avoir précisément identifié la structure de ce second produit de dégradation, nous avons néanmoins pu en expliquer l'origine, à savoir une dégradation ayant lieu dans le sang. D'après les résultats de l'étude cinétique menée dans le plasma (III.2.1.), celle-ci n'est pas liée à un composant du plasma mais plutôt à une métabolisation par les érythrocytes.

A la lumière de tous ces résultats, et en particulier de l'analyse de la composition des urines recueillies après injection chez la souris saine, il semble que cette dégradation ne compromette pas l'utilisation de la structure TriaS pour la réalisation de traceurs *in vivo*. En effet, plus de 60% de l'activité recueillie dans les urines correspond à ^{99m}Tc-TriaS intact. En outre, la visualisation au β -imager d'une coupe de souris après injection du composé montre

un excellent rapport signal/bruit, les reins apparaissent très nets par rapport au reste de la coupe où très peu d'activité résiduelle apparaît. Ceci montre bien que le ou les complexes de dégradation ne se sont pas accumulés dans un tissu ou au niveau hépatique mais ont été éliminés dans les urines. Ce qui est un résultat très positif.

III.5. Bilan

Dans le cadre de cette étude, nous avons effectué un double criblage de l'ensemble de 12 ligands tétradentates dont la synthèse a été décrite au chapitre II. Une première sélection a été effectuée en fonction de l'aptitude de ces ligands à former, quantitativement et sans nécessiter de purification, un complexe de $^{99m}\text{TcO}^{3+}$. A l'issue de cette première sélection, deux ligands, $^{99m}\text{Tc-1}$ et $^{99m}\text{Tc-11}$ ont été retenus.

Les complexes formés à partir de ces deux ligands ont ensuite été testés pour leur stabilité en plasma murin et comparés à deux complexes références $^{99m}\text{Tc-13}$ et $^{99m}\text{Tc-14}$. Le composé $^{99m}\text{Tc-1}$ (TriaS- ^{99m}Tc), présentant une stabilité en plasma murin de plus de 90% après 6h d'incubation à 37°C a été retenu.

Ce complexe a ensuite été étudié *in vivo* chez la souris saine et s'est avéré être très principalement excrété par voie rénale alors qu'en l'absence de ligand, le technétium libre réduit subit une accumulation hépatique. Ce résultat contraste avec les études réalisées sur des ligands pyridyles et imidazoles qui conduisent à des complexes éliminés beaucoup plus lentement par voie hépatobiliaire. En outre, l'analyse des urines de souris recueillies 2h après injection a révélé que le complexe y est présent intact à hauteur de 65% de la dose injectée.

La présence d'un cycle triazole sur TriaS-Tc présente de nombreux avantages en terme de chimie combinatoire (recherche de lead, optimisation, etc ...) par rapport aux équivalents N_2S_2 , N_3S , pyridyle ou imidazole.

Le complexe TriaS-^{99m}Tc présente donc toutes les propriétés recherchées dans cette étude. De plus, il a été conçu de façon à présenter de nombreuses possibilités de fonctionnalisation (Fig. III.25) et va ainsi pouvoir être utilisé pour développer des traceurs technétiés de diverses cibles thérapeutiques. Une première application est détaillée au chapitre IV dans le cas de l'imagerie de la néoangiogenèse tumorale via le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

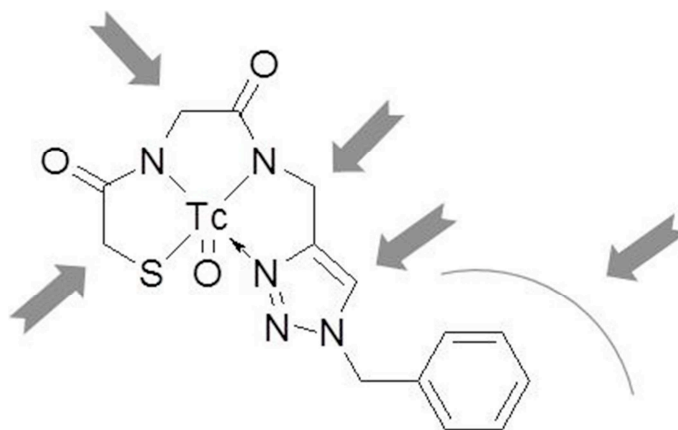


Fig. III.25.: Possibilités de fonctionnalisation de la structure TriaS-^{99m}Tc

III.6. Bibliographie

1. Aufort, M., et al., *Synthesis, in vitro screening and in vivo evaluation of cyclic RGD analogs cyclized through oxorhenium and oxotechnetium coordination*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2011. **46**(5): p. 1779-1788.
2. Aufort, M., et al., *Oxorhenium-Mediated Assembly of Noncyclic Selective Integrin Antagonists: A Combinatorial Approach*. ChemBioChem, 2011. **12**(4): p. 583-592.
3. Aufort, M., et al., *Synthesis and biochemical evaluation of a cyclic RGD oxorhenium complex as new ligand of $\alpha_v\beta_3$ integrin*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **44**(9): p. 3394-3401.
4. Wong, E., et al., *Rhenium(V) and Technetium(V) Oxo Complexes of an $N_2N'S$ Peptidic Chelator: Evidence of Interconversion between the Syn and Anti Conformations*. Inorganic Chemistry, 1997. **36**(25): p. 5799-5808.
5. Gourni, E., et al., *Structural Assessment and Biological Evaluation of Two N_3S Bombesin Derivatives*. Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **52**(14): p. 4234-4246.
6. Fragozeorgi, E.A., et al., *Spacer Site Modifications for the Improvement of the in Vitro and in Vivo Binding Properties of $^{99m}\text{Tc-N}_3\text{S-X-Bombesin}[2-14]$ Derivatives*. Bioconjugate Chemistry, 2009. **20**(5): p. 856-867.
7. Fritzberg, A.R., et al., *Synthesis and Biological Evaluation of Technetium-99m MAG_3 as a Hippuran Replacement*. Journal of Nuclear Medicine, 1986. **27**(1): p. 111-116.
8. Sanchez, O.C., et al., *^{99m}Tc Complexes with activated ester functions; ligands comprising a 3,4-diamino-benzoate backbone*. Nuclear Medicine and Biology, 2006. **33**(3): p. 381-390.
9. Vanbilloen, H.P., et al., *RP-HPLC separation of the diastereomers of technetium-99m labelled tropanes and identity confirmation using radio-LC-MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003. **32**(4-5): p. 663-668.
10. Zhu, Z., et al., *A novel and simplified route to the synthesis of N_3S chelators for ^{99m}Tc labeling*. Nuclear Medicine and Biology, 2001. **28**(6): p. 703-708.
11. Liu, G., et al., *Improving the Labeling of S-Acetyl NHS- MAG_3 -Conjugated Morpholino Oligomers*. Bioconjugate Chemistry, 2002. **13**(4): p. 893-897.
12. Okarvi, S.M., *Synthesis, radiolabeling and in vitro and in vivo characterization of a technetium-99m-labeled alpha-M2 peptide as a tumor imaging agent*. The Journal of Peptide Research, 2004. **63**(6): p. 460-468.
13. Blok, D., et al., *New chelation strategy allows for quick and clean ^{99m}Tc -labeling of synthetic peptides*. Nuclear Medicine and Biology, 2004. **31**(6): p. 815-820.
14. Cantorias, M.V., et al., *MO Tripeptide Diastereomers ($M = ^{99/99m}\text{Tc}$, Re): Models To Identify the Structure of ^{99m}Tc Peptide Targeted Radiopharmaceuticals*. Inorganic Chemistry, 2007. **46**(18): p. 7326-7340.
15. Baidoo, K.E., et al., *Design, Synthesis, and Initial Evaluation of High-Affinity Technetium Bombesin Analogues*. Bioconjugate Chemistry, 1998. **9**(2): p. 218-225.

16. Weber, R.W., et al., *Enhanced kidney clearance with an ester-linked ^{99m}Tc -radiolabeled antibody Fab'-chelator conjugate*. *Bioconjugate Chemistry*, 1990. **1**(6): p. 431-437.
17. Vanbilloen, H.P., et al., *Complexes of technetium-99m with tetrapeptides, a new class of ^{99m}Tc -labelled agents*. *Nuclear Medicine and Biology*, 1995. **22**(3): p. 325-338.
18. Cyr, J.E., et al., *Technetium(V) Oxo Complexes of Substituted Propylene Diamine Dioxime (PnAO) Ligands: Water-Dependent Interconversion between Syn and Anti Isomers*. *Inorganic Chemistry*, 2001. **40**(14): p. 3555-3561.
19. Le Gal, J., et al., *Design and synthesis of a novel family of semi-rigid ligands: versatile compounds for the preparation of ^{99m}Tc radiopharmaceuticals*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2004. **2**(6): p. 876-883.
20. Canney, D.J., et al., *Dicarboxylate diamide dimercaptide (N_2S_2) technetium-99m complexes: synthesis and biological evaluation as potential renal radiopharmaceuticals*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1993. **36**(8): p. 1032-1040.
21. Aufort, M., *Chimiothèques de complexe du technétium et du rhénium ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$: développement de traceurs pour la détection précoce de la néoangiogenèse tumorale*. Thèse de Doctorat, 2008.
22. Rajagopalan, R., et al., *Preparation, Characterization, and Biological Evaluation of Technetium(V) and Rhenium(V) Complexes of Novel Heterocyclic Tetradentate N_3S Ligands*. *Bioconjugate Chemistry*, 1997. **8**(3): p. 407-415.
23. Nock, B.A., et al., *Glutathione-Mediated Metabolism of Technetium-99m SNS/S Mixed Ligand Complexes: A Proposed Mechanism of Brain Retention*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1999. **42**(6): p. 1066-1075.
24. Neirinckx, R.D., et al., *The Retention Mechanism of Technetium-99m-HM-PAO: Intracellular Reaction with Glutathione*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1988. **8**(S1): p. S4-S12.
25. Timerbaev, A.R., et al., *Interactions of Antitumor Metallodrugs with Serum Proteins: Advances in Characterization Using Modern Analytical Methodology*. *Chemical Reviews*, 2006. **106**(6): p. 2224-2248.
26. Ercan, M.T., et al., *^{99m}Tc -citrate versus ^{67}Ga -citrate for the scintigraphic visualization of inflammatory lesions*. *Nuclear Medicine and Biology*, 1993. **20**(7): p. 881-887.
27. Hughes, D.K., *Nuclear Medicine and Infection Detection: The Relative Effectiveness of Imaging with ^{111}In -Oxine-, ^{99m}Tc -HMPAO-, and ^{99m}Tc -Stannous Fluoride Colloid-Labeled Leukocytes and with ^{67}Ga -Citrate*. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 2003. **31**(4): p. 196-201.
28. Kratz, F., *Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles*. *Journal of Controlled Release*, 2008. **132**(3): p. 171-183.
29. Wu, S.T., et al., *A strategy for liquid chromatography/tandem mass spectrometry based quantitation of pegylated protein drugs in plasma using plasma protein precipitation with water-miscible organic solvents and subsequent trypsin digestion to generate surrogate peptides for detection*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011. **25**(2): p. 281-290.

30. Ma, J., et al., *Comparison of ethanol plasma-protein precipitation with plasma ultrafiltration and trichloroacetic acid protein precipitation for the measurement of unbound platinum concentrations*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1996. **38**(4): p. 391-394.
31. Marney, L.C., et al., *Isopropanol Protein Precipitation for the Analysis of Plasma Free Metanephrines by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. *Clin Chem*, 2008. **54**(10): p. 1729-1732.
32. Sivaraman, T., et al., *The Mechanism of 2,2,2-Trichloroacetic Acid-Induced Protein Precipitation*. *Journal of Protein Chemistry*, 1997. **16**(4): p. 291-297.
33. Sengupta, S., et al., *Albumin Thiolate Anion Is an Intermediate in the Formation of Albumin-S-S-Homocysteine*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(32): p. 30111-30117.
34. Pastore, A., et al., *Determination of Blood Total, Reduced, and Oxidized Glutathione in Pediatric Subjects*. *Clin Chem*, 2001. **47**(8): p. 1467-1469.
35. Samuelsson, M., L. Vainikka, and K. Öllinger, *Glutathione in the blood and cerebrospinal fluid: a study in healthy male volunteers*. *Neuropeptides*, 2011. **45**: p. 287-292.
36. Le Gal, J., *Nouveaux radiopharmaceutiques de ^{99m}Tc: de la conception à l'évaluation biologique*. Thèse de doctorat, 2004.
37. Ševčíková, P. and Z. Glatz, *Specific determination of cysteine in human urine by capillary micellar electrokinetic chromatography*. *Journal of Separation Science*, 2003. **26**(8): p. 734-738.
38. Stalteri, M.A., et al., *Comparison of the Stability of Technetium-Labeled Peptides to Challenge with Cysteine*. *Bioconjugate Chemistry*, 1998. **10**(1): p. 130-136.
39. Clavaud, C., et al., *Dynamic Combinatorial Self-Assembly of Cyclophilin hCyp-18 Ligands through Oxorhenium Coordination*. *ChemBioChem*, 2008. **9**(11): p. 1823-1829.
40. Rafii, M., et al., *High-throughput and simultaneous measurement of homocysteine and cysteine in human plasma and urine by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. *Analytical biochemistry*, 2007. **371**: p. 71-81.
41. Clavaud, C., et al., *Combinatorial Self-Assembly of Cyclophilin hCyp-18 Ligands through Rhenium Coordination*. *ChemBioChem*, 2006. **7**(9): p. 1352-1355.
42. Hom, R.K. and J.A. Katzenellenbogen, *Synthesis of a Tetradentate Oxorhenium(V) Complex Mimic of a Steroidal Estrogen*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1997. **62**(18): p. 6290-6297.
43. Syhre, R., et al., *Stability versus reactivity of "3+1" mixed-ligand technetium-99m complexes in vitro and in vivo*. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 1998. **25**(7): p. 793-796.

Chapitre III – Partie expérimentale

Les procédures générales sont regroupées en annexe, en particulier les techniques de purification (RP-HPLC) et analyse (RMN, RP-HPLC), ainsi que les conditions des études *in vitro* et *in vivo*.

IIIe.1. Préparation des complexes $^{99m}\text{Tc-1}$ à $^{99m}\text{Tc-14}$

Dans un ependorf, sont ajoutés dans cet ordre : 20 μL de ligand à 1 mg/mL (20 μg , 62.6 nmol dans le cas de **TriaS**), 80 μL d'eau mQ, 35 μL de SnCl_2 à 1 mg/mL préparée extemporanément (35 μg , 184.2 nmol, 3.0 équiv.), 70 μL de soude 0.1M, et 75 μL de solution de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ fraîchement éluee du générateur. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, la solution est neutralisée par ajout de 7.1 μL de solution de HCl 1M et analysée par RP-HPLC analytique (gradient : 0-100%B en 30 min, A = H_2O + 0.1% TFA, B = ACN + % TFA).

IIIe.2. Etude *in vitro* des complexes

Les complexes $^{99m}\text{Tc-1}$, $^{99m}\text{Tc-11}$, $^{99m}\text{Tc-13}$, et $^{99m}\text{Tc-14}$ sont préparés comme indiqué au IIIe.1. La préparation du plasma murin frais est détaillée en annexe.

IIIe.2.1. Etude cinétique

Le plasma est préalablement placé à 37°C. A t = 0 min, une solution test est réalisée en ajoutant 50 μL de solution de complexe préparée d'après le protocole décrit au IIIe.1 (4.92 MBq dans le cas de $^{99m}\text{Tc-1}$ (**TriaS- ^{99m}Tc**)) à 450 μL de plasma. Le mélange est homogénéisé et un premier

échantillon de 50 μL est prélevé ($t = 0$ min). Cet échantillon est versé dans 150 μL de solution de TFA 10%. On observe la précipitation des protéines du plasma. Après centrifugation durant 5 minutes, le surnageant est séparé du précipité et l'activité de chacun d'eux est mesurée. 50 μL de surnageant sont dilués dans 150 μL d'eau et injectés en radio-RP-HPLC analytique (gradient : 0-100%B en 30 min, A = H₂O + 0.1% TFA, B = ACN + 0.1 % TFA).

La même procédure est répétée pour $t = 30$ min, 1h, 2h, 4h et 6h. et l'aire du pic correspondant au complexe est évaluée. Le rapport de cette aire avec celle mesurée à $t = 0$ min permet d'obtenir les courbes de stabilité. Cette étude est réalisée en duplicate.

IIIe.2.2. Effet de la concentration en Trias-^{99m}Tc sur le palier cinétique

Le plasma est préalablement conditionné à 37°C. Une gamme d'échantillons de plasma dans laquelle la concentration en complexe varie est préparée en mélangeant dans des ependorfs « low bind » respectivement 30 μL , 20 μL , 10 μL , 5 μL , et 2 μL de solution de complexe préparée dans les conditions décrites au IIIe.1 à 70 μL , 80 μL , 90 μL , 95 μL , et 98 μL de plasma.

Plasma (μL)	Solution de complexe (μL)	Facteur de dilution
70	30	0.3
80	20	0.2
90	10	0.1
95	5	0.05
98	2	0.02

Tableau IIIe.1 : Facteur de dilution de la solution de complexe dans le plasma

A $t = 0$ min, 50 μL de mélange sont prélevés et versés dans 150 μL de solution de TFA (10%). Les protéines du plasma précipitent. Après 5 minutes de centrifugation, surnageant et précipité sont séparés et leurs activités sont mesurées. 50 μL de surnageant sont alors dilués dans 150 μL d'eau et injectés en RP-HPLC analytique (gradient : 0 - 100%B en 30 min, A = H₂O + 0.1%

TFA, B = ACN + 0.1 % TFA). La même procédure est répétée à $t = 2\text{h}$ pour chacun des échantillons.

Pour chaque échantillon, le pourcentage résiduel de complexe après 2h en plasma murin à 37°C est évalué par le rapport des aires des pics complexe à $t = 0\text{ min}$ et $t = 2\text{h}$. Cette étude est réalisée en duplicate.

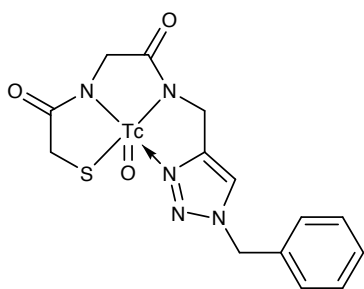
IIIe.2.3. Etude de la compétition par la cystéine

Une solution de complexe **Trias**-^{99m}Tc est préparée dans les conditions décrites au IIIe.1.

La solution test est préparée en diluant 25 μL de solution de **Trias**-^{99m}Tc et 25 μL de solution de cystéine (10 mM dans l'HEPES (35 nM, pH = 7.8)) dans 200 μL d'HEPES. Dans ces conditions $[\text{Cys}] \sim 10^6 [\text{Trias-}^{99\text{m}}\text{Tc}]$. Une solution témoin est réalisée en diluant 25 μL de solution de **Trias**-^{99m}Tc dans 225 μL . Les deux solutions sont incubées pendant 2h à 37°C.

A $t = 2\text{h}$, un volume de 50 μL de chaque solution est prélevé, ajouté à 150 μL d'eau et analysé par radio-HPLC analytique (gradient : 0-100%B en 30 min, A = H₂O + 0.1% TFA, B = ACN + % TFA)

IIIe.3. Préparation et caractérisation du complexe **Trias**-^{99g}Tc



La solution de Na^{99g}TcO₄ est dosée par UV : $\epsilon = 6220\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 245 nm. Le ligand **Trias** (5 mg, 15.6 μmol) est dissous dans 25 mL d'eau. SnCl₂ (46.0 μmol , 3.0 équiv., 8.75 mL d'une solution aqueuse à 0.1 mg/mL), la soude (17.5 mL de solution aqueuse molaire) puis Na^{99g}TcO₄ (2.1 mL d'une solution à 7.5 mM) sont ajoutés et le mélange est agité à température

ambiante pendant 5 minutes. On observe une légère coloration jaune. Après purification par RP-HPLC semi-préparative ($t_R = 19.8\text{ min}$), et lyophilisation, le complexe **Trias**-^{99g}Tc est obtenu. 1.9 mg (4.4 μmol , 28.2%). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ 7.72 (s, 1H, CH-N-N=N), 7.49 (m, 5H, Ph), 5.78 (dd, J = 26 Hz, J' = 14 Hz, 2H), 5.35 (d, J = 18 Hz, 2H), 4.75 (m, 3H), 4.10 (dd, J = 50 Hz, J' = 17 Hz, 1H).; ¹³C NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ 174.6 (CH₂-C=C), 135.9 – 128.9 (CH Ar

+ CH₂-C=C), 62.1 (CH₂, Bn), 50.8 (N-CH₂-CO), 47.4 (CH₂-C=C), 25.1 (S-CH₂-CO) ; **ES/MS (mode positif)** : m/z = 431.9 (MH⁺, 100%), 453.9 (MNa⁺, 7.2%), 469.9 (MK⁺, 1.8%).

IIIe.4. Etude *in vivo* de TriaS-^{99m}Tc

IIIe.4.1. Biodistribution

L'étude de biodistribution de TriaS-^{99m}Tc est réalisée sur 4 souris Balb-C femelles de 20 à 25g). La solution de TriaS-Tc est préparée dans les conditions décrites précédemment puis filtrée sur Sep-Pak Light QMA (Waters).

Un volume V = 100 μL est injecté à chacune des 4 souris (7.8 MBq en moyenne) par voie intraveineuse caudale. Après 2h, 3 souris sont anesthésiées puis sacrifiées par exsanguination, les liquides biologiques ainsi que les différents organes sont prélevés, pesés et leur activité est mesurée. Les activités résiduelles dans la carcasse et la queue sont également mesurées.

La 4^{ème} souris est anesthésiée puis sacrifiée par congélation à -80°C. Des coupes « full body » sont réalisées au microtome et visualisées au β-imager (Biospace β-imager 2000, 24h d'acquisition).

IIIe.4.2. Analyse des urines

IIIe.4.2.1. Etude de stabilité de TriaS-^{99m}Tc en urine de souris saine

L'étude est réalisée sur deux souris Balb-C femelles (20 à 25g) de la même lignée que celles utilisées au IIIE.4.1. TriaS-^{99m}Tc est préparé dans les conditions décrites précédemment puis la solution est filtrée sur Sep-Pak Light QMA (Waters). Un volume V = 100 μL est injecté à chacune des 2 souris et celles-ci sont placées dans des cages métaboliques afin de récupérer leurs excréments durant les deux heures de l'étude. Deux heures après injection, les urines sont prélevées. Un échantillon de 200 μL d'urine est neutralisé par ajout de HCL (1M) puis injecté en RP-HPLC analytique (gradient : 0 - 100% B en 30 min, A = H₂O + 0.1% TFA, B = ACN + % TFA)..

IIIe.4.2.2. Etude de stabilité de $\text{TriaS-}^{99(\text{m}+\text{g})}\text{Tc}$ en urine de souris saine

Une solution de $\text{TriaS-}^{99(\text{m}+\text{g})}\text{Tc}$ est préparée en ajoutant successivement dans un ependorf : 20 μL de TriaS à 1 mg/mL (20 μg , 62.6 nmol), 80 μL d'eau mQ, 35 μL de SnCl_2 à 1 mg/mL préparée extemporanément (35 μg , 184.2 nmol, 3.0 équiv.), 70 μL de soude 0.1M, 75 μL de solution $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ fraîchement éluee et 8.4 μL $\text{Na}^{99\text{g}}\text{TcO}_4$ (1.0 équiv.).

De l'urine de souris Balb-C femelle saine (même lignée que celles utilisées dans toutes ces études) est placée à 37°C. La solution test est préparée en ajoutant 10 μL de solution de complexe à 90 μL d'urine puis placée à 37°C. Après 2h d'incubation, le mélange est neutralisé par ajout d'une solution de HCl 1M puis dilué dans 100 μL d'eau avant d'être injecté en radio-RP-HPLC analytique (gradient : 0 - 100% B en 30 min, A = H_2O + 0.1% TFA, B = ACN + % TFA). Cette étude est réalisée en duplicate.

IIIe.4.3. Etude de stabilité de $\text{TriaS-}^{99(\text{m}+\text{g})}\text{Tc}$ dans le sang de souris saine

Une solution de $\text{TriaS-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ est préparée dans les conditions décrites au IIIe.1. Le sang de souris Balb-C utilisé est fraîchement prélevé (une demi-heure avant utilisation).

Un volume de 50 μL de solution de complexe est ajouté à 450 μL de sang. Le mélange est homogénéisé et mis à incubation à 37°C. Après 2h d'incubation, le mélange est centrifugé durant 15 minutes à 1600 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ puis le surnageant est prélevé délicatement. Un volume de 50 μL de ce plasma est alors ajouté à 150 μL de solution de TFA à 10% afin d'entraîner la précipitation des protéines plasmatiques. Après centrifugation pendant 5 min, le surnageant est prélevé. 50 μL de surnageant sont dilués dans 150 μL d'eau puis injectés en radio-RP-HPLC analytique (gradient : 0 - 100% B en 30 min, A = H_2O + 0.1% TFA, B = ACN + % TFA).

Chapitre IV

Illustration du potentiel de TriaS pour la préparation de traceurs ciblant les intégrines

Nous avons précédemment décrit le ligand TriaS qui présente des propriétés particulièrement intéressantes en termes de complexation de ^{99m}Tc et de stabilité *in vitro* et *in vivo* du complexe formé. Dans ce chapitre nous souhaitons montrer le potentiel de la structure TriaS pour la réalisation de traceurs utilisables *in vivo*. Nous nous intéressons ici au développement de traceurs de la néoangiogenèse tumorale qui est l'un des signes les plus précoces de la tumorigenèse afin de développer de nouveaux outils pour l'imagerie moléculaire du cancer.

IV.1. Cancer et angiogenèse

IV.1.1. Le cancer en chiffres

En 2005 dans le monde, 7.6 millions de personnes sont décédés des suites d'un cancer, ce qui représente plus de 13% de l'ensemble des décès enregistrés. Plus de 70% des cancers se

développent dans les pays à faible revenus. Il existe donc une relation entre le niveau de vie et d'hygiène et l'incidence des cancers. En France, en 2005, 320.000 nouveaux cas ont été décelés dont près de 57% chez les hommes (Fig. IV.1. haut). Ce chiffre est deux fois plus élevé qu'en 1980. Cette augmentation est attribuée essentiellement au vieillissement de la population, au développement des méthodes de dépistages (dosages immunologiques, palpation, ...), à la sensibilisation et à la prévention révélant des cas qui n'auraient pas été diagnostiqués il y a 30 ans.

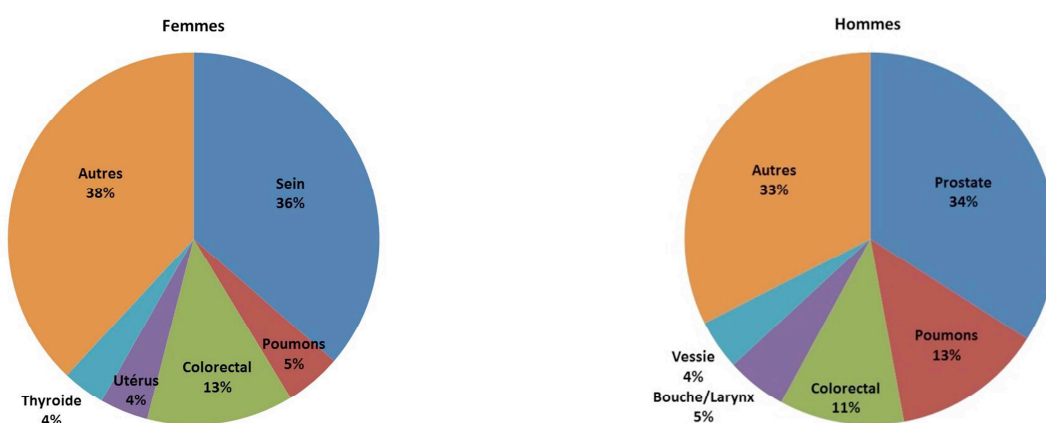


Fig. IV.1.: Incidence des principaux cancers selon le sexe en 2005 en France. Source : arc-cancer.net.

Les taux d'incidence des différents cancers chez l'homme et la femme (Fig. IV.1. bas) indiquent que les cancers les plus répandus chez les deux sexes sont les cancers du sein et de la prostate, ou cancers « hormonaux ». Ces deux cancers, bien que les plus fréquents, ne sont pas les plus mortels car ils ont fait l'objet de campagnes nationales de prévention incitant au dépistage. Leur traitement est en outre plus efficace et le diagnostic plus précoce grâce notamment au dosage du PSA (Prostate Specific Antigen) pour le cancer de la prostate ou la palpation et la mammographie pour le cancer du sein. Les cancers causant le plus grand nombre de décès en France sont le cancer du poumon et le cancer colorectal. Le cancer du poumon touche beaucoup plus souvent les hommes (24.000 nouveaux cas en 2005 contre 7.000 chez la femme) et est

intimement lié à la consommation de tabac. Néanmoins, on note ces dernières années une stagnation du cancer du poumon chez l'homme et une augmentation chez la femme.

D'après l'Institut de Veille Sanitaire, une projection en 2011 permet d'estimer à environ 360.000 le nombre de nouveaux cas en France. Néanmoins, les progrès actuels en termes de dépistage et de traitement permettent d'observer, en France, une diminution de la mortalité par cancer (-1.5% et -0.7% par an respectivement chez l'homme et la femme, Fig. IV.2.). Cette diminution s'explique par un dépistage plus précoce des principaux cancers (poumon, colorectal, et prostate chez l'homme, sein, colorectal chez la femme).

L'Organisation Mondiale pour la Santé estime qu'actuellement, un tiers des cas déclarés de cancer dans le monde pourraient être guéris s'ils étaient détectés suffisamment tôt et traités par les moyens actuels. Ce constat renforce l'intérêt du développement de méthodes de diagnostic précoce de l'apparition de tumeurs conjointement à l'élaboration de thérapies permettant leur traitement. L'imagerie moléculaire, de par sa sensibilité et sa précision s'avère être un outil diagnostique de premier plan.

IV.1.2. Développement des cancers

IV.1.2.a. Les grandes étapes du développement d'un cancer

Un cancer est une prolifération anormale et incontrôlée de certaines cellules d'un organe ou d'un tissu qui deviennent capables de métastaser à distance du foyer primitif. Les cellules

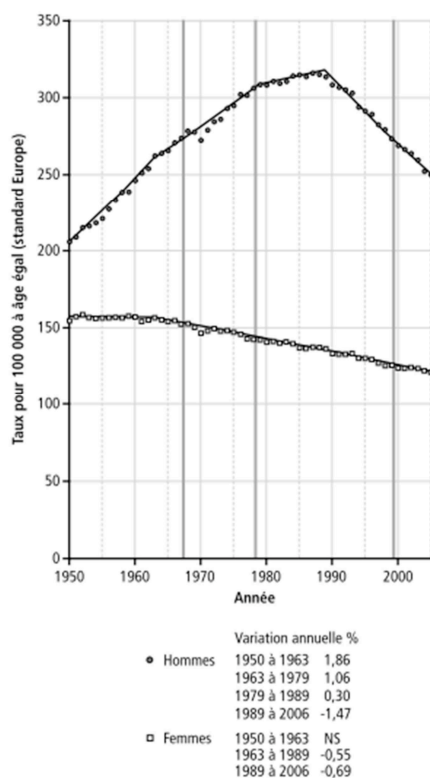


Fig. IV.2.: Evolution de la mortalité par cancer en France de 1950 à nos jours. (Source : Institut de Veille Sanitaire).

cancéreuses ont acquis une résistance aux mécanismes de régulation et de différenciation. Le développement d'un cancer s'articule en plusieurs étapes (Fig. IV.3.).

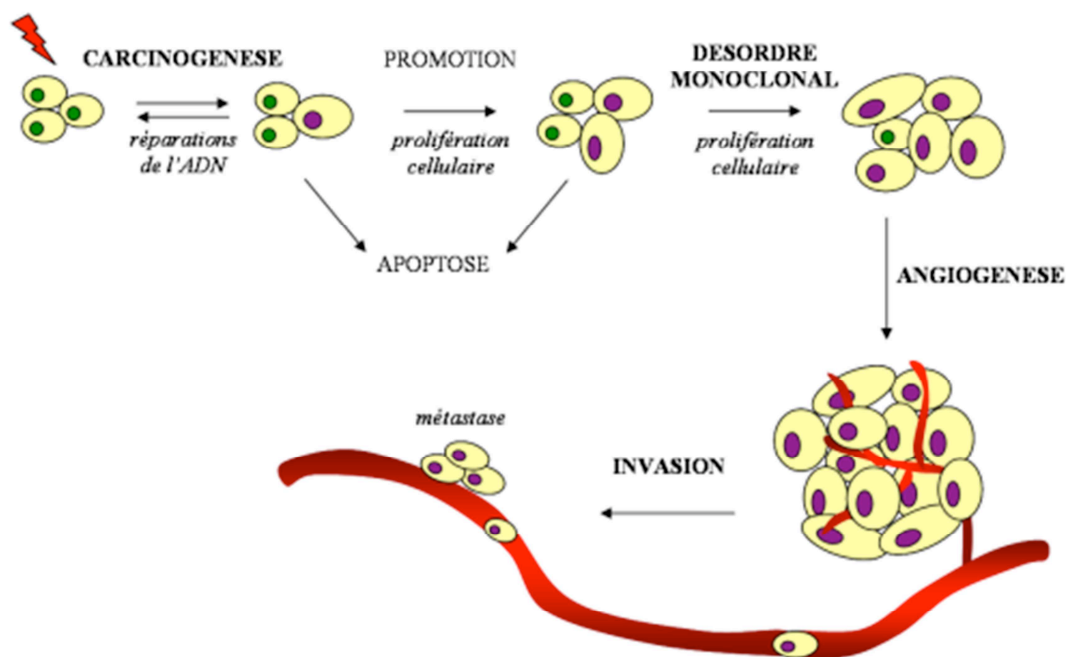


Fig. IV.3. : Les étapes successives du développement d'un cancer.

Dans un premier temps une cellule normale va subir une différenciation pour devenir la première cellule du foyer tumoral : c'est la carcinogénèse. Cette différenciation est l'œuvre d'une ou plusieurs mutations de l'ADN de cette cellule. Ces mutations peuvent être dues à une erreur lors de la réplication de l'ADN ou à l'exposition à des agents mutagènes (produits chimiques, rayonnements...). Ces mutations sont extrêmement fréquentes mais la plupart sont invisibles car l'organisme possède des mécanismes de réparation permettant de corriger la mutation ou d'induire la mort cellulaire (apoptose) de la cellule tumorale. Il arrive néanmoins qu'une de ces cellules parvienne à échapper à ces mécanismes de régulation : l'individu développe alors un cancer.

La cellule tumorale qui n'est plus soumise à la régulation et aux mécanismes anti-prolifératifs va ensuite se développer indéfiniment de façon incontrôlée. C'est la prolifération qui conduit au désordre monoclonal.

Pour se développer ainsi de façon anarchique, la tumeur a besoin de ressources que sont l'oxygène et les nutriments apportés par le sang. La tumeur se développe donc en général au détriment des cellules saines avoisinantes. Au-delà d'un certain volume, l'alimentation en oxygène et nutriments n'est plus suffisante et la tumeur va induire un phénomène d'angiogenèse, c'est-à-dire le développement d'un réseau sanguin nouveau lui permettant d'accroître ses apports. Cette étape est le switch angiogénique.

Dès l'établissement d'une nouvelle vascularisation, des cellules tumorales se désolidarisent du reste de la tumeur et colonisent d'autres tissus via le réseau sanguin. C'est le phénomène d'invasion qui engendre des foyers tumoraux secondaires ou métastases. Ce phénomène peut être passif si les cellules migrent par simple transport sanguin ou actif lorsque la migration est gouvernée par des protéines d'adhésion (comme les intégrines) qui vont régir leur déplacement le long des protéines de la matrice extracellulaire.

IV.1.2.b. La cellule tumorale

Comme nous l'avons vu, une cellule ayant subi une différenciation qui lui confère un caractère tumoral ne répond plus aux signaux censés contrôler sa croissance et aux mécanismes de régulation. Ainsi, une cellule tumorale :

- Génère elle-même ses propres signaux de croissance ;
- Est insensible aux inhibiteurs de croissance cellulaire ;
- Peut se diviser à l'infini : le mécanisme de conservation des télomères la protège de la mort par sénescence ;
- Echappe à la mort cellulaire grâce à l'inactivation des récepteurs des signaux induisant l'apoptose ;
- Est capable d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à son voisinage direct lorsque la tumeur dépasse un certain volume (2 mm^3 environ), c'est la néoangiogenèse tumorale ;

- Peut implanter des foyers tumoraux nouveaux dits secondaires, formant ainsi des métastases.

Tous ces dérèglements, conséquences des mutations observées pendant la carcinogénèse, sont responsables du développement anarchique et incontrôlé de la tumeur. Les deux dernières caractéristiques de la cellule tumorale (induction de l'angiogenèse et formation de métastases) reposent sur des molécules d'adhésion, telles que les intégrines, qui dirigent les interactions cellule – cellule et les interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire. Ainsi les cellules tumorales peuvent recruter des vaisseaux sanguins et coloniser d'autres organes.

La cellule tumorale est donc très différente d'une cellule normale. L'ensemble des mécanismes décrits ci-dessus, y compris ceux intervenant dès les premières étapes du développement tumoral, mettent en jeu des récepteurs, des hormones, des antigènes, qui sont autant de signaux permettant un diagnostic précoce. A titre d'exemple, le dosage de la FSH (Follicle Stimulating Hormone) permet de diagnostiquer 11 types des cancers (dont prostate, sein, colon, pancréas, poumon, ...). D'autres marqueurs sont plus spécifiques de certains cancers : les cancers de la prostate peuvent être détectés par une variation anormale du taux de PSA (Prostate Specific Antigen) dans le sang, le dosage de la TSH (Thyrotropin Stimulating Hormone) permet de mettre en évidence un cancer de la thyroïde, et le dosage de l'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) permet d'identifier un cancer de l'appareil digestif. Tous ces marqueurs tumoraux spécifiques sont détectés dans le sang par des dosages immunologiques à de très faibles concentrations (tableau IV.1.). Ces marqueurs ou récepteurs, s'ils sont exprimés au niveau des cellules tumorales peuvent également faire l'objet d'études en imagerie. C'est le cas par exemple des intégrines comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre.

Marqueur	Tumeur identifiée	Référence
PSA	Prostate	[1, 2]
TSH	Thyroïde	[3, 4]
ACE	Pancréas, foie, estomac, colon	[5, 6]
FSH	Prostate, sein, colon, pancréas, ...	[7]

Tableau IV.1. : Exemples de marqueurs tumoraux

IV.1.2.c. L'angiogenèse tumorale

Nous avons vu que le développement d'une tumeur requiert un apport anormalement élevé en oxygène et en nutriments qui est assuré par le sang. Pour s'assurer un approvisionnement suffisant, la cellule tumorale a la capacité d'induire la formation de vaisseaux sanguins nouveaux. Lorsque la tumeur atteint un volume d'environ 2 mm³, l'oxygène et les nutriments fournis par la vascularisation normale des cellules deviennent insuffisants. Ce phénomène appelé hypoxie engendre la production de facteurs pro-angiogéniques tels que les facteurs de croissance VEGF

(Vascular Endothelial Growth Factor) ou FGF (Fibroblasts Growth Factors) (Fig. IV.4.A.)

et l'inhibition de la sécrétion de facteurs antiangiogéniques [8-10]. Le VEGF va se fixer sur les récepteurs situés sur les cellules endothéliales et induire

la sécrétion de métalloprotéases qui vont alors dégrader la membrane basale des vaisseaux sanguins proches. Les cellules

endothéliales se réorganisent alors sous l'effet de protéines d'adhésion telles que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [11] pour former de nouveaux vaisseaux sanguins dirigés vers la tumeur (Fig.IV.4.B.). Les cellules tumorales peuvent également se dissocier de la tumeur et emprunter ces vaisseaux pour coloniser d'autres tissus formant ainsi des métastases (Fig. IV.4.C.).

L'angiogenèse tumorale est un phénomène essentiel qui intervient très tôt dans le développement des tumeurs. C'est pour cette précocité qu'elle constitue un domaine d'étude important dans le développement de traceurs permettant la mise en évidence des tumeurs à un stade très précoce. Les intégrines qui gouvernent les interactions cellule-cellule et cellule-membrane extra-cellulaire jouent un rôle incontournable dans la mise en place de ce nouveau

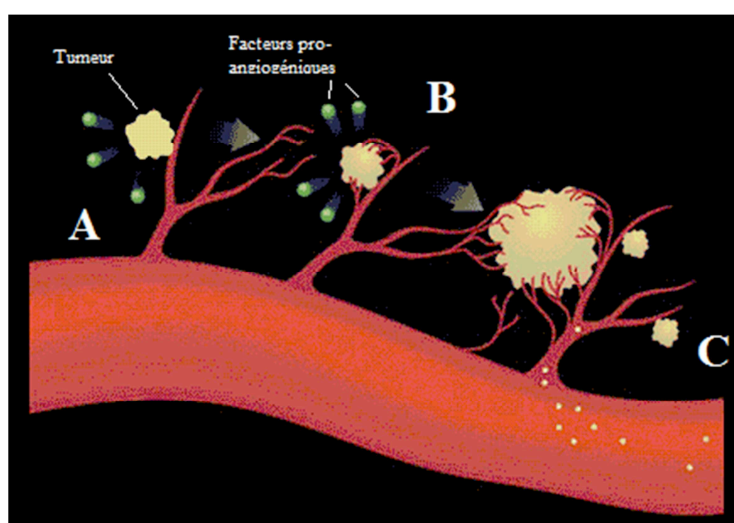


Fig. IV.4. : La néoangiogenèse tumorale : de l'hypoxie à la dissémination.

réseau sanguin au voisinage de la tumeur et constituent donc une cible de choix pour des radiopharmaceutiques, qu'ils soient à visée diagnostique ou thérapeutique.

IV.2. Les intégrines

IV.2.1. Structure

Les intégrines sont des récepteurs membranaires impliqués dans les processus d'adhésion cellulaires. Elles régissent les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extra-cellulaire. Il s'agit de glycoprotéines hétérodimériques intégrales constituées de deux sous-unités α et β reliées de manière non-covalentes. Chaque sous-unité se compose d'un domaine cytoplasmique court sans activité catalytique et d'un long domaine extracellulaire responsable de la liaison aux ligands endogènes. Chez les mammifères, on dénombre 18 sous-unités α et 8 sous-unités β conduisant à 24 combinaisons distinctes. Celles-ci peuvent être classées en familles selon la nature des ligands (Fig. IV.5.). La plus importante famille est celle des récepteurs se liant au tripeptide RGD qui comprend notamment les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, et $\alpha_{IIb}\beta_3$.

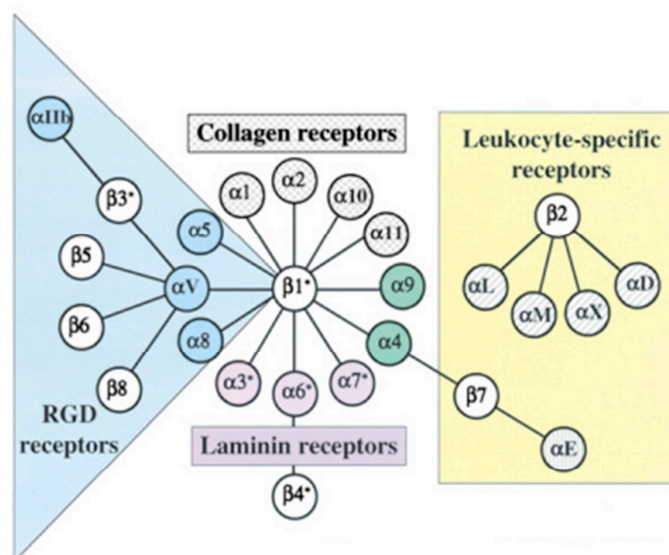


Fig. IV.5. : Les différentes familles d'intégrines

Les intégrines sont des protéines longues de 280 Å environ ayant un poids moléculaire de 240 à 270 kD. Les informations structurales concernant les intégrines sont essentiellement issues d'études en RMN et en microscopie électronique. L'obtention de structures cristallographiques haute résolution est effet rendue très difficile par la fluidité des membranes biologiques. Seules les structures des intégrines $\alpha_v\beta_3$, et $\alpha_{IIb}\beta_3$, partiellement cristallisées, ont été résolues [12]. Il apparait que la partie extracellulaire de la sous-unité α est formée par la répétition à 7 reprises d'un motif de 70 acides aminés variant très peu. Les 4 motifs situés à l'extrémité N-terminale constituent un site nommé αA capable de chélater les cations divalents comme Ca^{2+} ou Mg^{2+} (Fig. IV.6.).

La partie extracellulaire de la sous-unité β est linéaire et se termine par un domaine N-terminal nommé βA , contenant un cation divalent Ca^{2+} , qui vient former une boucle avec αA (head). Le domaine transmembranaire de chaque sous-unité est constitué d'une trentaine d'acides aminés hydrophobes permettant l'ancrage dans la membrane cytoplasmique. Les domaines cytoplasmiques constitués par les extrémités C-terminales sont courts et capables de se lier aux filaments d'actines du cytosquelette. L'ensemble des deux domaines αA et βA constituent le site de fixation des ligands de l'intégrine considérée.

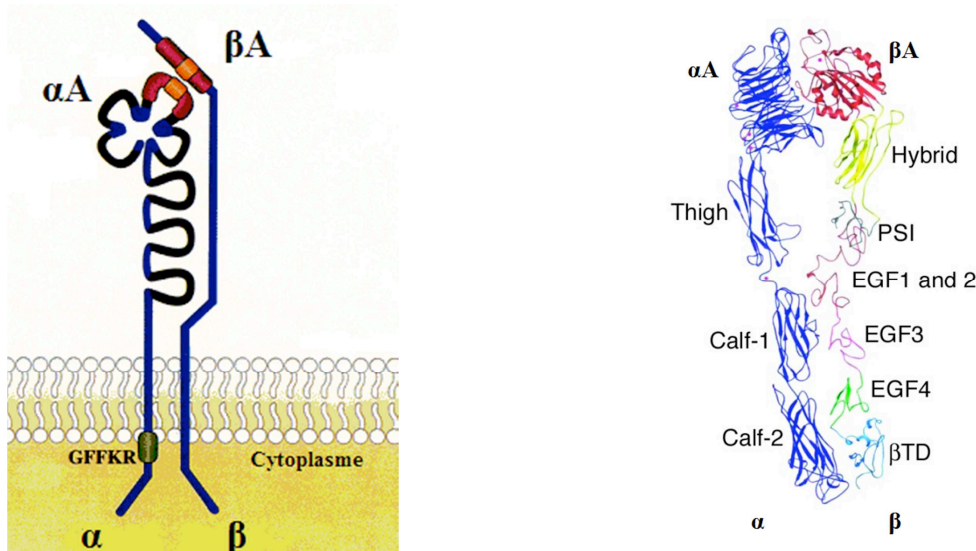


Fig. IV.6.: Structure des intégrines. A gauche : structure schématique générale ; A droite : structure cristalline de la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ [13]

IV.2.2. Rôle des intégrines

Les intégrines sont des protéines d'adhésion qui interviennent dans un grand nombre de mécanismes biologiques de l'individu sain. Leur structure transmembranaire leur permet de participer à la transmission de signaux entre le cytoplasme et la matrice extracellulaire (inside-out) [14] et inversement (outside-in) [15]. Ainsi, l'interaction entre la partie cytoplasmique de l'intégrine et les filaments d'actine peut induire une liaison entre la partie extracellulaire de l'intégrine et la matrice extracellulaire (inside-out). A l'inverse, la liaison de l'extrémité extracellulaire conduit à un phénomène de clusterisation (rassemblement local d'intégrines qui forment un oligomère) permettant la transmission de signaux intracellulaires qui conditionnent entre autres la survie, la mobilité et la polarité cellulaire.

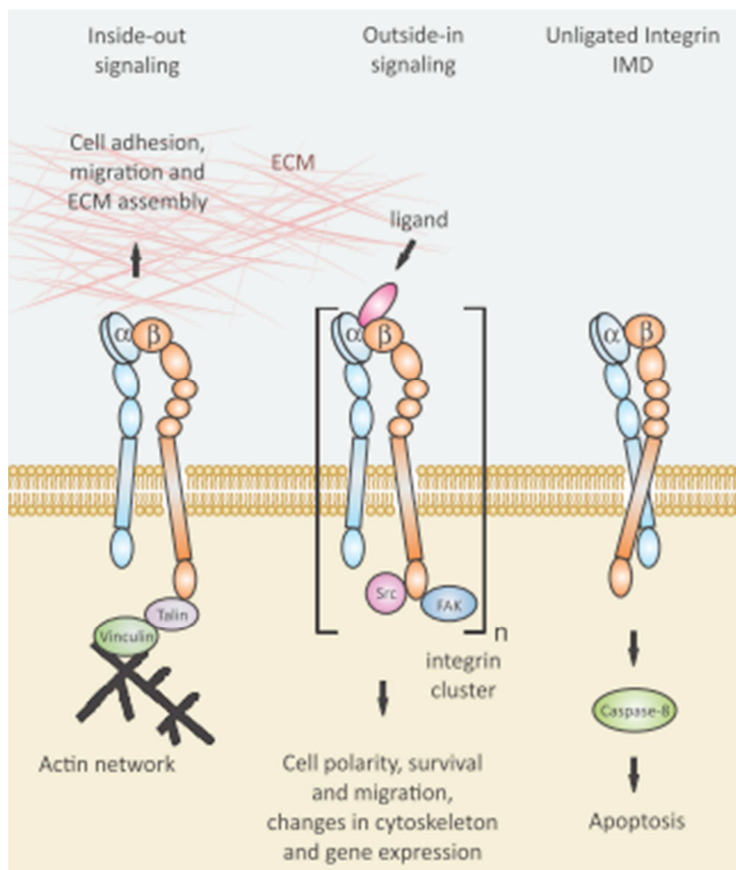


Fig. IV.7. : Illustration du rôle des intégrines dans la transmission des signaux cellulaires [16].

Enfin, des études ont révélé que lorsque l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ n'est plus liée, elle induit la mort cellulaire par apoptose [17]. Ce phénomène est propre aux cellules saines et n'intervient pas pour les cellules tumorales.

Certaines études ont montré que la présence d'intégrines, en particulier $\alpha_v\beta_3$, peut être associée à la formation active de métastases [18, 19]. Contrairement au phénomène passif dans lequel des cellules tumorales colonisent l'organisme portées par le sang, la motilité cellulaire est assurée par la répétition d'activations et de désactivations d'intégrines assurant l'adhésion à l'avant de la cellule en migration, et la supprimant à l'arrière. Ce phénomène de prolifération active dépendant des intégrines permet la migration cellulaire [20].

Les intégrines sont également au cœur des phénomènes angiogéniques. A titre d'exemple, la suppression de l'expression de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ induit des malformations vasculaires graves [21]. Des souris knockout dépourvues de sous-unité α_v ont également été développées pour étudier le rôle de cette sous-unité sur la vascularisation : 80% des embryons n'ont pas survécu, et les individus restants ont succombé suite à des défauts de formation de certains vaisseaux cérébraux [22]. Paradoxalement, d'autres études ont prouvé que suite à la suppression de la sous-unité β_3 , une augmentation de l'angiogenèse pouvait être observée dans certains cas suite à une augmentation de la sensibilité des cellules endothéliales aux facteurs de croissance dont VEGF [23]. Il semble donc que le rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans l'angiogenèse soit beaucoup plus complexe qu'une simple induction. Elle peut apparemment jouer le rôle de régulateur positif ou négatif de l'angiogenèse selon la structure du substrat auquel elle se lie.

Le profil d'expression en intégrines varie selon le type de cellule, et pour un même type de cellule on observe une variation selon le cycle cellulaire et en fonction de signaux venus de l'extérieur. Un type d'intégrine peut être prédominant dans les cellules d'un tissu et absent dans d'autres. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est ainsi surexprimée au niveau de certaines tumeurs où elle induit la néoangiogenèse indispensable à leur survie alors qu'elle est très peu présente dans les tissus sains. Le tableau IV.2. indique les profils d'expression en intégrines de diverses tumeurs et des métastases associés [24].

Cancer	Foyer tumoral principal	Métastases
Sein	NA	$\alpha_1\beta_1 / \alpha_6\beta_1 / \alpha_v\beta_1$
Colon	NA	$\alpha_5\beta_1 / \alpha_6\beta_4$
Rein	$\alpha_3\beta_1$	$\alpha_5\beta_1$
Poumon	NA	$\alpha_3\beta_1 / \alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$
Mélanome	$\alpha_3\beta_1 / \alpha_4\beta_1 / \alpha_v\beta_3$	$\alpha_1\beta_1 / \alpha_2\beta_1 / \alpha_5\beta_1 / \alpha_{IIb}\beta_{IIIa} / \alpha_v\beta_3 / \alpha_6\beta_4$
Ovaire	$\alpha_3\beta_1$	$\alpha_3\beta_1$
Peau	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_2\beta_1 / \alpha_3\beta_1 / \alpha_6\beta_1 / \alpha_6\beta_4$
Cerveau	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_3$

Tableau IV.2.: Intégrines surexprimées par différentes tumeurs et les métastases associés

En conclusion, les intégrines sont impliquées dans tous les processus mettant en jeu l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire. Elle intervient dans le développement de nombreuses pathologies et en particulier l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle essentiel dans la néoangiogenèse tumorale. Cette dernière étant surexprimée au niveau de la tumeur et très peu dans les cellules saines, elle constitue donc une cible privilégiée pour la détection précoce des tumeurs primaires, des récidives tumorales et des métastases [25-28].

IV.2.3. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$, aussi appelée « récepteur de la vitronectine », est la mieux connue des intégrines associées à la néoangiogenèse tumorale. Elle est impliquée dans la migration des cellules endothéliales, dans l'induction de l'angiogenèse tumorale en réponse à l'hypoxie, et dans le développement de métastases.

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est surexprimée au niveau des cellules endothéliales nouvellement formées suite au développement d'une tumeur alors qu'elle est absente ou très peu présente dans le même type de cellules à l'état quiescent. De même elle est surexprimée au niveau des cellules tumorales de certains cancers (mélanome, peau, glioblastome cérébral, ...). Elle constitue donc un critère fiable permettant de différencier les cellules tumorales des cellules quiescentes et son expression à la surface des cellules tumorales constitue un facteur pronostique pour certains cancers comme le cancer du sein [29] ou du colon [30].

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ fait partie des 8 intégrines reconnaissant le motif tripeptidique Arg-Gly-Asp (ou RGD) structuré présent dans de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire telles que la vitronectine, la fibronectine, ou le fibrinogène (Fig IV.5. et IV.8.) [31].

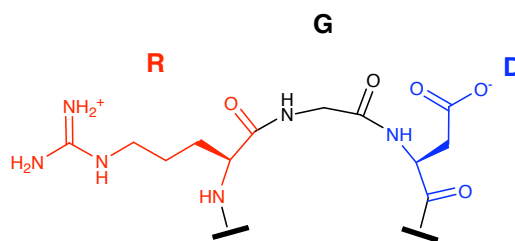


Fig. IV.8. : Tripeptide RGD « Arg-Gly-Asp »

La structure cristalline du domaine extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été résolue seule [12] et en présence d'un ligand RGD [32]. Ces structures ont permis de déterminer la façon dont le site actif de l'intégrine interagit avec un motif RGD comme le pentapeptide CRGDC (Fig. IV.9.gauche) ou le cilengitide: c(RGDf(N-Me)V).

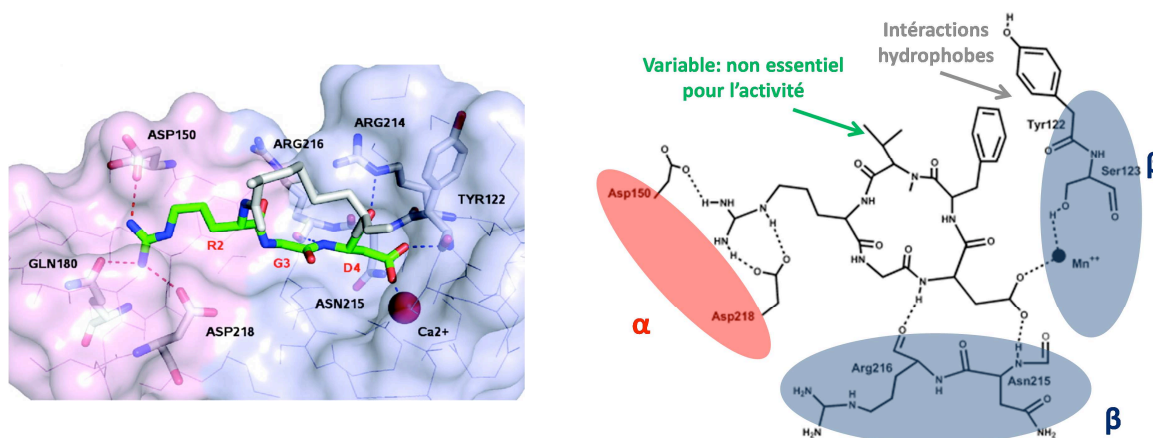


Fig. IV.9. : Modélisation du site actif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en présence de deux pentapeptides : CRGDC linéaire à gauche [33] et c(RGDfMeK) à droite [32]

Ainsi, lors de la reconnaissance du motif tripeptidique RGD, on observe une interaction entre le domaine βA et l'aspartate D qui vient coordonner le cation Ca^{2+} . L'arginine, quant à elle, se lie aux acides aspartiques constitutifs du domaine αA [33-35]. En 2009, Kessler *et al* ont précisé la nature de cette interaction Asp- αA en mettant en évidence l'importance des liaisons hydrogène [36]. Si le site de reconnaissance du ligand est de très faible dimension (350\AA^2 environ) et le ligand très court (seulement 3 acides aminés). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ n'en est pas moins

très sélective. En effet la reconnaissance d'un ligand RGD est fortement liée à sa conformation conditionnée par les acides aminés qui l'entourent [37]. La distance séparant les groupements guanidinium et aspartate présents dans le motif tripeptidique RGD influe ainsi énormément sur la sélectivité. La distance entre les atomes de carbone β de l'aspartate et de l'arginine est en moyenne de 6.7 Å pour un ligand sélectif d' $\alpha_v\beta_3$ et de 8 Å dans le cas d' $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Ainsi, depuis 2002, de nombreuses études ont été effectuées afin de déterminer des ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ adoptant des conformations variées mais dans lesquels la distance Arg-Asp est respectée dans le but d'obtenir des inhibiteurs de celle-ci ou de développer des radiopharmaceutiques (imagerie ou thérapie) la ciblant [38].

IV.3. L'angiogenèse au cœur des recherches antitumorales

IV.3.1. L'angiogenèse tumorale : une cible thérapeutique

La thérapie anti-angiogénique présente la particularité de ne pas cibler directement la tumeur mais le réseau sanguin nouvellement formé qui l'entoure. Cette vascularisation tumorale est induite par la tumeur et lui permet de se développer. La destruction de ce réseau sanguin qui alimente la tumeur pourrait permettre d'«étouffer» celle-ci et de l'empêcher de croître. Néanmoins, une action anti-angiogénique seule ne peut pas mener à un recul de la tumeur mais, au mieux, à une stagnation. Les agents anti-angiogéniques sont donc étudiés cliniquement en association avec des traitements en radiothérapie ou chimiothérapie. Cette association est paradoxale puisque la destruction du réseau sanguin entourant la tumeur devrait avoir un effet néfaste sur ces traitements en réduisant l'acheminement jusqu'à la tumeur des composés antitumoraux utilisés en chimiothérapie, ou en réduisant l'apport en oxygène indispensable pour la formation de radicaux lors de la radiothérapie. Pourtant les premiers résultats obtenus sont très

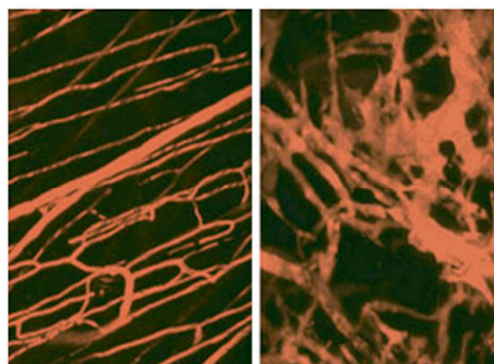


Fig. IV.10.: Réseau vasculaire d'un tissu normal (à gauche) et au voisinage d'une tumeur (à droite).

prometteurs et laissent transparaître une synergie dans l'action des deux traitements [39, 40]. L'explication de ce phénomène pourrait résider dans le fait que la vascularisation liée à la néoangiogenèse tumorale est anarchique et inhomogène (Fig. IV.10.). Le traitement anti-angiogénique n'agit que sur ce réseau nouvellement formé et n'affecte pas la vascularisation normale du tissu.

D'autres thérapies anti-angiogéniques ont été proposées: tous les récepteurs ou transmetteurs intervenant dans la cascade de phénomènes biochimiques qui conduisent au développement de nouveaux vaisseaux sont en effet des cibles potentielles. Ainsi des études sont actuellement en cours pour cibler les facteurs de croissance comme VEGF et FGF (Sunitinib, Avastin, LYG-202 [41]), mais aussi la MMP-2 qui dégrade la membrane basale des cellules endothéliales (Marimastat, Tanshinone IIA [42]) et les intégrines dont $\alpha_v\beta_3$ (Cilengitide, Vitaxine). L'inhibition est réalisée au moyen d'anticorps monoclonaux comme pour l'Avastin (anti-VEGF) ou la vitaxine (anti- $\alpha_v\beta_3$). Elle peut aussi passer par des petits peptides linéaires ou cycliques (Cilengitide) ou des inhibiteurs non peptidiques identifiés par criblage de chimiothèques.

Nous avons vu que la thérapie anti-angiogénique permet d'agir sur le cancer à un stade très précoce, peu après le switch angiogénique, lorsque la nouvelle vascularisation se forme. A ce stade de l'évolution du cancer, la tumeur est de petite taille, il convient donc d'avoir des techniques de diagnostic fiables dès que l'on suspecte l'apparition d'un cancer. Le développement de traceurs capables de mettre en évidence les molécules et récepteurs impliqués dans la néoangiogenèse permettra la caractérisation bien plus précoce des tumeurs en cas de présomption de cancer (suite à palpation, mammographie, dosage de PSA, etc...).

Dans la suite, nous nous intéresserons exclusivement aux ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ utilisés dans une approche thérapeutique (inhibiteurs) ou diagnostique (traceurs).

IV.3.2. Ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Les ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ développés actuellement sont de différents types :

- Les anticorps monoclonaux tels que la Vitaxine (Phase I et II) qui sont très sélectifs et peuvent être marqué par divers radioéléments pour une utilisation en imagerie (voir chapitre 1).
- Les ligands peptidiques ou pseudopeptidiques présentant la séquence RGD linéaire ou cyclique sont utilisés *in vivo*.
- Les ligands non peptidiques mimant le motif RGD. Ces composés sont souvent obtenus par criblage de chimiothèques.
- Les disintégrines comme la Leberagine-C ou l'Acurhagine-C sont des toxines également étudiées actuellement [43, 44]

Les ligands peptidiques ou pseudopeptidiques

Les ligands peptidiques sont très répandus, ils présentent l'avantage d'être basé sur la structure RGD reconnue par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Néanmoins, la géométrie de ce motif tripeptidique n'est pas figée et ces ligands présentent en général des sélectivités faibles pour $\alpha_v\beta_3$. Il est ainsi assez rare dans la littérature de rencontrer des études portant sur l'effet anti- $\alpha_v\beta_3$ de peptides linéaires. La figure IV.11. montre un exemple d'un dérivé peptidique marqué au ^{99m}Tc -tricarbone [45]. En outre les peptides

naturels linéaires sont très sensibles à l'action des protéases *in vivo* qui vont les dégrader. Pour échapper à cette instabilité *in vivo*, deux stratégies sont couramment employées. La première consiste à utiliser un ou plusieurs amino acides de configuration inversée (acides aminés (D)).

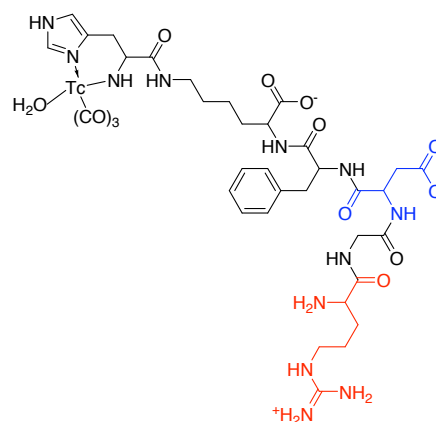


Fig. IV.11.: Exemple de peptide linéaire marqué par un motif Tc-tricarbone.

L'autre stratégie consiste à préparer des peptides cycliques qui sont plus résistants à l'action des peptidases.

La stabilité *in vivo* n'est pas l'unique raison expliquant le fort engouement pour les peptides cycliques. En effet, la cyclisation contraint le motif RGD et lui permet de s'adapter spatialement aux sites actifs des différentes intégrines. Ces composés sont donc souvent plus sélectifs que leurs analogues linéaires [16]. Cette contrainte sur le cycle peut également être exercée en utilisant des acides aminés (D). La figure IV.12. regroupe quelques exemples de peptides cycliques, présentant tous un motif RGD.

En particulier, les travaux de Kessler ont permis de montrer que dans un cyclopentapeptide de type c(RGDXY), la position 4 (acide aminé noté X) joue un rôle essentiel pour l'affinité de l'inhibiteur [46]. Ces travaux ont montré qu'elle doit impérativement être occupée par un résidu hydrophobe pour obtenir une bonne affinité pour l'intégrine. De même le proton libre de l'amide située entre les positions 3 et 4 semble indispensable d'après études de relations structure - activité. Ces observations ont permis de proposer la structure c(RGDfV) qui s'est avérée avoir une affinité intéressante pour $\alpha_v\beta_3$ ($IC_{50}(\alpha_v\beta_3) = 50$ nM).

Trois années plus tard, la même équipe a prouvé que la N-méthylation de l'amide situé entre les positions 4 et 5 permet d'accroître considérablement l'affinité pour $\alpha_v\beta_3$ ($IC_{50}(\alpha_v\beta_3) = 0.83$ nM) [47]. Cette observation a permis le développement du cilengitide actuellement développé par Merck qui fait l'objet d'études cliniques, de phase II ou III selon le type de pathologies, pour son action seul ou en complément de la chimiothérapie ou de la radiothérapie [16, 48]. Les premiers résultats rendent compte d'une bonne tolérance chez l'homme. Le cilengitide agit à deux niveaux. Il inhibe la néoangiogenèse tumorale par inhibition de l'interaction entre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et les protéines constitutives de la membrane extracellulaire et induit l'apoptose des cellules tumorales exprimant les intégrines à sous unité α_v [49].

Chapitre IV : Illustration du potentiel de TriAS pour la réalisation de traceurs.

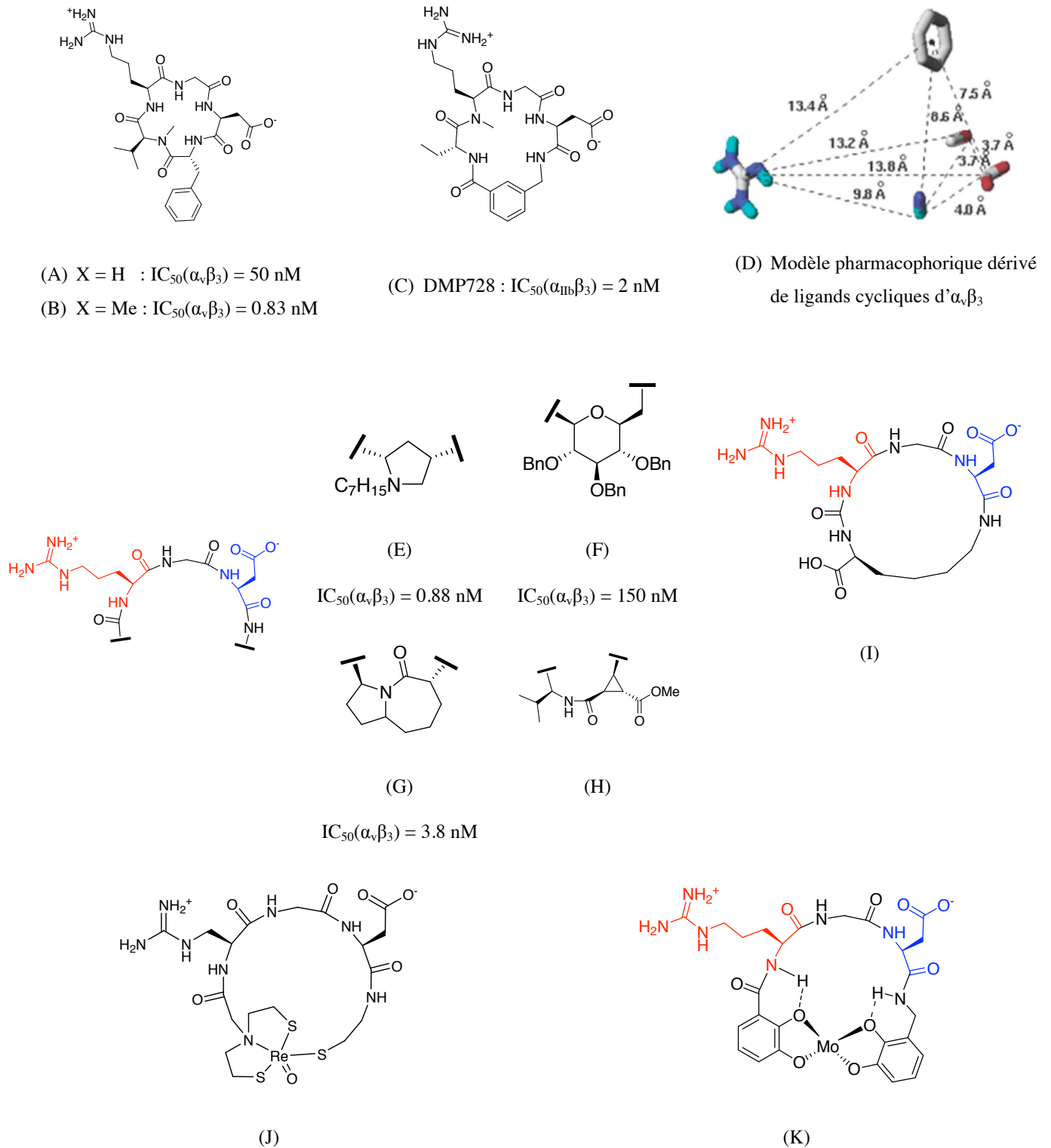


Fig. IV.12.: Exemples de peptides ou pseudopeptides cycliques ligands des intégrines $\alpha_v\beta_3$ ou $\alpha_{IIb}\beta_3$

Cilengitide...	Cancer visé	Phase	Référence
Seul	Variable (rein, colorectal, ...)	I	[50]
	Glioblastome	II	[51]
		II	[52]
Associé à la chimiothérapie	Prostate	II	[53]
	Cancer épidermoïde	I/IIa	[40]
	Pancréas	II	[54]
Associé à la radiothérapie et à la chimiothérapie	Glioblastome	I/IIa et III	[39, 55]

Tableau IV.2. : Cilengitide : quelques essais cliniques seul ou associé à la radiothérapie ou la chimiothérapie

Récemment, Kessler *et al* ont publié une étude montrant qu'une seconde N-méthylation du cilengitide au niveau d'une fonction amide bien choisie (c(RG(N-Me)Df(N-Me)K)) permet de conserver une bonne affinité pour $\alpha_v\beta_3$ ($IC_{50} = 5.9$ nM) tout en améliorant la sélectivité par rapport à $\alpha_v\beta_5$ ($IC_{50} > 3$ μ M) et $\alpha_{IIb}\beta_3$ ($IC_{50} > 1$ μ M) [56]. Un tel composé pourra permettre d'étudier plus précisément le rôle d' $\alpha_v\beta_3$ dans la néoangiogenèse indépendamment des autres intégrines qui y sont impliquées.

Le passage de cyclopentapeptides à des cyclohexapeptides ou à des peptides cyclisés par un noyau benzyle tels que DMP728 engendre une augmentation de la distance séparant les groupements guanidinium et aspartate et conduit à des inhibiteurs sélectifs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ($IC_{50} = 2$ nM) - Fig. IV.12.C - [57].

Suite aux travaux de Kessler *et coll*, d'autres groupes de recherche ont étudié des possibilités de cyclisation de peptides autour de noyaux rigides (notamment des composés cycliques, ou bicycliques) afin d'augmenter encore la contrainte sur le cycle peptidique et de rigidifier la structure RGD (Fig. IV.12.E-H). Ainsi, des pseudopeptides construits autour de noyaux proline [58] (Fig. IV.12.E), pyranne [59] (Fig. IV.12.F), ou azabicyclo[5.3.0]nonane [60, 61] (Fig. IV.12.G) par exemple sont décrits et présentent une bonne affinité et sélectivité pour $\alpha_v\beta_3$ (respectivement $IC_{50} = 0.88, 150$ et 3.8 nM). Le peptide cyclique (I) est cyclisé par la formation d'une fonction urée [62]. Enfin, les composés J et K de la figure IV.12. sont deux exemples de peptides cyclisés par chélation d'un cœur métallique de technétium ou de

molybdène [63]. En particulier, le composé (J), dont la synthèse a été réalisée au laboratoire, a été identifié parmi une chimiothèques de complexes de structures voisines, et présente une bonne affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ($IC_{50}(\alpha_v\beta_3) = 60$ nM) et une sélectivité intéressante pour celle-ci par rapport à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ($IC_{50}(\alpha_{IIb}\beta_3) = 1.7$ μ M) [64].

La figure IV.12.(D) montre un modèle pharmacophorique obtenu par docking dans le site actif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ d'un ensemble de peptides cycliques antagonistes. On peut ainsi voir les distances idéales entre les différents pharmacophores pour l'obtention d'inhibiteurs d' $\alpha_v\beta_3$. En particulier on note une distance d'environ 13.8 Å entre les motifs guanidinium et carboxylate [65].

Les ligands non peptidiques mimant RGD

Les ligands peptidiques présentent dans leur structure l'enchaînement RGD, ligand naturel de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, et sont donc très étudiés. Si leur cyclisation a permis de réduire la dégradation par les protéases, certaines équipes de recherche préfèrent étudier des composés non peptidiques capables de mimer le ligand naturel RGD. Le développement de ce type de composé s'effectue selon deux stratégies distinctes : le criblage *in vitro* de chimiothèques de ligands potentiels de l'intégrine, ou le criblage *in silico* de banques de composés virtuels.

Dans le cas du criblage *in vitro* de chimiothèques, les composés sont généralement construits autour d'une structure centrale relativement rigide sur laquelle sont fixés deux motifs : l'un mimant le noyau guanidinium de l'arginine et en général un groupement carboxylate, analogue d'aspartate (Fig. IV.14.). Un espaceur de longueur variable est également régulièrement introduit entre les deux fonctions de façon à faire varier la distance entre celles-ci qui est un facteur essentiel conditionnant l'affinité. Cet espaceur permet également d'introduire des fonctions chimiques hydrophobes (cycles aromatiques, chaînes carbonées) ou polaires (polyéthylène glycol, glucides) permettant de faire varier la biodistribution et la solubilité du composé lors d'études *in vivo* ultérieures. La figure IV.13. illustre l'utilisation d'un espaceur dans le but de moduler la biodisponibilité orale d'un composé. Le composé A ($IC_{50}(\alpha_v\beta_3) = 2$ nM) est rendu plus hydrophobe, entre autre, grâce à un espaceur benzylique (B) ou plus hydrophile grâce à un espaceur de type ether (C) en gardant dans chaque cas une bonne affinité pour $\alpha_v\beta_3$ [38].

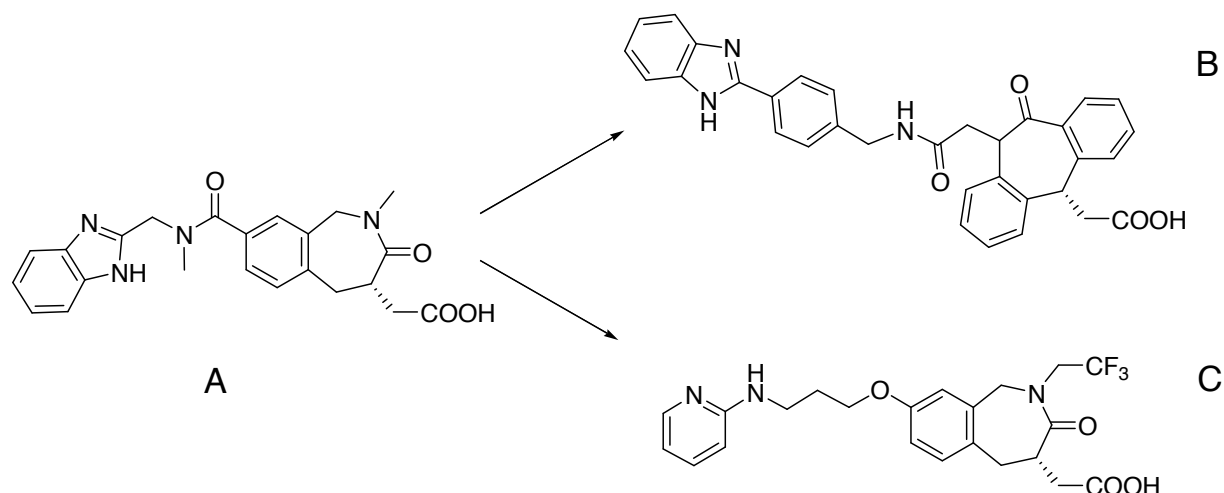


Fig. IV.13. : Le choix d'un espaceur hydrophobe ou polaire permet de moduler la biodisponibilité de l'inhibiteur.

Si le mime d'aspartate est en règle générale un groupement carboxylate, le mime de guanidinium est beaucoup plus varié comme des groupements pyridine, guanidine, imidazole, etc... (Fig IV.15) [38]. Un motif hydrophobe constitué d'un ou plusieurs cycles aromatiques (Fig. IV.15.) est également présent dans ces structures à proximité du mime d'aspartate. Il va se glisser dans la « gorge » située entre les sous-unités α et β , et générer des interactions de type « π -stacking » avec la Tyr178 de la sous-unité α_V améliorant ainsi l'affinité [66].

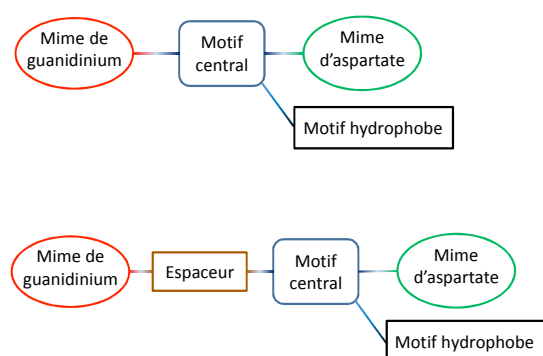


Fig. IV.14. : Stratégies de développement de chimiothèques de ligands des intégrines

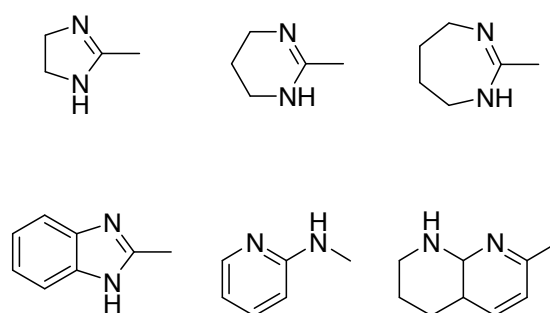


Fig. IV.15. : Exemples de mimes de guanidinium

Cette approche est régulièrement utilisée pour le développement de nouveaux traceurs. Il existe ainsi pratiquement autant de types de motifs centraux que d'équipes de recherche travaillant sur ces sujets. Nous avons choisi d'en retenir deux afin d'illustrer cette démarche.

La figure IV.16.A. montre une stratégie centrée sur un noyau azacarbapétide qui a conduit à la synthèse de 22 composés. Ces composés présentent une affinité variable pour $\alpha_v\beta_3$ ($IC_{50}(\alpha_v\beta_3)$ allant de 0.7 à 210 nM) mais très supérieure à celle observée pour $\alpha_{IIb}\beta_3$ ($IC_{50}(\alpha_{IIb}\beta_3) > 1 \mu\text{M}$ dans tous les cas) [67]. Le second exemple, développé au laboratoire, consiste à relier les deux motifs mimant le carboxylate et le guanidinium par chélation d'un cœur oxotechnétium. Les mimes des groupements guanidinium et carboxylate sont portés par deux ligands venant complexer ce cœur technétié. L'objectif de cette approche était de mettre ainsi en évidence des traceurs technétiés de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour l'imagerie *in vivo* (Fig. IV.16.B et C.) à partir de chimiothèques de complexes Tc-essentiels modulaires [68].

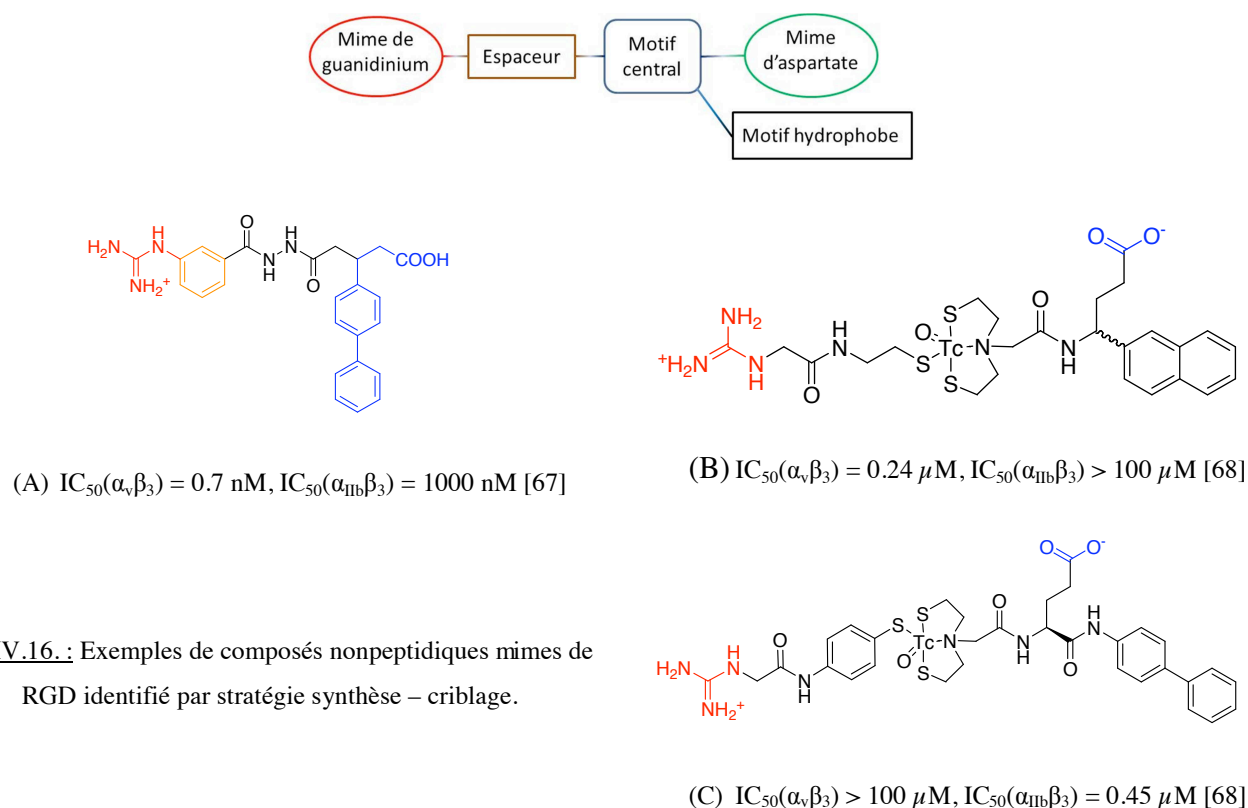
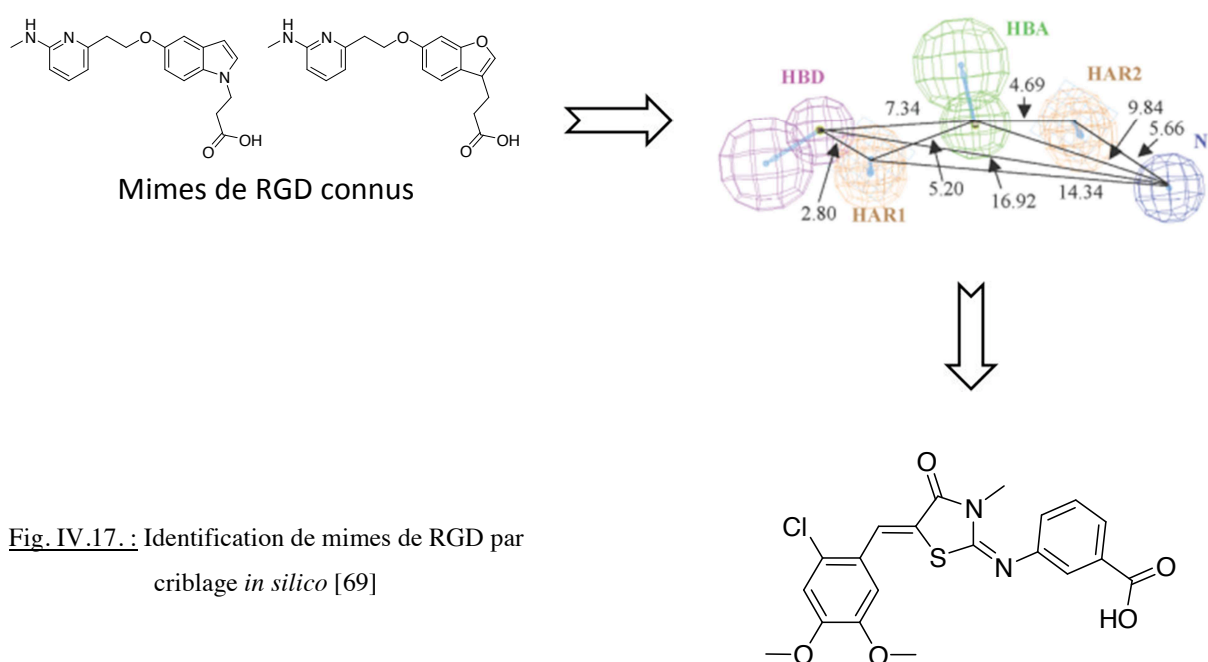


Fig. IV.16. : Exemples de composés nonpeptidiques mimes de RGD identifié par stratégie synthèse – criblage.

Une autre façon d'identifier des composés mimes de RGD ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ consiste à cribler des bases de composés chimiques contenant les caractéristiques de centaines de milliers de composés, grâce à des algorithmes mathématiques. Le principe en est illustré par la figure IV.17. A partir des structures cristallographiques de trois mimes de RGD connus pour leur forte affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, un modèle pharmacophorique est obtenu. Ce modèle est ensuite utilisé pour cribler une chimiothèque d'environ 600.000 composés. A l'issue de ce criblage, quelques hits sont identifiés. Chacun présente effectivement un carboxylate (mime d'aspartate) mais la partie de la molécule semblant mimer le guanidinium est très variée et n'a plus aucun point commun avec celui-ci. Ce résultat illustre l'importance des liaisons hydrogènes entre le « motif R » et la sous-unité α de l'intégrine plutôt que la charge du ligand comme cela a été récemment montré par Kessler et coll [36].



Ces deux types d'approches sont efficaces et utilisées régulièrement, en particulier la première, pour identifier de nouveaux inhibiteurs d'intégrines. Néanmoins, nous avons vu que l'obtention d'inhibiteurs sélectifs est très délicate comme c'est souvent le cas des familles de protéines présentant une large structure commune. Qu'il s'agisse d'une variation de la distance

séparant guanidinium et aspartate dans un mime de RGD ou d'une disposition spatiale différente, de très faibles variations peuvent entraîner une perte conséquente d'affinité. La conception de nouveaux inhibiteurs performants (c'est-à-dire hautement spécifiques et sélectifs) reste donc souvent empirique et nécessite la synthèse de composés nombreux mais chimiquement et structuralement très proches. Dans ce contexte, il est particulièrement intéressant de disposer de structures de base permettant le développement de chimiothèques d'inhibiteurs ou de traceurs simplement grâce à la chimie combinatoire. Nous nous proposons maintenant d'illustrer ce concept en mettant en évidence les potentialités de TriaS

IV.4. Application de la plateforme TriaS pour le développement de traceurs *in vivo* de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à la préparation de nouveaux traceurs technétiés pour l'imagerie *in vivo* de la néoangiogenèse tumorale. Pour ce faire nous développons ici deux approches distinctes pour la réalisation de ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ basés sur la structure TriaS- ^{99m}Tc étudiée au chapitre III de ce manuscrit. Une première stratégie mettra à profit le concept de traceurs Tc-essentiels déjà développé au laboratoire [64, 68] tandis que dans une seconde stratégie, nous aborderons la conception de composés bifonctionnels modulaires.

IV.4.1. Le potentiel de TriaS pour l'imagerie *in vivo*

Au chapitre III, nous avons mis en évidence, par criblage d'un ensemble de ligands potentiels du cœur oxotechnétium, le ligand TriaS qui présente plusieurs propriétés intéressantes.

- TriaS complexe quantitativement le cœur ^{99m}TcO suivant un protocole simple, rapide, et ne nécessitant pas de purification. Il est donc a priori adapté à une utilisation routinière en milieu hospitalier.

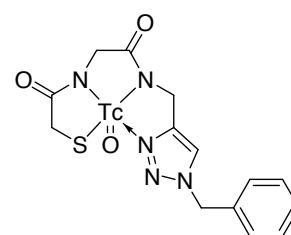


Fig. IV.18.: TriaS- ^{99m}Tc

- Le complexe TriaS-^{99m}Tc est stable *in vivo* à plus de 90% (après 6h d'incubation en plasma murin). De plus, aucune apparition de produit de dégradation n'est observée au fil du temps dans le plasma.
- Le complexe TriaS-^{99m}Tc présente une biodistribution, 2h après injection chez la souris, extrêmement intéressante. En effet le complexe est éliminé par voie urinaire (à hauteur de 80% de la dose injectée) et est récupéré intact (65% environ de l'activité mesurée dans les urines).

Outre leur aptitude potentielle à former un complexe stable de ^{99m}Tc, les ligands auxquels nous nous sommes intéressés étaient présélectionnés pour leur structure à fort potentiel de fonctionnalisation. La figure IV.19. indique les sites de la structure du complexe TriaS-^{99m}Tc où une fonctionnalisation est possible.

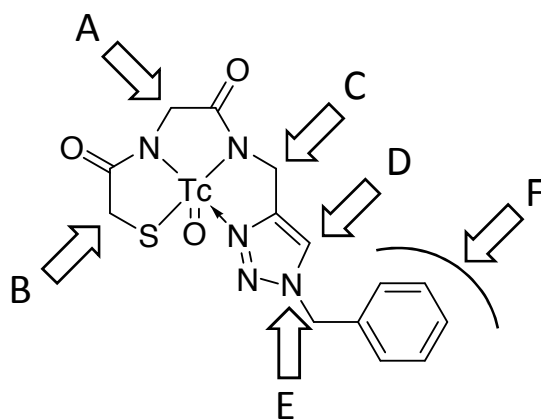


Fig. IV.19. : Potentiel de fonctionnalisation de TriaS-^{99m}Tc

Selon le site étudié, la fonctionnalisation est plus ou moins délicate.

- (A) L'utilisation d'acides aminés à chaîne latérale fonctionnalisée (lysine, arginine, acide glutamique ou aspartique, ...) peut permettre de fonctionnaliser très simplement la structure. Le recours aux acides aminés non naturels permet également d'augmenter considérablement la diversité moléculaire accessible.

- (B) De même en utilisant un dérivé de l'acide mercaptoacétique, il serait possible d'induire de la fonctionnalisation en α du thiol du ligand. Ces dérivés peuvent être préparés simplement à partir de n'importe quel acide aminé par nitrosation suivie d'une substitution nucléophile par le thioacétate (Fig. IV.19) [70, 71].

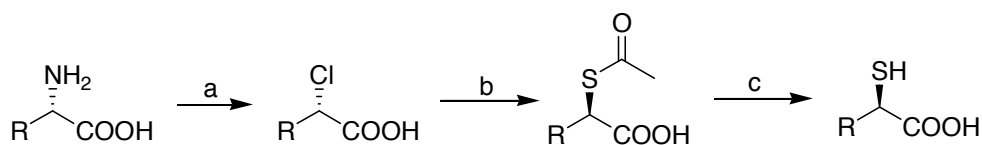


Fig. IV.19.: Préparation d'acides thioacétiques substitués par substitution nucléophile sur les acides aminés [71]. a) NaNO_2 , 5N HCl, 0°C , 5h, rt puis RT, 24h ; b) CsSC(=O)CH_3 , DMF, rt, 24h ; c) 2N $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, DTT, rt, 5h.

- (C) La fonctionnalisation en α du triazole est possible en utilisant des acides aminés tels que l'éthynylglycine ou un analogue.
- (D) Le triazole est également fonctionnalisable en position 5. Il s'agira alors de l'obtenir à partir d'un alcyne non terminal et donc par cycloaddition non catalysée au cuivre [72]
- (E) Le motif triazole permet également d'envisager de nombreuses fonctionnalisations très simplement grâce à la chimie-click en faisant varier la nature de l'azoture d'alkyle formé *in situ*.
- (F) Il est d'ailleurs également envisageable de conserver le motif triazole benzylé en mettant à profit la diversité moléculaire disponible en série benzylque.

La figure IV.20. indique quelques exemples de résultats de ces 6 types de fonctionnalisations ainsi que deux applications bifonctionnelles potentielles.

Ainsi, TriaS-^{99m}Tc présente des possibilités de fonctionnalisation nombreuses et variées permettant de concevoir des traceurs intégrés ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, ou de relier cette structure à un ligand connu de celle-ci dans le cadre d'une approche bifonctionnelle. Nous allons illustrer ici ces deux stratégies.

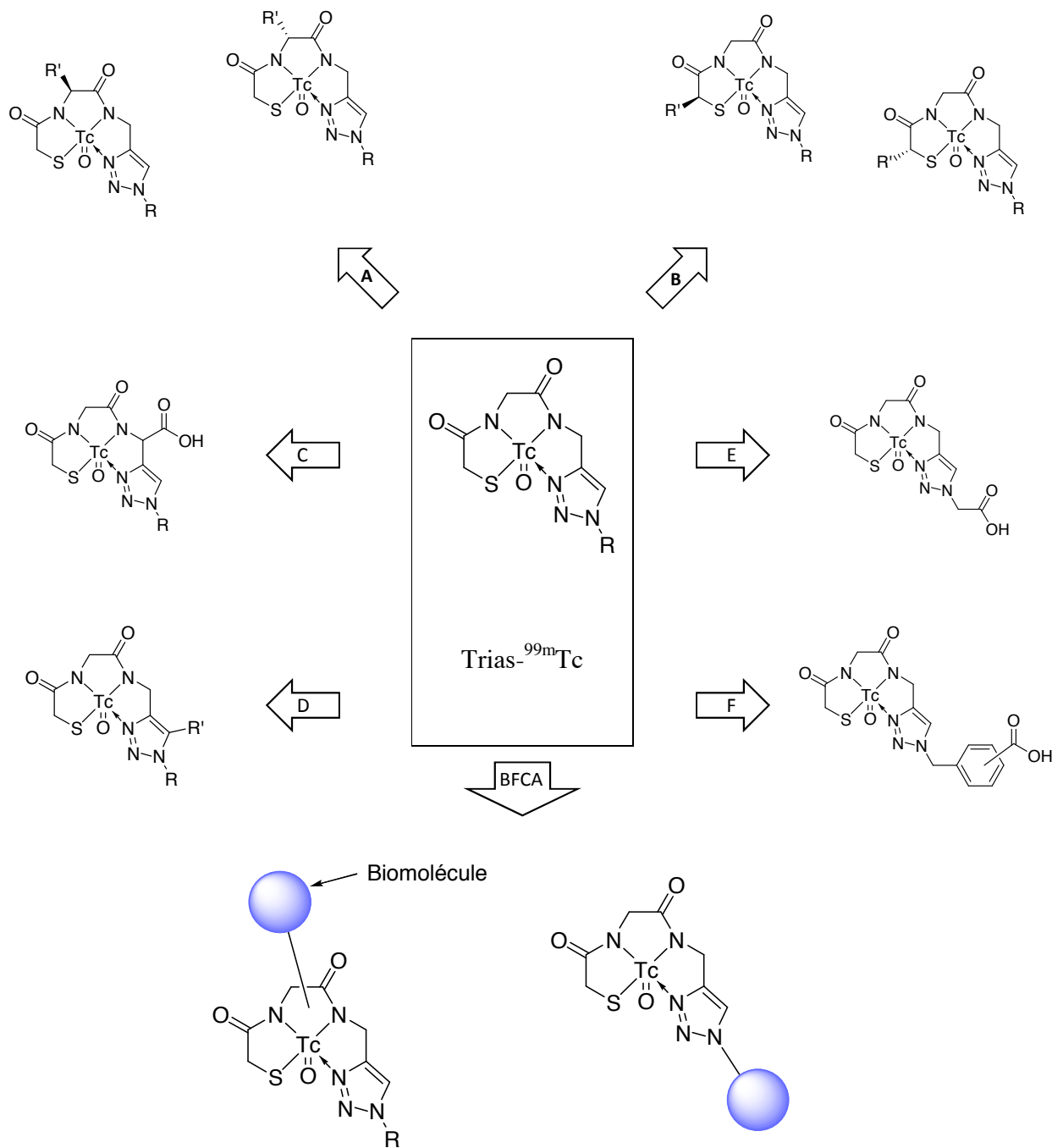


Fig. IV.20. : Différentes voies de fonctionnalisation de $\text{Trias-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ envisageables

IV.4.2. Développement de traceurs intégrés de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

IV.4.2.a. Stratégie employée pour la production de traceurs intégrés

Nous allons décrire ici le développement de traceurs intégrés construits à partir de la structure de TriaS- ^{99m}Tc par fonctionnalisation. La préparation de dérivés fonctionnalisés de TriaS étant à priori très simple, nous procédons ici par synthèse d'un ligand modifié puis du complexe correspondant en utilisant des chaînes alkylcarboxylates de longueurs variables et benzylcarboxylates substitués en *ortho*, *mé*ta, ou *para*.

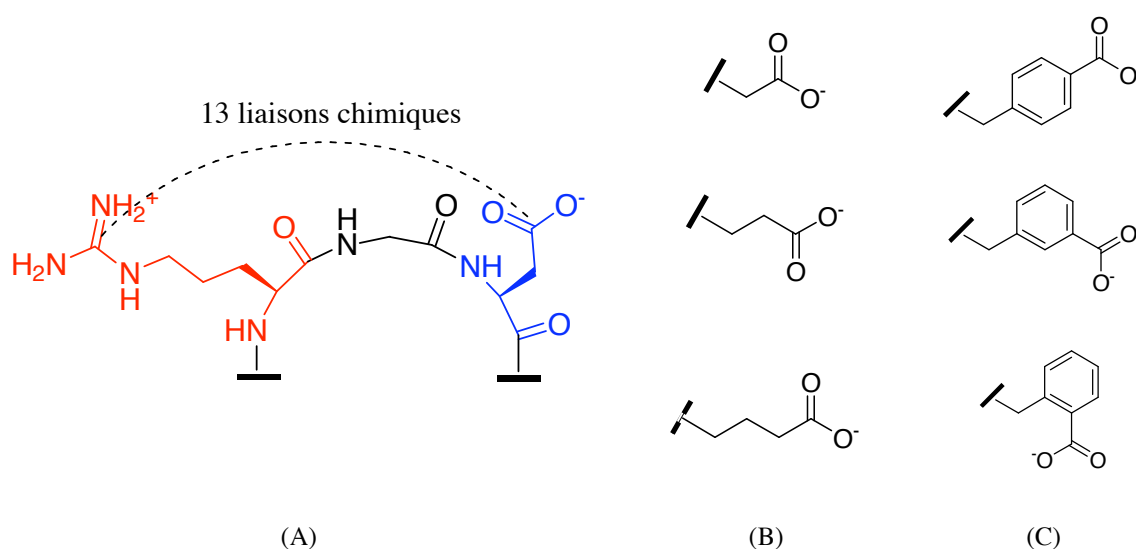
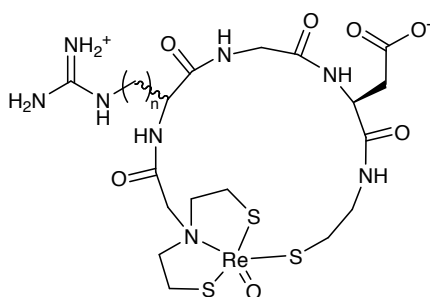


Fig. IV.21.: Préparation de traceurs intégrés de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$: importance de la distance R-D (à gauche), mimes d'aspartate potentiels (à droite).

Les composés préparés sont constitués de trois parties. Une partie centrale formée par la structure TriaS-Tc et de part et d'autre un motif alkylguanidinium et un mime d'aspartate. Plusieurs composés sont préparés en faisant varier la distance séparant ces deux derniers motifs. Nous avons vu que la distance idéale séparant guanidinium et le carboxylate est d'environ 13.8 Å d'après les modèles pharmacophoriques obtenus par docking de ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans le site actif de celle-ci. Concrètement, il est admis qu'en première approximation cette distance correspond à 12 à 14 liaisons chimiques séparant les atomes de carbone des groupements

guanidinium et carboxylate de ce type de composés (Fig. IV.21.A.). C'est le cas par exemple concernant le Cilengitide ($IC_{50}(\alpha_v\beta_3) = 0.58 \text{ nM}$).

En théorie, dans notre cas, il y a deux façons de faire varier cette distance : en modifiant les longueurs de chacun des mimes de RGD. Néanmoins, les résultats obtenus au laboratoire dans le cas de motif RGD cyclisé par chélation d'un cœur oxorhénium ont montré que la conservation de l'arginine semble importante pour le maintien de l'affinité pour $\alpha_v\beta_3$. En effet, le passage à des analogues d'arginine à chaîne plus courte a entraîné le passage d'une affinité nanomolaire à micromolaire [64] (Fig. IV.22.). En outre, le passage de la (L)-arginine à la (D)-arginine a entraîné une perte d'affinité d'un ordre de grandeur. Nous avons donc choisi de conserver le motif arginine et de modifier uniquement le motif carboxylate. Nous avons concentré nos efforts sur deux types de mime d'aspartate : des mimes linéaires à 1, 2 ou 3 chaînons (Fig. IV.21.B) introduits par les bromoalkylesters associés, et des motifs benzyliques substitués en position *ortho*, *meta*, ou *para* (Fig. IV.19.C), faisant ainsi varier la distance guanidinium-carboxylate de 12 à 15 liaisons.



n	L	D
1	5.6	> 10
2	1.5	2.0
3	0.06	0.55
4	> 10	> 100

$IC_{50}(\alpha_v\beta_3)$ en μM

Fig. IV.22. : Importance de l'arginine pour le maintien de l'affinité pour $\alpha_v\beta_3$

IV.4.2.b. Stratégie de synthèse

Le composé **49**, précurseur acétylénique commun à tous les complexes fonctionnalisés décrits dans le cadre de cette approche a été préparé en deux étapes à partir de la Fmoc-Arg(Pbf)-OH par couplages successifs de la propargylamine et de l'acide mercaptoacétique tritylé **15** (Fig. IV.23.).

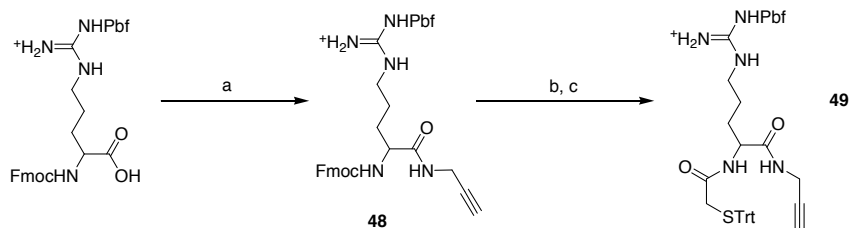


Fig. IV.23.: Préparation du précurseur acétylénique des traceurs intégrés. a) Propargylamine, DCC, DIPEA, DCM, rt, 24h, 82% ; b) DMF/Pipéridine (4/1), rt, 2h ; c) **15**, DCC, DIPEA, rt, 24h, 88%

Ce composé a ensuite été engagé dans la synthèse de la série de ligands alkylcarboxylates **51a-c** et du ligand benzoïque substitué en position *para* **53**.

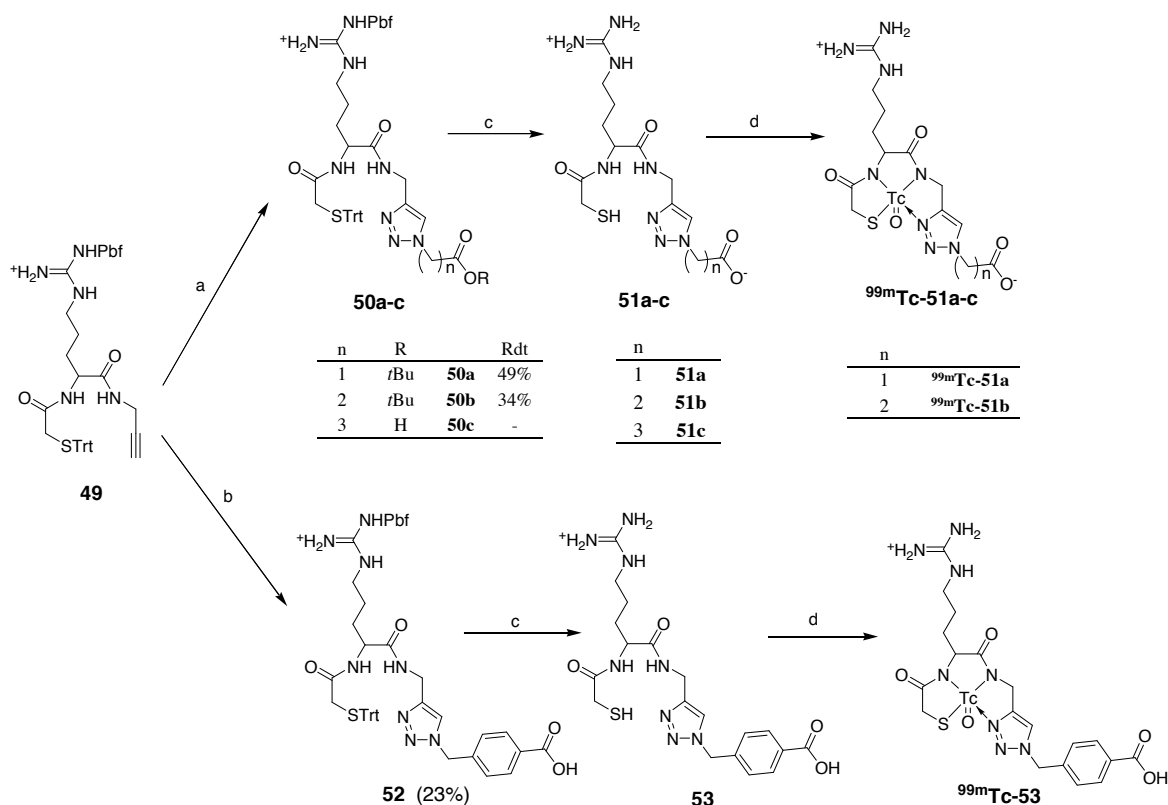


Fig. IV.24.: Fixation du mime d'aspartate par chimie combinatoire via la chimie-click. a) Cycloaddition de Huisgen (procédure n°2) : Bromoacétate de *tert*-butyle (resp. bromopropionate de *tert*-butyle et acide 4-bromobutyrique), NaN₃, Cu(II), EtOH/H₂O (9/1), MW, 80°C, 30 min ; b) Cycloaddition de Huisgen (procédure n°2) : Bromoacétate de *tert*-butyle (resp. bromopropionate de *tert*-butyle et acide 4-bromobutyrique), NaN₃, Cu(II), EtOH/H₂O (9/1), MW, 80°C, 30 min ; c) TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5), rt, 1h ; d) NaTcO₄, SnCl₂, NaOH, rt, 5 min.

Le composé **51c** issu de la cycloaddition de **49** et de l'acide 4-bromobutyrique (pas d'ester associé commercial) n'a pas été obtenu. Cet échec pourrait s'expliquer par les conditions de la cycloaddition de Huisgen, et en particulier la présence de carbonate de sodium et la température élevée (80°C). Dans ces conditions on observe probablement la cyclisation du 4-bromobutyrate pour conduire à une lactone formant un cycle stable à 5 chaînons (Fig. IV.25.).

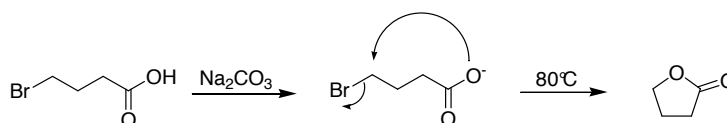


Fig. IV.25. Une explication probable de la non formation de **51c**

Enfin, le complexe $^{99m}\text{Tc-51a}$ ainsi que les deux complexes $^{99g}\text{Tc-51b}$ et $^{99g}\text{Tc-53}$ ont été préparés dans les mêmes conditions que pour TriaS-Tc (Fig. IV.24.) et étudiés par RP-HPLC analytique. Les chromatogrammes des figures IV.26. à IV.28. ont ainsi été obtenus. Les trois complexes ont été caractérisé en masse (MALDI-TOF).

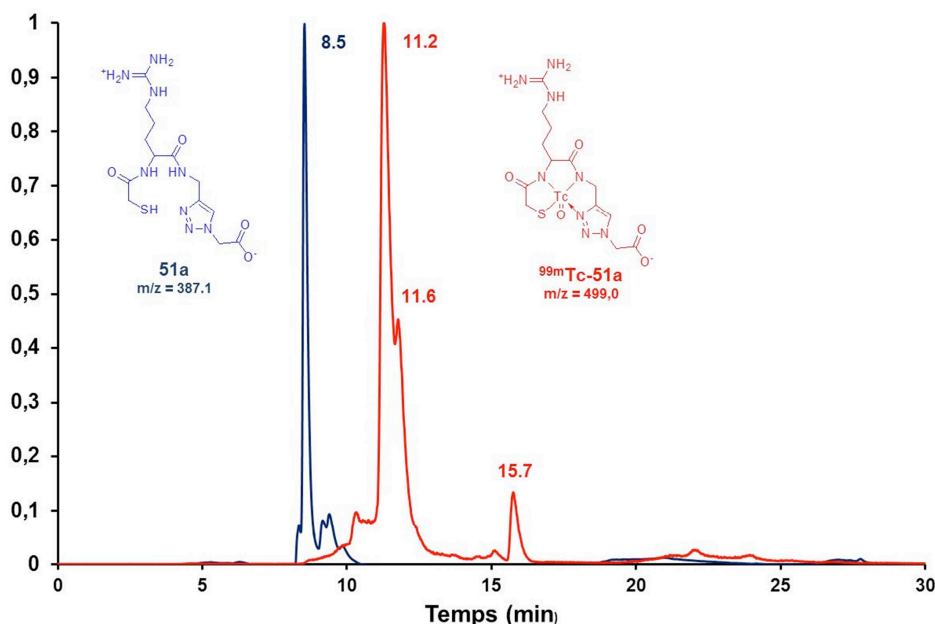


Fig. IV.26. : Chromatogrammes HPLC de **51a** et radio-HPLC du complexe associé $^{99m}\text{Tc-51a}$.

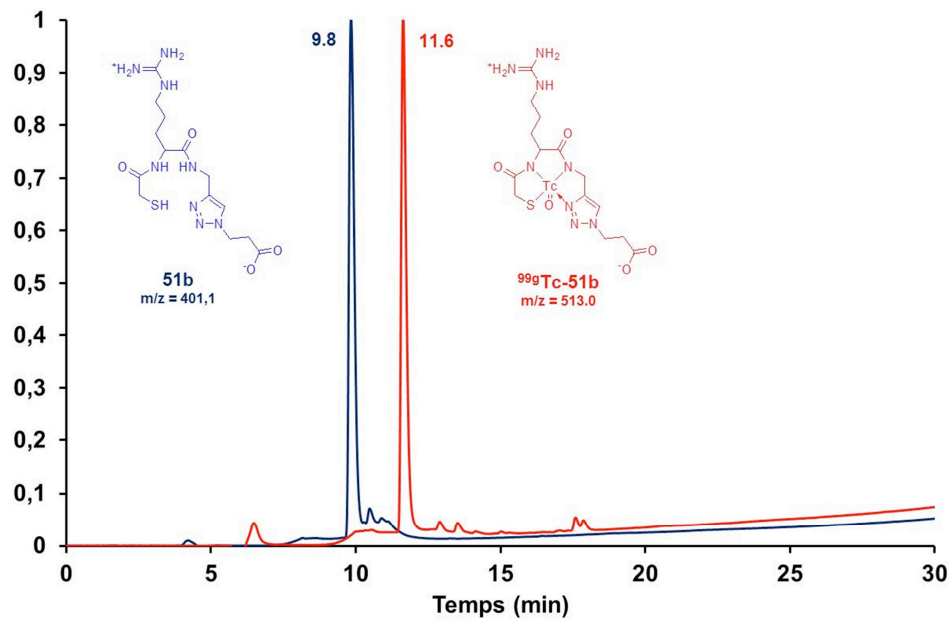


Fig. IV.27. : Chromatogrammes HPLC de **51b** et du complexe associé $^{99g}\text{Tc-51b}$.

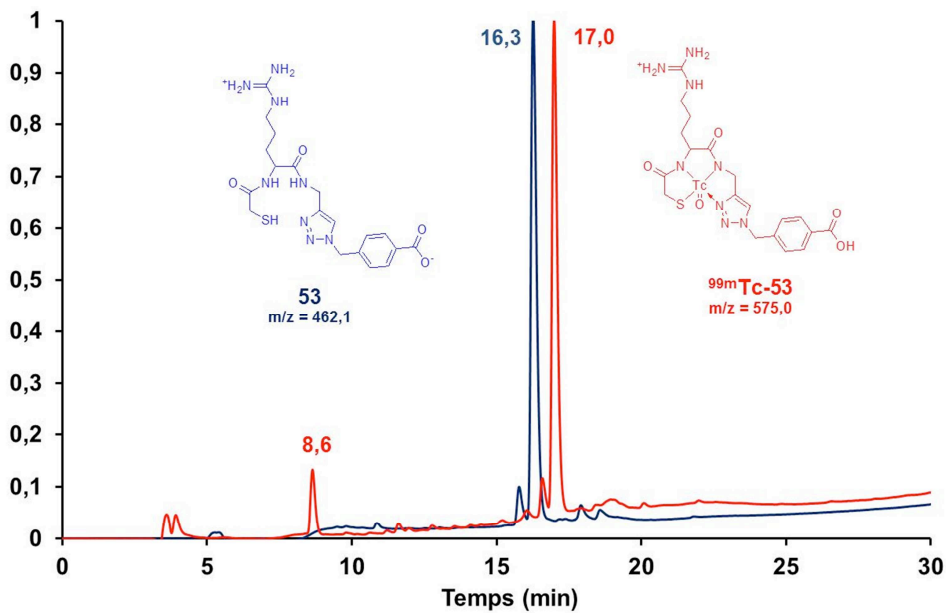


Fig. IV.28. : Chromatogrammes HPLC de **53** et du complexe associé $^{99m}\text{Tc-53}$.

On constate que dans le cas de la complexation des deux ligands **51a** et **51b**, aucun signal n'est présent à 4-5 min, et ce même signal est très faible dans le cas de la complexation de **53**. Il n'y a donc plus de technétium réduit résiduel : le marquage est quantitatif. Il semble donc que l'adjonction de groupements fonctionnels à la structure de TriaS, susceptibles d'interférer dans la chélation du métal, n'a pas d'influence négative sur celle-ci.

Dans le cas particulier de la complexation par le ligand **51a**, un seul signal est observé lors de la visualisation en UV (220 nm) du complexe $^{99g}\text{Tc-51a}$, et ce signal conduit à une unique masse ($m/z = 499.0$). Pourtant, lorsque le même complexe est réalisé en ^{99m}Tc , on observe deux phénomènes. D'une part, l'ensemble de l'activité est répartie en deux signaux : un signal minoritaire à $t_R = 15.7$ min correspondant à 6% de l'activité, et un signal majoritaire correspondant à 93% de l'activité à $t_R = 11.4$ min environ. Il y a donc formation d'un sous-produit très minoritaire lors de la complexation.

D'autre part, il est possible de distinguer deux pics dans le signal de plus grande intensité ($t_R = 11.4$ min et 11.6 min). Ces deux composés ont apparemment la même masse ($m/z = 499.0$) ce qui suggère la présence d'un couple de diastéréomères du complexe $^{99m}\text{Tc-51a}$ bien qu'on ne puisse exclure la présence d'un autre complexe minoritaire non identifié par spectrométrie de masse. A la différence de TriaS, le ligand **51a** est chiral (carbone α de l'arginine asymétrique). La complexation peut donc conduire à la formation de deux diastéréomères différenciés par la position du cœur oxotechnétium. $^{99m}\text{Tc-51a}$ a une géométrie pyramidale à base carrée dans laquelle la base est formée par le motif complexant N_3S . Le cœur oxotechnétium se situe perpendiculairement à celle-ci, soit au-dessus (Fig. IV.29.A), soit en dessous (Fig. IV.29.B). Cette différence entre les complexes $^{99m}\text{Tc-51a}$ et $^{99g}\text{Tc-51a}$ peut s'expliquer par le contrôle cinétique de la réaction : les différences de conditions, notamment la concentration, peuvent favoriser l'apparition du second diastéréomère.

Deux diastéréomères ont généralement des activités chimiques et biologiques différentes. Ainsi, il a été montré au laboratoire que la préparation de peptides RGD cyclisés par complexation du cœur oxotechnétium (Fig. IV.22. n=3) peut également conduire à des diastéréomères. Les tests biochimiques ont révélé que l'un des diastéréomères présente une affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ supérieure d'un ordre de grandeur à l'autre [73]. Il est donc important, lorsque cela est possible, de séparer ces deux formes et de les étudier séparément.

Dans le cas présent, les deux pics sont trop proches pour être séparés, même avec un gradient plus étalé.

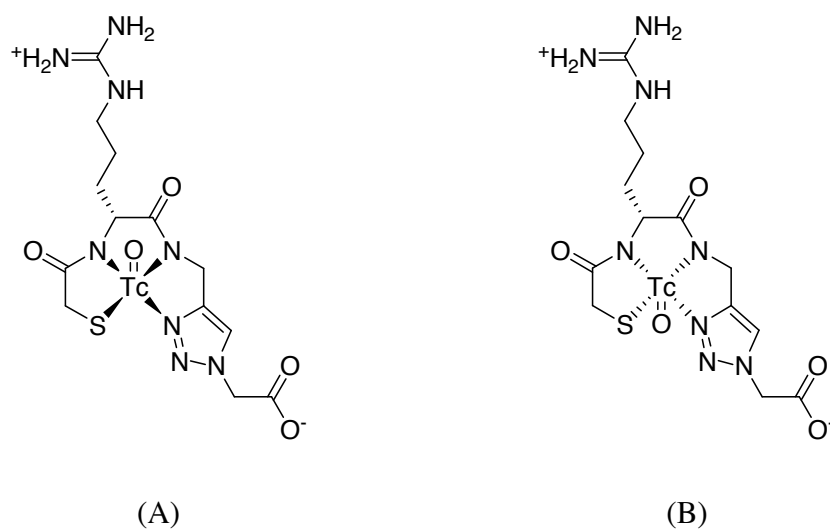


Fig. IV.29. : Deux diastéréomères de $^{99m}\text{Tc-51a}$. Le cœur oxotechnétium est placé au-dessus (A) ou en dessous du plan moyen du ligand (B).

Suite à ces premiers résultats, nous avons souhaité évaluer la stabilité de $^{99m}\text{Tc-51}$ en plasma murin pour la comparer à celle de TriaS et évaluer l'influence des groupes fonctionnels ajoutés. Cette étude a été réalisée sur une durée de 6h dans le plasma murin à 37°C. Le complexe est en concentration nanomolaire dans la solution de plasma.

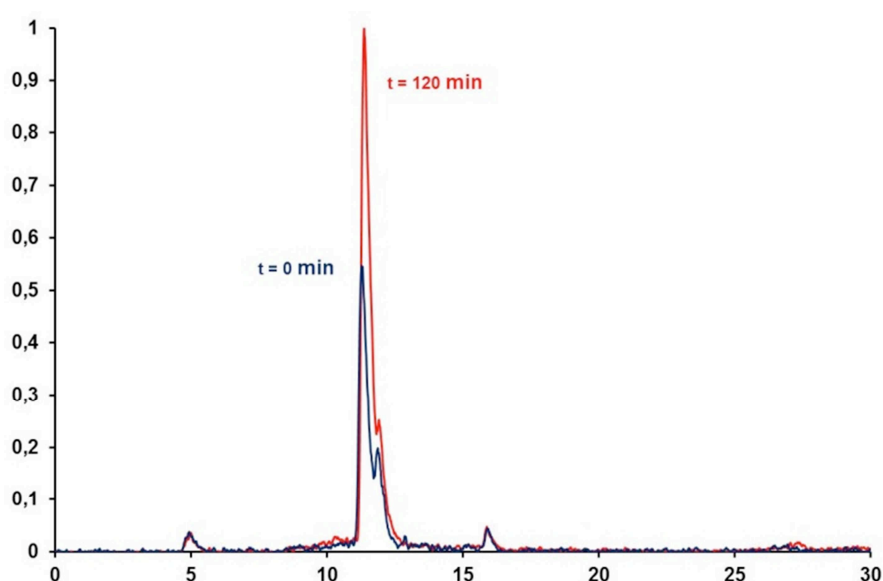


Fig. IV.30. : Evolution du complexe $^{99m}\text{Tc-51a}$ après deux heures d'incubation dans le plasma murin à 37°C.

Le suivi des radiochromatogrammes obtenus à différents temps de l'étude indique qu'aucun sous-produit de dégradation technétii détectable ne se forme (Fig.IV.30.). Ce résultat est en parfaite adéquation avec les résultats observés chez TriaS- ^{99m}Tc . On constate également que le sous-produit observé à un temps de rétention de 15.7 min (Fig. IV.26.) est insensible aux constituants du plasma puisque son signal ne varie pas du tout. Enfin, on peut constater que les deux pics correspondant aux possibles diastéréomères sont toujours présents dans des proportions comparables après 2h, il ne semble donc pas que l'un ou l'autre des diastéréomères soit plus sensible au plasma murin. Néanmoins, il a été montré au laboratoire qu'une rééquilibration pouvait avoir lieu à l'échelle du temps de l'expérience, permettant la transition d'un diastéréomère à l'autre [73]. De plus, du fait de leurs temps de rétention très proches, il est difficile de suivre distinctement la cinétique de dégradation de l'un et l'autre de ces diastéréomères. Nous avons donc choisi d'étudier la stabilité du traceur $^{99m}\text{Tc-51a}$ en mélange.

La courbe de stabilité sur 6h de $^{99m}\text{Tc-51a}$ est indiquée à la figure IV.31. Comme dans le cas de TriaS- ^{99m}Tc , on observe une chute rapide de la quantité résiduelle de complexe lors de la

première heure d'incubation suivie d'une stagnation avec un palier autour d'une valeur moyenne d'environ 50%.

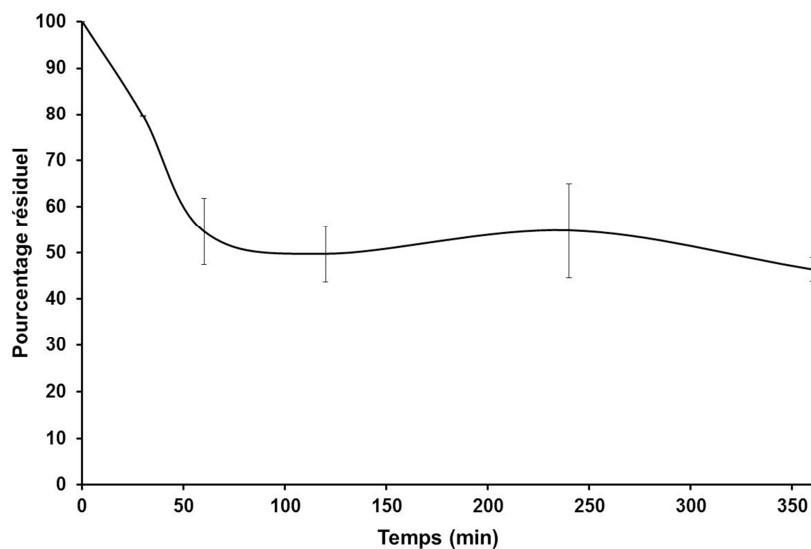


Fig. IV.31.: Stabilité sur 6h de $^{99m}\text{Tc-51}$ en plasma murin à 37°C en concentration nanomolaire.

Pour des raisons de temps, il n'a pas été possible d'étudier plus avant ce phénomène de palier comme nous l'avons fait pour $\text{TriaS-}^{99m}\text{Tc}$ et d'étudier le comportement en plasma murin des complexes $^{99m}\text{Tc-51b}$ et $^{99m}\text{Tc-53}$.

En conclusion, il semble que l'ajout de deux groupes fonctionnels supplémentaires au complexe $\text{TriaS-}^{99m}\text{Tc}$, en l'occurrence un motif guanidinium et un motif carboxylate permettant de mimer un tripeptide RGD, ne modifie pas de façon significative les propriétés du complexe bien qu'il soit tout de même moins stable en plasma murin que $\text{TriaS-}^{99m}\text{Tc}$.

D'une part, la complexation de ^{99m}TcO par le ligand fonctionnalisé reste quantitative : tout le ^{99m}Tc est complexé en 5 min à température ambiante. 93% de l'activité est observée pour un signal majoritaire constitué de deux pics attribuables à deux diastéréomères potentiels.

D'autre part, après 6h d'incubation, il reste environ 50% de complexe $^{99m}\text{Tc-51a}$ en solution dans le plasma. Il est possible que les chaînes latérales entraînent une prise en charge

accrue par les protéines plasmatique, aucun produit de dégradation notable n'étant mis en évidence. Ce phénomène n'est pas forcément un inconvénient puisque comme nous l'avons vu au chapitre III, ces protéines peuvent permettre le transport des traceurs et les protéger de la dégradation par des composés endogènes. En particulier la sérumalbumine, qui peut être dégradée au niveau de la tumeur, pourrait permettre d'entraîner le traceur jusqu'à sa cible. Ce phénomène est d'ailleurs utilisée dans certains travaux pour la vectorisation de traceurs [74].

Nous avons montré que la structure TriaS peut être facilement fonctionnalisée sans affecter son aptitude à complexer le cœur oxotechnétium pour conduire à des traceurs intégrés. Elle confirme donc son potentiel pour le développement de traceurs *in vivo* visant les intégrines grâce à des fonctionnalisations variées. Il reste désormais à tester *in vitro* ces différents composés. Pour des raisons de temps, les tests d'inhibition n'ont pu être réalisés avant la fin de la thèse.

IV.4.2. Développement de traceurs bifonctionnels de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

IV.4.2.a Principe et contexte

Parmi les techniques de développement de traceurs d'une cible thérapeutique particulière, l'approche bifonctionnelle consiste à relier une structure complexant un radioélément (ici le technétium) à une biomolécule ayant une affinité reconnue pour la cible. Nous souhaitons ici illustrer l'intérêt de TriaS-^{99m}Tc dans la préparation de ces complexes. La structure TriaS présente en effet l'avantage de permettre l'utilisation de chimie-click pour la relier à la biomolécule ou pour introduire un motif variable orientant la biodistribution et la voie d'excrétion (Fig.32.). Ce motif, de longueur

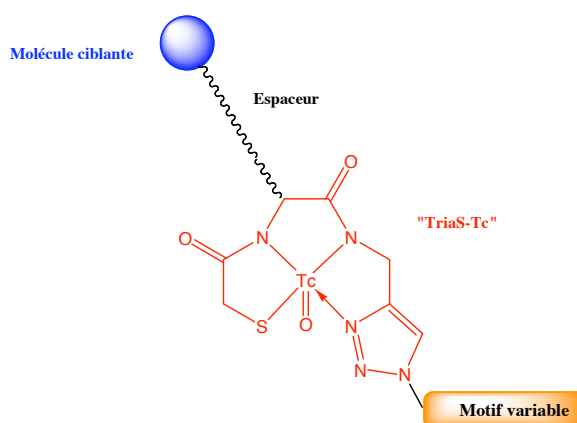
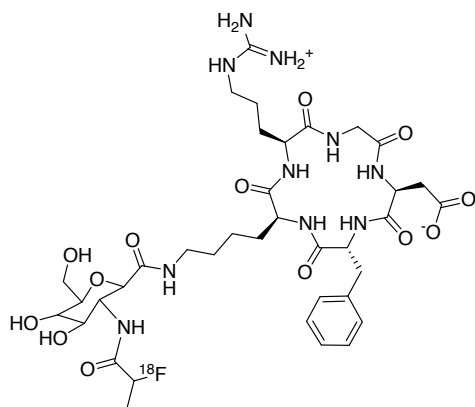


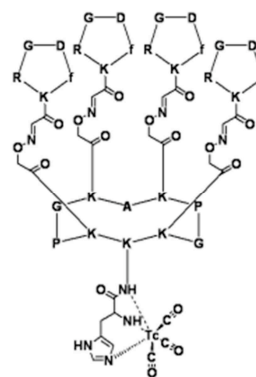
Fig. IV.32. : Traceurs bifonctionnels construits sur la structure TriaS-Tc

et de nature variables, pourra être relié simplement à la structure TriaS grâce à la réaction de cycloaddition de Huisgen, permettant ainsi l'étude de nombreux composés, rapidement et à moindre coût. Parmi les motifs envisageables figurent, de façon non exhaustive, les polyéthylènes glycols de longueurs variables, les glucides, les peptides, les polyamides, voire des chaînes polyalkyles.

En particulier, les polyéthylènes glycols sont régulièrement employés pour augmenter la solubilité des composés, leur stabilité en milieu biologique, ou leur mode d'excrétion [75]. Ils peuvent être utilisés en tant qu'espaces dans les approches BFCA ou multimériques [76], mais certaines études l'introduisent en tant que chaîne latérale [77]. C'est cette technique que nous avons choisi d'utiliser en introduisant par chimie-click un polyéthylène glycol (n=6) présentant une extrémité azoture. L'utilisation de glucides est également assez répandue. Un exemple significatif est celui du ^{18}F -Galacto-RGD (Fig. 33.A.) qui est étudié pour l'imagerie tumorale. L'emploi d'un sucre a permis d'augmenter considérablement l'élimination du traceur par la voie urinaire tout en réduisant l'accumulation résiduelle dans les muscles. Des images présentant un meilleur contraste sont ainsi obtenues [78].



(A) [^{18}F]Galacto-c(RGDfK)



(B) tetramère à structure RAFT

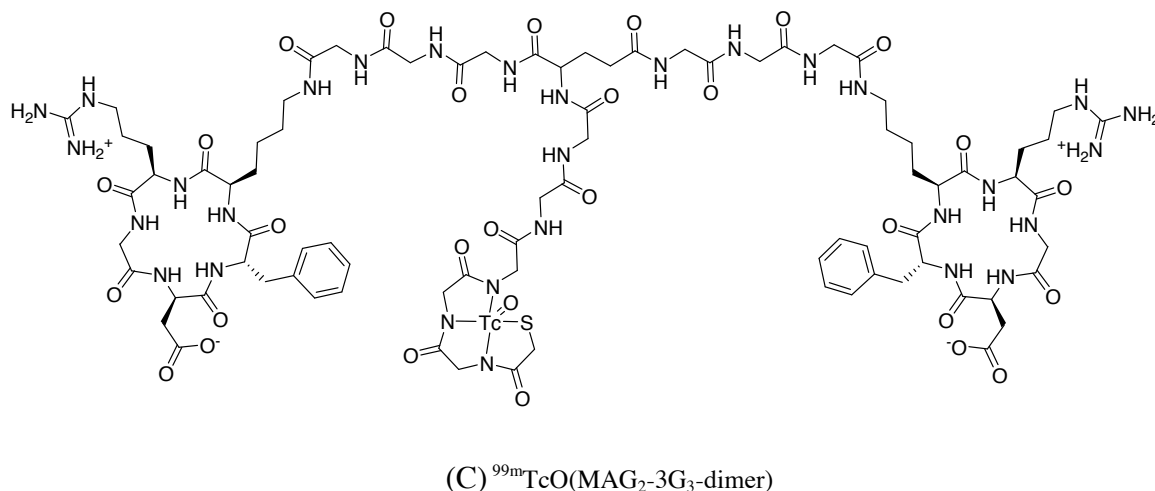


Fig. IV.33.: Diverses applications des cyclopentapeptides c(RGDfK) pour l'imagerie PET (A) et SPECT (B et C).

Le choix de la molécule ciblante est très large. Comme nous l'avons décrit, de nombreux ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont été identifiés présentant de bonnes affinités et une sélectivité intéressante pour cette intégrine par rapport à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Parmi ceux-ci, nous avons choisi d'utiliser le cyclopentapeptide c(RGDfV) qui présente l'intérêt d'être très documenté [48, 57, 79-81] et est bien connu au laboratoire [64, 73].

Les travaux de Kessler *et coll* ont montré que la nature du résidu situé en position 5 du cycle n'a pas d'influence sur l'inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ce résultat est fondamental puisqu'il rend possible l'insertion sur cette position d'un acide aminé à longue chaîne latérale tel que la lysine ou le glutamate. Ainsi le cyclopentapeptide c(RGDfK) a-t-il été très utilisé afin de développer des approches bifonctionnelles comme l'illustre la figure IV.30. Des multimères de c(RGDfK) visant les clusters d'intégrines et ayant une affinité supérieure à celle du monomère dans de nombreux cas sont également développés (Fig. IV.33.C) [57, 79, 80].

Des chassis cyclodécapeptidiques RAFT (Regioselectively Adressable Functionalised Template) présentant deux faces fonctionnalisables ont également été conçus [82]. Ils permettent d'une part la fixation de quatre motifs c(RGDfK) via un linker variable (comme par exemple un noyau triazole introduit par chimie-click [83]) et d'autre part l'introduction d'une structure

complexant un radioélément (Fig. IV.33.B.) tel que le ^{64}Cu pour l'imagerie PET [84, 85] ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pour l'imagerie SPECT [86, 87].

Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer les capacités du complexe TriaS- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ en tant que structure chélatante dans le cadre d'une approche bifonctionnelle avec les cyclopentapeptides c(RGDfK) ou c(RGDf(N-Me)K) servant de molécule ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

IV.4.2.b. Structures envisagées et méthodes de synthèse

Afin de montrer les possibilités de TriaS en termes d'approche bifonctionnelle, nous avons envisagé plusieurs possibilités indiquées à la figure IV.34.

La première possibilité consiste à relier la structure TriaS au cyclopentapeptide en mettant à profit la chimie-click (Fig. IV.34.gauche). Dans ce cas, TriaS n'est qu'un élément chélatant pouvant s'adapter à diverses structures préexistantes notamment en réagissant en solution.

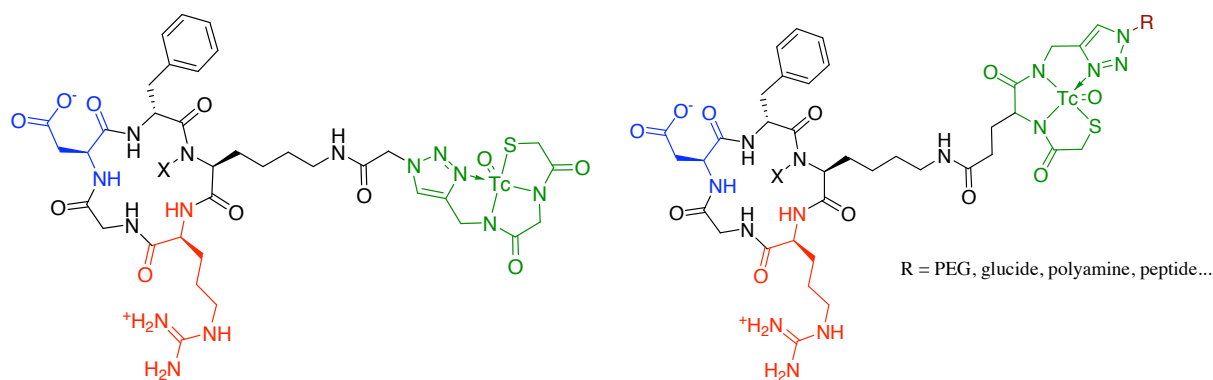


Fig. IV.34. : Illustration de la diversité de traceurs bifonctionnels réalisables grâce à TriaS (X = H ou Me)

Une seconde possibilité consiste à relier TriaS au cyclopentapeptide en utilisant un acide aminé à chaîne latérale longue tel que l'acide glutamique. Ainsi, le noyau triazole est disponible pour permettre l'introduction par chimie-click d'une structure orientant la biodistribution du composé tel qu'un polyéthylène glycol (PEG) de longueur variable, ou un sucre (Fig. IV.34.droite). TriaS présente ainsi l'avantage par rapport à d'autres structures complexantes de

pouvoir faire varier à volonté sa chaîne latérale. Cette variation est réalisée par chimie-click qui est une chimie simple et permet une approche combinatoire introduite à la dernière étape de la synthèse du ligand. Il est donc possible de réaliser cette synthèse intégralement sur phase solide. TriaS satisfait donc, à priori, à tous les critères pour le développement de chimiothèques de traceurs bifonctionnels par chimie combinatoire.

IV.4.2.c. Synthèse des cyclopentapeptides c(RGDfK) et c(RGDf(N-Me)K)

Les cyclopentapeptides utilisés ont été préparés sur support solide en stratégie Fmoc d'après le schéma de synthèse indiqué à la figure IV.36. Le premier acide aminé, Fmoc-Asp(OAll)-OH est greffé sur une résine Wang par la méthode de l'anhydride symétrique afin d'obtenir la résine **54**. La chaîne peptidique est alors allongée par les couplages successifs des acides aminés Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, et Fmoc-Lys(Mmt)-OH pour conduire à la résine **55**. La N-méthylation de l'amine terminale est alors effectuée en 3 étapes selon le protocole de Kessler *et coll* [47, 88, 89] qui est une version optimisée en temps et coût de réactifs de la procédure décrite par Miller *et coll* [90]. Ce protocole consiste, après clivage du Fmoc, à protéger l'amine terminale par le groupement *ortho*-nitrobenzène sulfonyle (o-NBS). La N-méthylation est réalisée à l'aide de sulfate de diméthyle puis la protection o-NBS est retirée par traitement au mercaptoéthanol. La résine **55b** est alors obtenue. Après couplage de la Fmoc-(D)-Phe-OH (**56** et **56b**), la protection OAll est retirée dans des conditions douces par le tetrakis(triphenyl)phosphine palladium Pd(PPh₃)₄ et l'acide acétique en présence de N-méthylmorpholine pour donner les résines (**57** et **57b**). L'élimination de la protection Fmoc N-terminale puis la cyclisation par action de HATU mène au c(RGDfK) (**58**) et au c(RGDf(N-Me)K) (**58b**) tous deux greffés sur support. Lors de cette double synthèse, un suivi par masse (MALDI/TOF) a été réalisé après chaque couplage d'acide aminé sur un aliquot de résine décroché. Le suivi par test de Kaiser est rendu impossible par la présence du groupement protecteur Mmt qui n'est pas stable dans les conditions expérimentales de ce test (notamment le chauffage à 110°C).

Les deux cyclopentapeptides **58** et **58b** ont ainsi pu être obtenus et caractérisés en masse (MALDI-TOF) : $m/z = 604.2 [MH^+]$ et $618.3 [MH^+]$ respectivement (Fig. IV.35.).

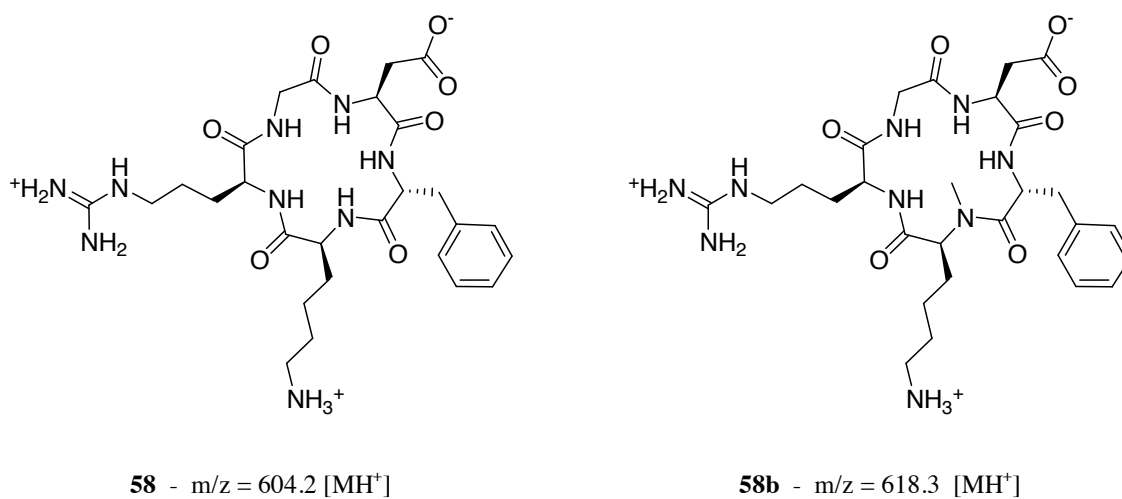


Fig. IV.35. : Le cyclopentapeptide c(RGDfK) (**58**) et sa forme N-méthylée (**58b**)

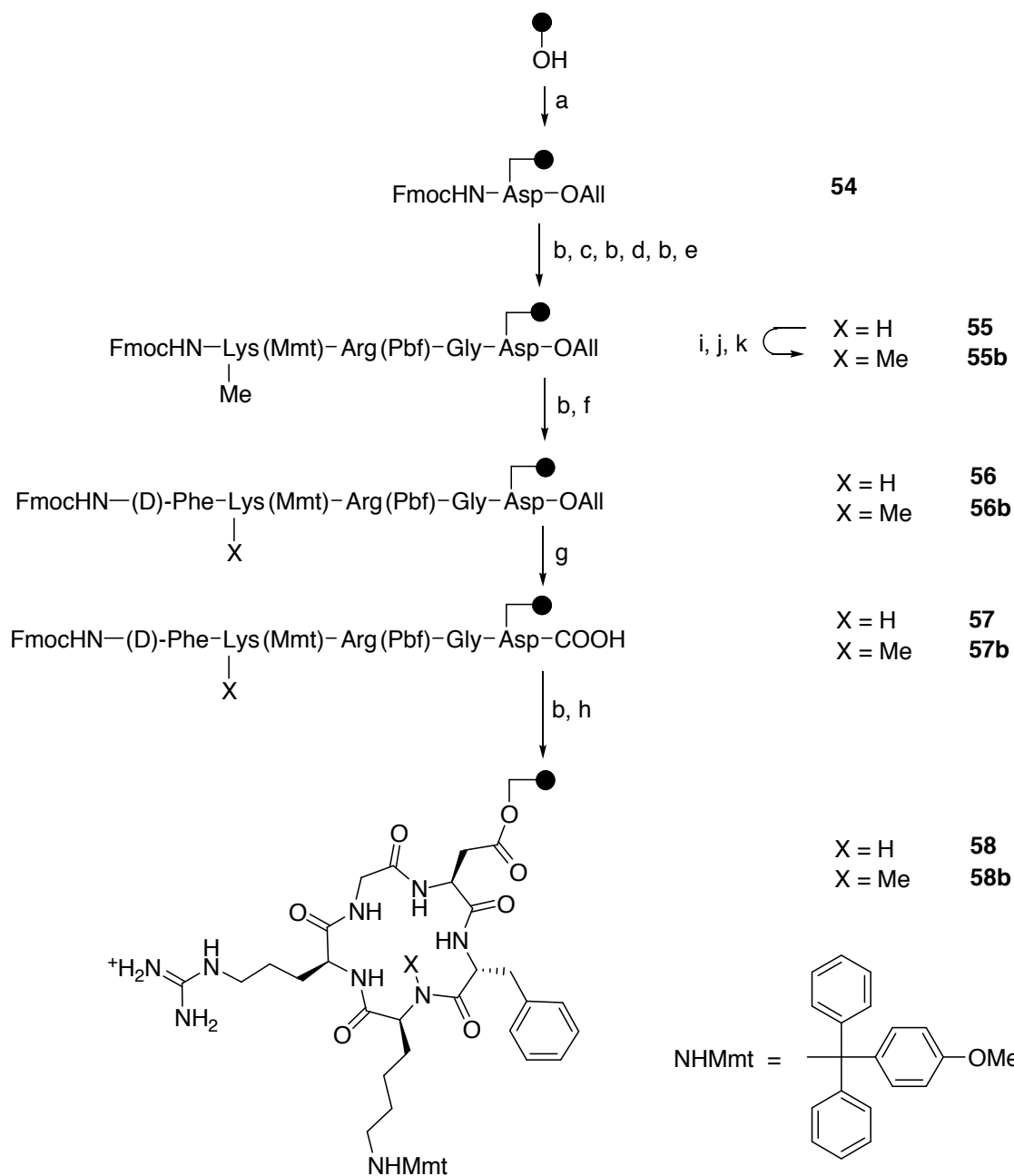


Fig. IV.36.: Synthèse sur support des peptides c(RGDfK) et c(RGDf(N-Me)K). a) FmocAsp(OAll)OH, DIC, DMAP, DCM/DMF (1/2), rt, 24h ; b) DMF/Pipéridine (4/1), rt, 5 min, 5x ; c) FmocGlyOH, DIC, DIPEA, NMP, rt, 24h ; d) FmocArg(Pbf)OH, DIC, DIPEA, NMP, rt, 24h ; e) FmocLys(Mmt)OH, DIC, DIPEA, NMP, rt, 24h ; f) Fmoc-(D)-PheOH, DIC, DIPEA, NMP, rt, 24h ; g) tetrakis-triphenylphosphine palladium, AcOH, NMM, CHCl₃, rt, 24h ; h) HAUT, DIPEA, NMP, rt, 24h ; i) o-NBS-Cl, collidine, NMP, rt, 15 min, 3x ; j) 1)DBU, NMP – 2)(CH₃)₂SO₄, NMP x2 ; k) mercaptoethanol, DBU, NMP, rt, 5 min, 2x

IV.4.2.c. Synthèse du traceur bifonctionnel c(RGDfK)-Lys-TriaS-PEG

Pour la suite de cette étude, nous nous sommes uniquement intéressé, pour des raisons de temps, à la réalisation d'un traceur bifonctionnel à partir du cyclopeptide non méthylé **58**. Dans cet exemple, le traceur présentera un motif polyéthylèneglycol permettant d'orienter sa biodistribution. Nous avons choisi le *O*-(2-Aminoethyl)-*O'*-(2-azidoethyl)-pentaéthylène glycol ou azido-PEG-NH₂ (n=6) qui est un polyéthylèneglicol présentant déjà la fonction azoture et pourra donc être introduit par chimie-click. Nous le désignerons par la suite par PEG-N₃ (Fig. IV.37.).

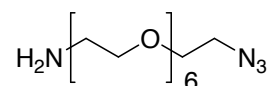


Fig. IV.37. : Structure de PEG-N₃

L'objectif initial était la préparation du complexe c(RGDfK)-^{99m}TcTriaS-PEG indiqué à la figure IV.38.

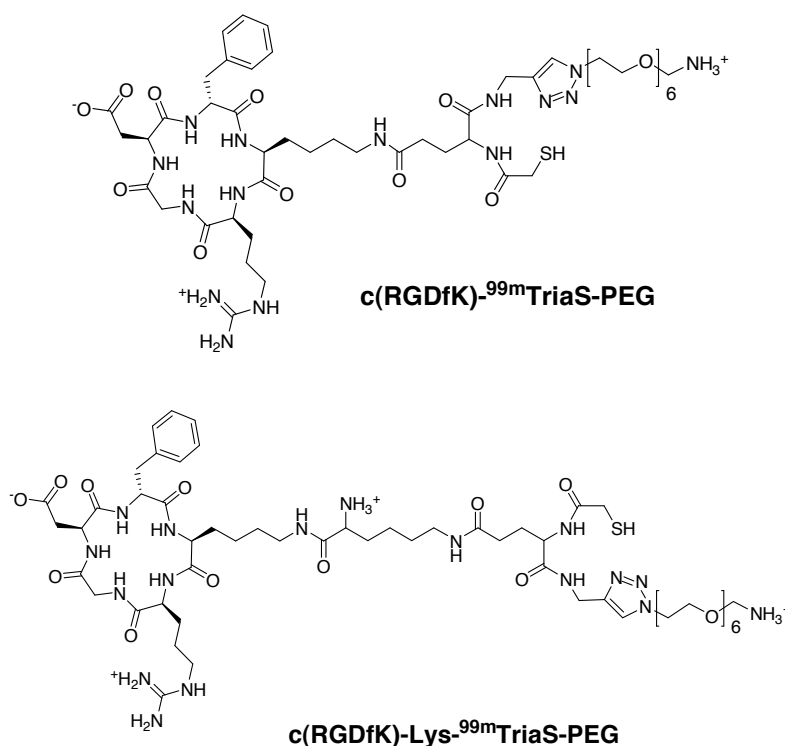


Fig. IV.38. : Les deux traceurs successivement envisagés : l'ajout d'un espaceur (lysine) rend possible la construction de la structure chélatante dérivée de TriaS.

Dans ce complexe, la structure TriaS comporte un motif acide glutamique à la place de la glycine. La fonction acide carboxylique libre ainsi ajoutée permet de relier la structure au cyclopentapeptide par couplage peptidique. Le composé **60** qui sera couplé à la résine est préparé au préalable en solution par couplage de la propargylamine sur l'acide glutamique (Fig. IV.39.).

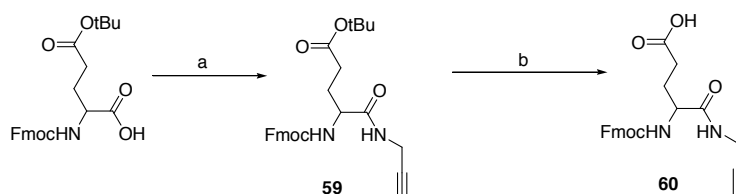


Fig. IV.39. : Préparation du synthon **60**. a) Propargylamine, DCC, Cl-HOBt, DIPEA, DCM, rt, 24h ; b) TFA/DCM, rt, 30 min.

Malheureusement, nous avons constaté que le couplage ultérieur de l'acide mercaptoacétique préalablement tritylé **15** n'était pas obtenu (Fig. IV.40). Une raison de cet échec pourrait être la gêne stérique exercée par l'importante structure c(RGDfK) très proche, au sein du polymère de la résine.

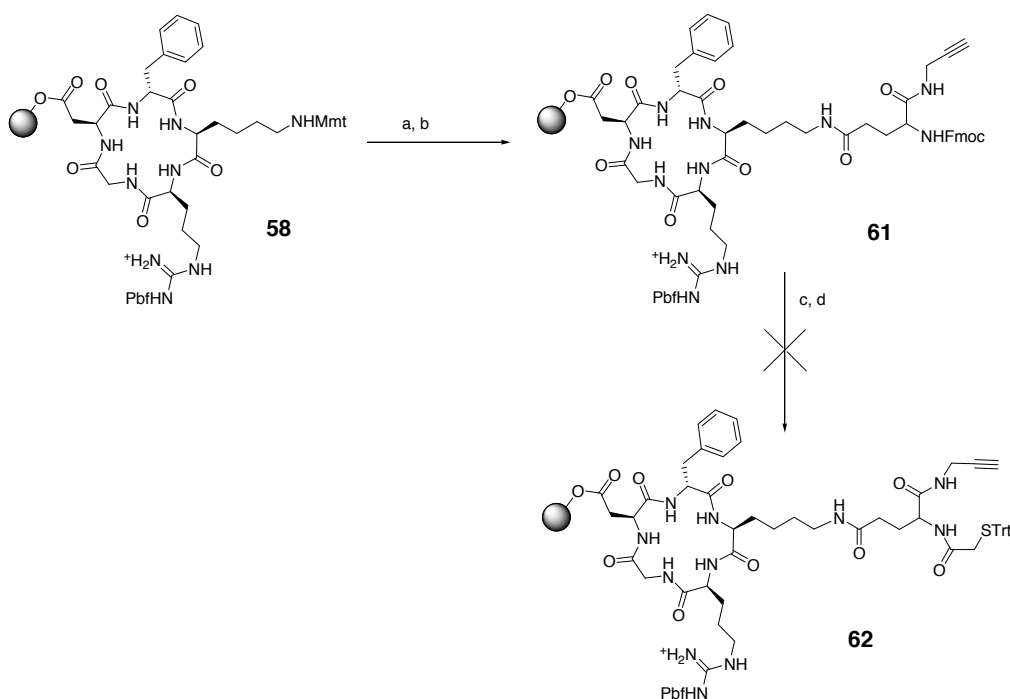


Fig. IV.40. : Tentative de préparation du ligand c(RGDfK)-TriaS. a) Cl-HOBt (0.6 M), DCM/TFE, rt, 2x 30 min;

b) **60**, DIC, DIPEA, NMP, rt, 24h ; c) DMF/Pipéridine (4/1), rt, 5x 5 min ; d) **15**, HATU, DIPEA, NMP, rt, 24h.

Afin de résoudre ce problème de synthèse, nous avons choisi d'ajouter un espaceur entre les deux parties du traceur pour de limiter les phénomènes de gênes stériques. Nous avons donc utilisé une lysine qui présente l'avantage d'introduire une chaîne de 7 liaisons et également une fonction amine latérale qui devrait améliorer la solubilité et compenser l'effet hydrophobe de la chaîne alkyle. La synthèse du complexe $c(\text{RGDfK})\text{-Lys-}^{99\text{m}}\text{TcTriaS-PEG}$ est décrite à la Figure IV.41.

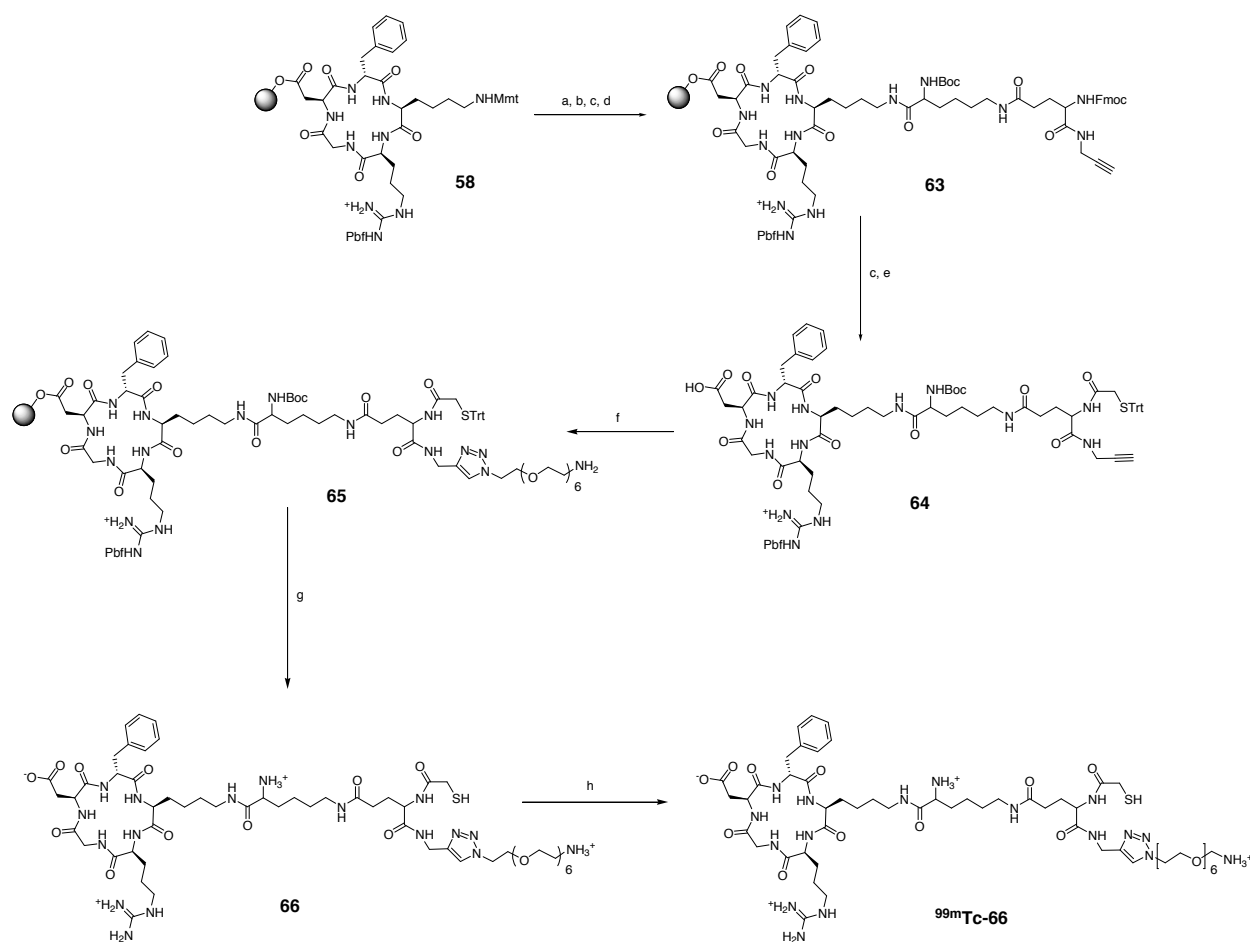


Fig. IV.41. : Synthèse de $c(\text{RGDfK})\text{-Lys-}^{99\text{m}}\text{TcTriaS-PEG}$. a) Cl-HOBt (0.6 M), DCM/TFE, rt, 2x 30 min; b) BocLysOH, DIC, HOBt, NMP, DIPEA, rt, 24h ; c) DMF/Pipéridine (4/1), rt, 5x 5 min ; d) **60**, DIC, DIPEA, NMP, rt, 24h ; e) **15**, HATU, DIPEA, NMP, rt, 24h ; f) Cycloaddition de Huisgen (Procédure n°2) : PEG-N₃ (Fig. IV.37.), Cu(II), MW, NMP, 80°C, 30 min ; g) TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5) ; h) Na $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$, SnCl₂, NaOH, H₂O, rt, 5 min.

Dans un premier temps, la résine **58** a été déprotégée dans des conditions douces (CIHOBt (0.6M), AcOH, NMM, rt, 2x 30 min) de façon à retirer le groupement protecteur Mmt sans cliver la résine ou supprimer en partie la protection Pbf de l'arginine. La chaîne est alors allongée par couplage de la Boc-Lys(Fmoc)-OH. Parallèlement, le composé **60** est synthétisé par une méthode classique en utilisant l'acide glutamique à la place de la glycine (Fig. IV.39.). La fonction acide carboxylique permet de greffer **60** sur la résine conduisant au composé **63**. La structure TriaS est ensuite constituée par couplage peptidique de l'acide mercaptoacétique tritylé **15**. La réaction de Huisgen avec le PEG-N₃ permet de conduire au composé **65**. Après déprotection et clivage par acidolyse, le ligand **66** devait ainsi être engagé dans la complexation du cœur oxotechnétium pour conduire à c(RGDfK)-Lys-^{99m}Tc-TriaS-PEG (^{99m}Tc-**66**). Malheureusement, à l'heure de la rédaction de ce manuscrit, la résine **65** n'a pu être obtenue de façon suffisamment propre. Suite à l'analyse par MALDI-TOF d'un aliquot décroché de cette résine, le composé **66** a pu être identifié (m/z = 1323 [MH⁺]), mais les conditions opératoires, et en particulier celles de la cycloaddition de Huisgen sur support solide, doivent être optimisées avant de pouvoir obtenir un produit suffisamment propre avec de bons rendements, qui pourra être utilisé pour la complexation.

A l'heure de la rédaction de ce manuscrit, les deux cyclopentapeptides greffés sur résine **58** et **58b** ont été produits ainsi que le composé **64**. La suite de la synthèse est actuellement en cours d'optimisation afin d'obtenir le complexe c(RGDfK)-Lys-^{99m}TcTriaS-PEG. Ces deux complexes pourront alors être évalués comme traceurs *in vitro* afin de déterminer si la conjugaison du groupement TriaS-Tc substitué par un PEG modifie ou non l'affinité du cyclopentapeptide pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

IV.5. Conclusion

L'objectif de l'étude menée dans ce chapitre était d'illustrer et évaluer le potentiel de TriaS pour le développement de traceurs *in vivo* de diverses cibles thérapeutiques. Nous avons choisi de nous intéresser au ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, domaine déjà bien étudié au sein du laboratoire pour l'imagerie moléculaire du cancer.

La première approche envisagée consistait en la réalisation de traceurs intégrés mimes de RGD construits à partir de la structure TriaS par introduction d'un motif guanidinium et d'un mime d'aspartate via la chimie-click. Des mimes linéaires et benzyliques ont été étudiés. Tous ont conduit à la formation quantitative du complexe dans les conditions simples de marquage détaillées au chapitre III de ce manuscrit (5 min, rt). Parmi ces composés nous avons étudié plus en détail le complexe $^{99m}\text{Tc-51a}$. Ce complexe présente une stabilité *in vitro* à concurrence de 50% après 6h d'incubation en plasma murin. Bien qu'il ne s'agisse que d'une étude préliminaire, ce premier exemple illustre la simplicité avec laquelle il est possible de faire varier la structure de TriaS par chimie combinatoire grâce à la chimie-click. En effet, divers autres groupements ont pu être introduits par cette stratégie.

La seconde approche consistait à développer des traceurs bifonctionnels construits à partir du cyclopentapeptide c(RGDfK) largement décrit dans la littérature. Dans ces composés, un motif lysine a été utilisé afin de permettre la conjugaison du cyclopeptide au motif chélatant. Ici, l'utilisation de la chimie-click permet de faire varier à volonté le substituant du noyau triazole permettant d'introduire à priori très simplement des motifs influençant la biodistribution ou l'excrétion (PEG, glucides, ...). Ces composés sont actuellement en cours de caractérisation. Bien entendu, avant de pouvoir conclure sur la réelle validité de la stratégie, il sera nécessaire de développer différentes applications.

Il reste à présent à tester l'affinité de ces différents composés pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, et $\alpha_v\beta_5$. Compte tenu de l'utilisation d'échistatine iodée [^{125}I], relativement instable et difficile à préparer et manipuler, nous avons préféré cumuler les différents tests qui n'ont pu être réalisés avant la fin de la thèse.

IV.6. Références bibliographiques

1. Cooperberg, M.R., P.R. Carroll, and L. Klotz, *Active Surveillance for Prostate Cancer: Progress and Promise*. Journal of Clinical Oncology, 2011.
2. Shao, Y.H., et al., *The impact of PSA testing frequency on prostate cancer incidence and treatment in older men*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2011.
3. Evans, C., et al., *Neonatal plasma TSH – estimated upper reference intervals for diagnosis and follow up of congenital hypothyroidism*. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 2011. **71**(5): p. 394-398.
4. Molinaro, E., et al., *Recombinant human TSH (rhTSH) in 2009: new perspectives in diagnosis and therapy*. Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2009. **53**(5): p. 490-502.
5. Al-Shuneigat, J., S. Mahgoub, and F. Huq, *Colorectal carcinoma: nucleosomes, carcinoembryonic antigen and ca 19-9 as apoptotic markers; a comparative study*. Journal of Biomedical Science, 2011. **18**(1): p. 50.
6. González, G.P., et al., *Phase I Clinical Trial of the ¹³¹I-Labeled Anticarcinoembryonic Antigen CIGB-M3 Multivalent Antibody Fragment*. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 2011. **26**(3): p. 353-363.
7. Radu, A., et al., *Expression of Follicle-Stimulating Hormone Receptor in Tumor Blood Vessels*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(17): p. 1621-1630.
8. García-Román, J., et al., *VEGF secretion during hypoxia depends on free radicals-induced Fyn kinase activity in mast cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010. **401**(2): p. 262-267.
9. Egger, M., et al., *Hypoxia up-regulates the angiogenic cytokine secretoneurin via an HIF-1 α - and basic FGF-dependent pathway in muscle cells*. The FASEB Journal, 2007. **21**(11): p. 2906-2917.
10. Vaupel, P. and L. Harrison, *Tumor Hypoxia: Causative Factors, Compensatory Mechanisms, and Cellular Response*. The Oncologist, 2004. **9**(suppl 5): p. 4-9.
11. Brooks, P., R. Clark, and D. Cheresh, *Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis*. Science, 1994. **264**(5158): p. 569-571.
12. Xiong, J.-P., et al., *Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin $\alpha_v\beta_3$* . Science, 2001. **294**(5541): p. 339-345.
13. Bennett, J.S., *Structure and function of the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$* . The Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(12): p. 3363-3369.
14. Ye, F., C. Kim, and M.H. Ginsberg, *Molecular mechanism of inside-out integrin regulation*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2011. **9**: p. 20-25.

15. Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti, *Integrin Signaling*. Science, 1999. **285**(5430): p. 1028-1033.
16. Mas-Moruno, C., F. Rechenmacher, and H. Kessler, *Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate. Design, synthesis and clinical evaluation*. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2010. **10**: p. 753-768.
17. Frisch, S. and H. Francis, *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis*. The Journal of Cell Biology, 1994. **124**(4): p. 619-626.
18. Felding-Habermann, B., et al., *Involvement of tumor cell integrin $\alpha_v\beta_3$ in hematogenous metastasis of human melanoma cells*. Clinical and Experimental Metastasis, 2002. **19**(5): p. 427-436.
19. Clezardin, P., *Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis*. Cellular and Molecular Life Sciences, 1998. **54**(6): p. 541-548.
20. Huttenlocher, A., R. Sandborg, and A. Horwitz, *Adhesion in cell migration*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(7): p. 697-706.
21. Yang, J.T., H. Rayburn, and R.O. Hynes, *Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development*. Development, 1995. **121**(2): p. 549-560.
22. Eliceiri, B.P. and D.A. Cheresh, *The role of α_v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development*. The Journal of Clinical Investigation, 1999. **103**(9): p. 1227-1230.
23. Reynolds, L.E., et al., *Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking β_3 integrin or β_3 and β_5 integrins*. Nat Med, 2002. **8**(1): p. 27-34.
24. Mizejewski, G., *Role of integrins in cancer: survey of expression patterns*. Proceedings of the society for experimental biology and medicine, 1999. **222**(2): p. 124-138.
25. Rust, W.L., S.W. Carper, and G.E. Plopper, *The Promise of Integrins as Effective Targets for Anticancer Agents*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2002. **2**(3): p. 124-130.
26. Jin, H. and J. Varner, *Integrins: roles in cancer development and as treatment targets*. Br J Cancer, 2004. **90**(3): p. 561-565.
27. Haubner, R., *$\alpha_v\beta_3$ -integrin imaging: a new approach to characterise angiogenesis?* European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2006. **33**(0): p. 54-63.
28. Matter, A., *Tumor angiogenesis as a therapeutic target*. Drug Discovery Today, 2001. **6**(19): p. 1005-1024.
29. Berry, M.G., et al., *Integrin expression and survival in human breast cancer*. European Journal of Surgical Oncology, 2004. **30**(5): p. 484-489.
30. Vonlaufen, A., et al., *Integrin $\alpha_v\beta_3$ Expression in Colon Carcinoma Correlates with Survival*. Mod Pathol, 2001. **14**(11): p. 1126-1132.

31. Ruoslahti, E., *The RGD story: a personal account*. Matrix Biology, 2003. **22**(6): p. 459-465.
32. Xiong, J.-P., et al., *Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin $\alpha_v\beta_3$ in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand*. Science, 2002. **296**(5565): p. 151-155.
33. Corti, A. and F. Curnis, *Isoaspartate-dependent molecular switches for integrin-ligand recognition*. Journal of Cell Science, 2011. **124**(4): p. 515-522.
34. Millard, M., S. Odde, and N. Neamati, *Integrin targeted therapeutics*. Theranostics, 2011(1): p. 154-188.
35. Niu, G. and X. Chen, *Why integrin as a primary target for imaging and therapy*. Theranostics, 2011. **1**(1): p. 30-47.
36. Heckmann, D., et al., *Breaking the Dogma of the Metal-Coordinating Carboxylate Group in Integrin Ligands: Introducing Hydroxamic Acids to the MIDAS To Tune Potency and Selectivity*. Angewandte Chemie International Edition, 2009. **48**(24): p. 4436-4440.
37. Shiu, J.-H., et al., *Solution structure of γ -bungarotoxin: The functional significance of amino acid residues flanking the RGD motif in integrin binding*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2004. **57**(4): p. 839-849.
38. Cacciari, B. and G. Spalluto, *Non peptidic $\alpha_v\beta_3$ antagonists: recent developments*. Current Medicinal Chemistry, 2005. **12**: p. 51-70.
39. Stupp, R., et al., *Phase I/IIa Study of Cilengitide and Temozolomide With Concomitant Radiotherapy Followed by Cilengitide and Temozolomide Maintenance Therapy in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(16): p. 2712-2718.
40. Vermorken, J.B., et al., *Phase III trial of cilengitide with cetuximab, cisplatin and 5-fluorouracil in recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck: findings of the phase I part*. Br J Cancer, 2011. **104**(11): p. 1691-1696.
41. Chen, Y., et al., *LYG-202, a Newly Synthesized Flavonoid, Exhibits Potent Anti-angiogenic Activity In Vitro and In Vivo*. Journal of Pharmacological Sciences, 2010. **112**(1): p. 37-45.
42. Tsai, M.-Y., et al., *Anti-angiogenic effect of Tanshinone IIA involves inhibition of matrix invasion and modification of MMP-2/TIMP-2 secretion in vascular endothelial cells*. Cancer letters, 2011. **310**(2): p. 198-206.
43. Limam, I., et al., *Leberagin-C, A disintegrin-like/cysteine-rich protein from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits $\alpha_v\beta_3$ integrin-mediated cell adhesion*. Matrix Biology, 2010. **29**(2): p. 117-126.
44. Wang, W.-J., *Acurhagin-C, an ECD disintegrin, inhibits integrin $\alpha_v\beta_3$ -mediated human endothelial cell functions by inducing apoptosis via caspase-3 activation*. British Journal of Pharmacology, 2010. **160**(6): p. 1338-1351.

45. Psimadas, D., et al., *Study of the labeling of two novel RGD-peptidic derivatives with the precursor [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ and evaluation for early angiogenesis detection in cancer*. Applied Radiation and Isotopes, 2006. **64**(2): p. 151-159.
46. Haubner, R., et al., *Structural and Functional Aspects of RGD-Containing Cyclic Pentapeptides as Highly Potent and Selective Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonists*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(32): p. 7461-7472.
47. Chatterjee, J., et al., *N-Methylation of Peptides: A New Perspective in Medicinal Chemistry*. Accounts of Chemical Research, 2008. **41**(10): p. 1331-1342.
48. Dechantsreiter, M.A., et al., *N-Methylated Cyclic RGD Peptides as Highly Active and Selective $\alpha_v\beta_3$ Integrin Antagonists*. Journal of Medicinal Chemistry, 1999. **42**(16): p. 3033-3040.
49. Taga, T., et al., *α_v -Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin*. International Journal of Cancer, 2002. **98**(5): p. 690-697.
50. Eskens, F.A.L.M., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins [α]_v[β]₃ and [α]_v[β]₅ in patients with advanced solid tumours*. European Journal of Cancer, 2003. **39**(7): p. 917-926.
51. Gilbert, M., et al., *Cilengitide in patients with recurrent glioblastoma: the results of NABTC 03-02, a phase II trial with measures of treatment delivery*. Journal of Neuro-Oncology: p. 1-7.
52. Reardon, D.A., et al., *Randomized Phase II Study of Cilengitide, an Integrin-Targeting Arginine-Glycine-Aspartic Acid Peptide, in Recurrent Glioblastoma Multiforme*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(34): p. 5610-5617.
53. Alva, A., et al., *Phase II study of Cilengitide (EMD 121974, NSC 707544) in patients with non-metastatic castration resistant prostate cancer, NCI-6735. A study by the DOD/PCF prostate cancer clinical trials consortium*. Investigational New Drugs: p. 1-9.
54. Friess, H., et al., *A randomized multi-center phase II trial of angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) and gemcitabine compared with gemcitabine alone in advanced unresectable pancreatic cancer*. BMC cancer, 2006. **6**: p. 285.
55. Stupp, R., et al., *Cilengitide in newly diagnosed glioblastoma with MGMT promoter methylation: protocol of a multicenter, randomized, openlabel, controlled phase III trial (CENTRIC)*. J Clin Oncol, 2010. **28**: p. 15S.
56. Mas-Moruno, C., et al., *Increasing $\alpha_v\beta_3$ Selectivity of the Anti-Angiogenic Drug Cilengitide by N-Methylation*. Angewandte Chemie International Edition, 2011: p. n/a-n/a.
57. Zhou, Y., S. Chakraborty, and S. Liu, *Radiolabeled cyclic RGD peptides as radiotracers for imaging tumors and thrombosis by SPECT*. Theranostics, 2011(1): p. 58-82.

58. Zanardi, F., et al., *Discovery of Subnanomolar Arginine-Glycine-Aspartate-Based $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ Integrin Binders Embedding 4-Aminoproline Residues*. Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **51**(6): p. 1771-1782.
59. Lohof, E., et al., *Carbohydrate Derivatives for Use in Drug Design: Cyclic α_v -Selective RGD Peptides*. Angewandte Chemie International Edition, 2000. **39**(15): p. 2761-2764.
60. Belvisi, L., et al., *Potent Integrin Antagonists from a Small Library of RGD-Including Cyclic Pseudopeptides*. Organic Letters, 2001. **3**(7): p. 1001-1004.
61. Belvisi, L., et al., *Targeting integrins: Insights into structure and activity of cyclic RGD pentapeptide mimics containing azabicycloalkane amino acids*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006. **14**(1): p. 169-180.
62. Schmidt, J., et al., *Cyclization of Peptides through a Urea Bond: Application to the Arg-Gly-Asp Tripeptide*. ChemBioChem, 2010. **11**(8): p. 1083-1092.
63. Albrecht, M., et al., *Preparation of Tripeptide-Bridged Dicatechol Ligands and Their Macrocyclic Molybdenum(VI) Complexes: Fixation of the RGD Sequence and the WKY Sequence of Urotensin II in a Cyclic Conformation*. Chemistry – A European Journal, 2004. **10**(15): p. 3657-3666.
64. Aufort, M., et al., *Synthesis, in vitro screening and in vivo evaluation of cyclic RGD analogs cyclized through oxorhenium and oxotechnetium coordination*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2011. **46**(5): p. 1779-1788.
65. Marinelli, L., et al., *Docking Studies on $\alpha_v\beta_3$ Integrin Ligands: Pharmacophore Refinement and Implications for Drug Design*. Journal of Medicinal Chemistry, 2003. **46**(21): p. 4393-4404.
66. Marinelli, L., et al., *Human integrin $\alpha_v\beta_5$: homology modeling and ligand binding*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**: p. 4166-4177.
67. Sulyok, G.A.G., et al., *Solid-Phase Synthesis of a Nonpeptide RGD Mimetic Library: New Selective $\alpha_v\beta_3$ Integrin Antagonists*. Journal of Medicinal Chemistry, 2001. **44**(12): p. 1938-1950.
68. Aufort, M., et al., *Oxorhenium-Mediated Assembly of Noncyclic Selective Integrin Antagonists: A Combinatorial Approach*. ChemBioChem, 2011. **12**(4): p. 583-592.
69. Dayam, R., et al., *Discovery of Small Molecule Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonists as Novel Anticancer Agents*. Journal of Medicinal Chemistry, 2006. **49**(15): p. 4526-4534.
70. Strijtveen, B. and R. Kellogg, *Synthesis of (racemization prone) optically active thiols by SN2 substitution using cesium thiocarboxylates*. Journal of organic chemistry, 1986. **51**: p. 3664-3671.
71. Cui, Y., et al., *Design and synthesis of chromogenic thiopeptolide substrates as MetAPs active site probes*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004. **12**: p. 2853-2861.

72. Balducci, E., et al., *Microwave-assisted intramolecular Huisgen cycloaddition of azido alkynes derives from α -amino acids*. Journal of organic chemistry, 2009. **74**: p. 1314-1321.
73. Aufort, M., et al., *Synthesis and biochemical evaluation of a cyclic RGD oxorhenium complex as new ligand of $\alpha_v\beta_3$ integrin*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **44**(9): p. 3394-3401.
74. Kratz, F., *Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles*. Journal of Controlled Release, 2008. **132**(3): p. 171-183.
75. Pilkington-Miksa, M.A., et al., *Synthesis of Bifunctional Integrin-Binding Peptides Containing PEG Spacers of Defined Length for Non-Viral Gene Delivery*. European Journal of Organic Chemistry, 2008. **2008**(17): p. 2900-2914.
76. Schottelius, M., et al., *Ligands for Mapping $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression in Vivo*. Accounts of Chemical Research, 2009. **42**(7): p. 969-980.
77. Rerat, V., et al., *$\alpha_v\beta_3$ Integrin-Targeting Arg-Gly-Asp (RGD) Peptidomimetics Containing Oligoethylene Glycol (OEG) Spacers*. Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **52**(22): p. 7029-7043.
78. Beer, A.J., et al., *Biodistribution and Pharmacokinetics of the $\alpha_v\beta_3$ -Selective Tracer ^{18}F -Galacto-RGD in Cancer Patients*. Journal of Nuclear Medicine, 2005. **46**(8): p. 1333-1341.
79. Liu, S., *Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin $\alpha_v\beta_3$ targeted radiotracers for tumour imaging*. Molecular Pharmaceutics, 2006. **3**(5): p. 472-487.
80. Liu, S., *Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency*. Bioconjugate Chemistry, 2009. **20**(12): p. 2199-2213.
81. Su, Z.-F., et al., *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*. Bioconjugate Chemistry, 2002. **13**(3): p. 561-570.
82. Boturnyn, D., et al., *RAFT Nano-constructs: surfing to biological applications*. Journal of Peptide Science, 2008. **14**: p. 224-240.
83. Galibert, M., et al., *Application of click-click chemistry to the synthesis of new multivalent RGD conjugates*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2010. **8**: p. 5133-5138.
84. Galibert, M., et al., *RGD-cyclam conjugate: synthesis and potential application for positron emission tomography*. Bioorganic & Medicinal Chemistry letters, 2010. **20**: p. 5422-5425.
85. Jin, Z., et al., *Noninvasive visualization and quantification of tumour $\alpha_v\beta_3$ integrin expression using a novel positron emission tomography probe, ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK)₄*. Nuclear Medicine and Biology, 2011. **38**: p. 529-540.

86. Sancey, L., et al., *In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with $\alpha_v\beta_3$ integrin-targeted tracer ^{99m}Tc -RAFT-RGD*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007. **34**: p. 2037-2047.
87. Dimastromatteo, J., et al., *In vivo molecular imaging of myocardial angiogenesis using $\alpha_v\beta_3$ integrin-targeted tracer ^{99m}Tc -RAFT-RGD*. Journal of Nuclear Cardiology, 2010. **17**(3): p. 435-443.
88. Biron, E., J. Chatterjee, and H. Kessler, *Optimized selective N-methylation of peptides on solid support*. Journal of Peptide Science, 2006. **12**(3): p. 213-219.
89. Biron, E. and H. Kessler, *Convenient Synthesis of N-Methylamino Acids Compatible with Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis*. The Journal of Organic Chemistry, 2005. **70**(13): p. 5183-5189.
90. Miller, S.C. and T.S. Scanlan, *Site-Selective N-Methylation of Peptides on Solid Support*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(9): p. 2301-2302.

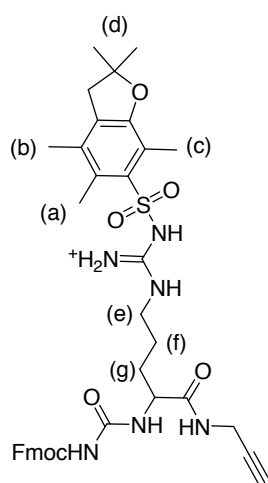
Chapitre IV – Partie expérimentale

Les procédures générales sont regroupées en annexe, en particulier les techniques de purification (HPLC), d'analyse (RMN, RP-HPLC), et de synthèse sur support solide en stratégie Fmoc.

IVe.1. Développement de traceurs intégrés de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

IVe.1.1. Synthèse du précurseur acétylénique **49**

48. La FmocArg(Pbf)OH (8.11g, 12.5 mmol, 1.0 équiv.) est dissoute dans 50 mL de DCM sec.

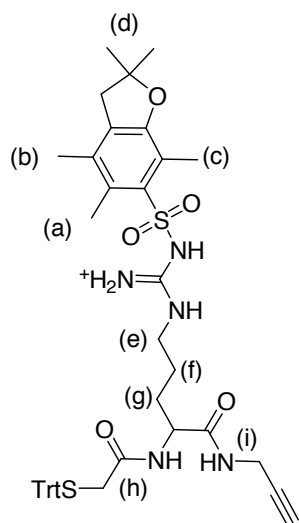


La propargylamine (0.8 mL, 12.5 mmol, 1.0 équiv.) et HOBt (2.025 g, 15.0 mmol, 1.2 équiv.) sont ajoutés puis le pH est ajusté à 8 par ajout de DIPEA. Après addition de la DIPEA (8.7 mL, 15.0 mmol, 1.2 équiv.), le DCC (3.1 g, 15.0 mmol, 1.2 équiv.) est introduit et l'ensemble est agité sous atmosphère d'argon à température ambiante pendant 24 h. On observe la formation d'un précipité blanc de DCU. La DCU est éliminée par filtration puis le DCM est évaporé et l'huile obtenue est reprise dans AcOEt puis lavée par une solution saturée de chlorure de sodium, et par une solution d'acide citrique à 10%. Les fractions organiques sont réunies et séchées au sulfate de sodium anhydre puis évaporées. Le composé (huile) obtenu est repris dans le DCM et purifiée par

chromatographie sur colonne de silice (éluant : hexane / AcOEt 20/80, révélation UV, $R_f = 0.3$). Le produit est séché une nuit sous pression réduite pour conduire à **48** sous forme d'un solide

blanc. 7.04g, 10.3 mmol, Rdt = 82%. $^1\text{H NMR (CDCl}_3)$: δ 7.72 (d, 2H, J = 6.8 Hz, CH Ar, Fmoc), 7.54 (d, 2H, J = 6.8 Hz, CH Ar, Fmoc), 7.352 (t, 2H, J = 6.5 Hz, CH Ar, Fmoc), 7.25 (d, 2H, J = 7.8 Hz, CH Ar, Fmoc), 4.27 (m, 3H, CH₂ Fmoc + Glycyl), 3.97 (s, 2H, CH₂-C \equiv CH), 3.26 (m, 2H, CH₂ Arg (e)), 2.89 (s, 2H, CH₂ Pbf), 2.57 (s, 3H, CH₃ Pbf (a)), 2.50 (s, 3H, CH₃ Pbf (c)), 2.12 (s, 1H, CH₂-C \equiv CH) ; 2.05 (s, 3H, CH₃ Pbf (b)), 1.7 – 1.5 (m, 4H, CH₂ Arg (f,g)), 1.41 (s, 3H, CH₃ Pbf (d)) ; $^{13}\text{C NMR (CDCl}_3)$: δ 158.8 (CO amide), 156.5 (CO carbamate), 143.6 – 117.6 (C Arom, Pbf + Fmoc), 86.4 (C, Pbf), 79.5 (-C \equiv CH), 71.3 (-C \equiv CH), 67.0 (CH₂ Fmoc), 49.9 (CH₂ Arg(e)), 46.9 (C, Fmoc), 43.0 (CH₂, Pbf), 28.7 (CH₂, Arg(g)), 28.5 (CH₂ Pbf(d)), 24.6 (CH₂, Arg(f)), 19.3 (CH₃, Pbf(a)), 18.0 (CH₃, Pbf(b)), 12.4 (CH₃, Pbf(c)) ; (MALDI/TOF : m/z = 419.3 [MH⁺]).

49. Le composé **48** (4.19 g, 10.0 mmol, 1.0 équiv.) est dissout dans 20 mL de DMF/Pipéridine



(4/1) et agité durant 2h à température ambiante. Le suivi de cette déprotection est assuré par CCM (éluant : hexane/AcOEt 20/80, R_f = 0.3). Le DMF est évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue (10.0 mmol, 1.0 équiv.) est reprise dans 25 mL de DCM sec et **15** (3.34 g, 10.0 mmol, 1.0 équiv.) puis HOBt (1.62 g, 12.0 mmol, 1.2 équiv.) sont ajoutés. Le pH est ajusté à 8 par ajout de DIPEA puis la DIPEA (5.8 mL, 10.0 mmol, 1.0 équiv.) est ajoutée et enfin le DCC (2.48 g, 12.0 mmol, 1.2 équiv.). Le mélange est agité durant 24 h à température ambiante sous atmosphère d'argon. On observe la formation d'un précipité blanc de DCU. La DCU est éliminée par filtration puis le DCM est évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est reprise dans l'AcOEt et lavée par une solution saturée de

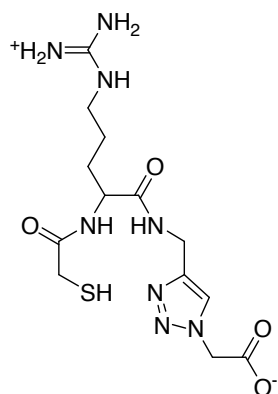
chlorure de sodium puis par une solution d'acide citrique 10%. Les fractions organiques sont regroupées, séchées et évaporées. Le produit obtenu est repris dans le DCM est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt / hexane 80/20, révélation UV). Après évaporation et séchage, le composé **49** est obtenu sous la forme d'un solide blanc. 4.48 g, 8.75 mmol, Rdt = 88%. $^1\text{H NMR (CDCl}_3)$: δ 7.89 (t, 1H, J = 2.5 Hz, NH amide (i)), 7.4 – 7.1 (m, 15H, CH Ar, Trt), 7.07 (d, 1H, J = 7.5 Hz, NH amide (h)), 4.33 (d, 1H, J = 5 Hz, CH, Glycyl) ,

3.90 (s, 1H, $\underline{\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}}$), 3.10 (m, 2H, CH_2 , $\underline{\text{Arg-e}}$), 3.03 (s, 2H, CH_2S), 2.92 (s, 2H, CH_2 , Pbf), 2.54, 2.47 (s, 3H, CH_3 Pbf x2), 2.07 (s, 4H, CH_3 Pbf (b) + $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 1.44 (s, 6H, 2 CH_3 Pbf (d)). ^{13}C NMR (CDCl_3) : δ 171.3 (CO amide (i)), 168.9 (CO amide (h)), 158.8 (C Ar, Pbf), 143.9 (C Arom, Trt), 132.2 (C Ar Pbf), 129.5-126.8 (CH Ar, Trt), 124.7 (C Ar, Pbf), 117.6 (C Ar Pbf), 86.4 (C, Pbf), 79.5 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 71.3 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 67.7 (C, Trt), 53.5 (CH_2 , Pbf), 36.17 (CH_2 , Arg (e)), 30.4 (CH_2 , Arg (g)), 28.6 (CH_3 , 2x Pbf (d)), 25.3 (CH_2 , Arg (f)), 19.39 (CH_3 , Pbf (a)), 18.0 (CH_3 , Pbf (b)), 12.4 ($-\text{CH}_3$, Pbf (c)) ; **MALDI/TOF** : $m/z = 513.2$ [MH^+].

IVe.1.2. Synthèse des ligands **51a**, **51b**, et **53**

Le composé **49** (93.6 mg, 0.12 mmol, 1.2 équiv.) est mis en solution dans l'éthanol (750 μL). La procédure n°2 (Chap. II, partie expérimentale) de cycloaddition dipolaire de Huisgen est appliquée avec les composés halogénés respectifs (0.1 mmol, 1.0 équiv.) pour conduire au ligand protégé **50a** (resp **50b**, et **52**) puis au ligand déprotégé **51a**, **51b**, et **53**.

51a. Le composé halogéné utilisé est le bromoacétate de *tert*-butyle (5.4 μL , 0.1 mmol, 1.0 équiv.). **50a** est obtenu sous forme d'une huile marron (46 mg, 48.9 μmol , Rdt = 49 %).

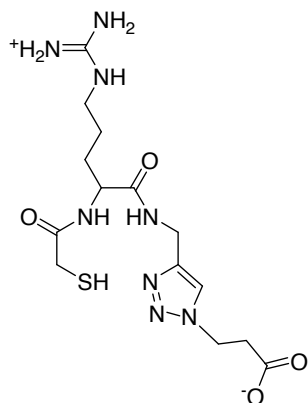


Après 1h sous agitation dans un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5), le solvant est évaporé. Le solide est repris dans un mélange eau/ACN (4/1) et purifié par RP-HPLC semi-préparative. Le produit est lyophilisé pour conduire à **51a** sous forme d'une poudre blanche (10.4 mg). **RP-HPLC analytique** : $t_R = 8.5$ min ;

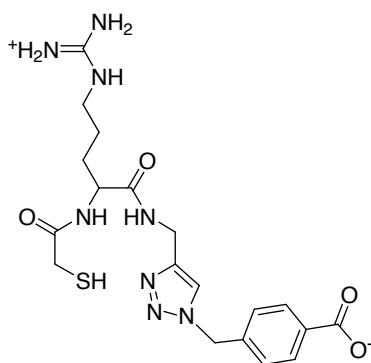
^1H NMR (MeOD) : δ 7.99 (s, 1H, NH amide), 7.81 (s, 1H, CH triazole), 5.34 (s, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{-COO}}$), 4.58 (m, 1H, $\underline{\text{CH}_2\text{-CC}}$), 4.05 –m, 1H, CH Arg), 3.31 (s, 2H, CH_2S), 1.95-1.75 (m, 6H, 3x CH_2 Arg) ; ^{13}C

NMR (MeOD) : δ 173.8, 171.8 (CO amides), 158.6 (CN, Arg), 146.1 ($\text{CH}_2\text{-C}=\text{C}$), 125.8 ($\text{CH}_2\text{-C}=\text{C}$), 54.5 ($\underline{\text{CH}_2\text{-COO}}$), 52.0 (CH, Arg), 41.9 ($\underline{\text{CH}_2\text{-C}=\text{C}}$), 35.3 (CH_2 , Arg), 30.2 (CH_2S), 26.3, 26.1 (2x CH_2 , Arg) **MALDI/TOF** : $m/z = 387.1$ [MH^+].

51b. Le composé halogéné utilisé est le bromopropionate de *tert*-butyle (12.8 μ L, 0.1 mmol, 1.0 équiv.). **50b** est obtenu sous forme d'une huile marron (32 mg, 34.0 μ mol, Rdt = 34 %). Après 1h sous agitation dans un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5), le solvant est évaporé. Le solide est repris dans un mélange eau/ACN (4/1) et purifié par RP-HPLC semi-préparative. Le produit est lyophilisé pour conduire à **51b** sous forme d'une poudre blanche (3.1 mg). **RP-HPLC analytique** : $t_R = 9.8$ min ; δ **MALDI/TOF** : $m/z = 401.1$ [MH^+].

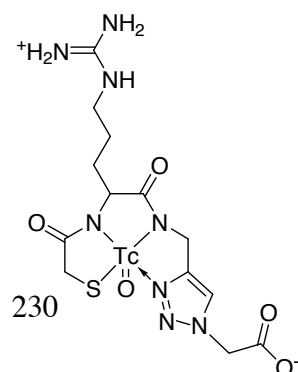


53. Le composé halogéné utilisé est l'acide *para*-bromométhylbenzoïque (21.4 mg, 0.1 mmol, 1.0 équiv.). **52** est obtenu sous forme d'un solide brun (22.1 mg, 23.0 μ mol, Rdt = 23%). Après 1h sous agitation dans un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5), le solvant est évaporé. Le solide est repris dans un mélange eau/ACN (4/1) et purifié par RP-HPLC semi-préparative. Le produit est lyophilisé pour conduire à **53** sous forme d'une poudre blanche (1.3 mg). **RP-HPLC analytique** : $t_R = 16.3$ min ; **MALDI/TOF** : $m/z = 462.1$ [MH^+].



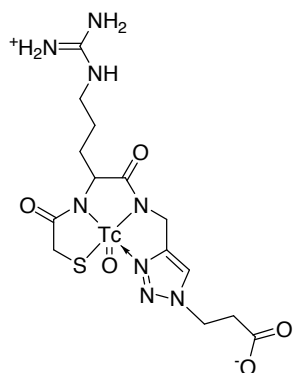
IVe.1.3. Préparation des complexes $^{99g}\text{Tc-51a}$, $^{99g}\text{Tc-51b}$, $^{99g}\text{Tc-53}$, et $^{99m}\text{Tc-51a}$

$^{99g}\text{Tc-51a}$. Le composé **51a** (20 μ g, 52 nmol, 20 μ L de solution à 1 mg/mL) est mis en solution dans 60 μ L d'eau distillée. Après ajout de 27 μ L de solution de SnCl_2 à 1 mg/ml, et 54 μ L de solution de NaOH 0.1 M, une solution de $\text{Na}^{99g}\text{TcO}_4$ est ajoutée (1.0 équiv.) et la solution est placée 5 minutes à incubation à 37°C. Après ajout de 5.4 μ L de solution d'HCL 1M, le

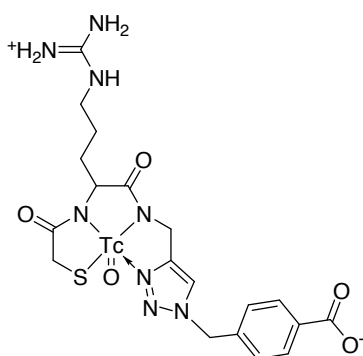


complexe est analysé par RP-HPLC. **RP-HPLC analytique** : $t_R = 11.4$ min ; **MALDI/TOF** : $m/z = 499.0$ [MH^+].

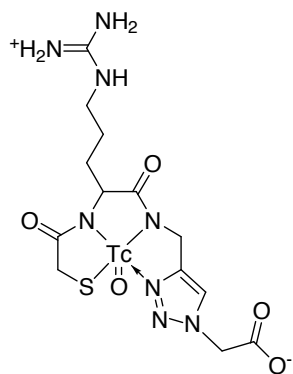
^{99g}Tc -51b. Le composé **51b** (20 μ g, 50 nmol, 20 μ L de solution à 1 mg/mL) est mis en solution dans 64 μ L d'eau distillée. Après ajout de 28 μ L de solution de $SnCl_2$ à 1 mg/ml, et 56 μ L de solution de NaOH 0.1 M, une solution de $Na^{99g}TcO_4$ est ajoutée (1.0 équiv.) et la solution est placée 5 minutes à incubation à 37°C. Après ajout de 5.6 μ L de solution d'HCL 1M, le complexe est analysé par RP-HPLC. **RP-HPLC analytique** : $t_R = 11.6$ min ; **MALDI/TOF** : $m/z = 513.0$ [MH^+].



^{99g}Tc -53. Le composé **53** (20 μ g, 43.2 nmol, 20 μ L de solution à 1 mg/mL) est mis en solution dans 64 μ L d'eau distillée. Après ajout de 24 μ L de solution de $SnCl_2$ à 1 mg/ml, et 48 μ L de solution de NaOH 0.1 M, une solution de $Na^{99g}TcO_4$ est ajoutée (1.0 équiv.) et la solution est placée 5 minutes à incubation à 37°C. Après ajout de 4.8 μ L de solution d'HCL 1M, le complexe est analysé par RP-HPLC. **RP-HPLC analytique** : $t_R = 17.0$ min ; **MALDI/TOF** : $m/z = 575.0$ [MH^+].



^{99m}Tc -51a. Le composé **51a** (20 μ g, 52 nmol, 20 μ L de solution à 1 mg/mL) est mis en solution dans 60 μ L d'eau distillée. Après ajout de 27 μ L de solution de $SnCl_2$ à 1 mg/ml, et 54 μ L de solution de NaOH 0.1 M, 75 μ L d'une solution de $Na^{99m}TcO_4$ est ajoutée et la solution est placée 5 minutes à incubation à 37°C. Après ajout de 5.4 μ L de solution d'HCL 1M, le complexe est analysé par RP-HPLC. **RP-HPLC analytique** : $t_R = 11.2$ min et $t_R = 11.6$ min.



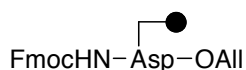
IVe.1.4. Etude de stabilité de ^{99m}Tc -51a dans le plasma murin

Le protocole utilisé est le même que pour l'étude de stabilité en plasma murin de TriaS- ^{99m}Tc (Chapitre III).

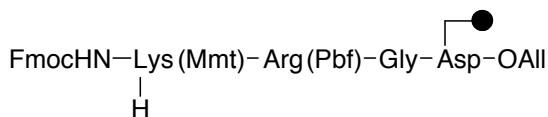
IVe.2. Développement de traceurs bifonctionnels de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

IVe.2.1. Synthèse sur support de c(RGDfK) et c(RGDf(N-Me)K)

54. La résine Wang (1.14g, 0.5 mmol) est conditionnée dans le DCM (1x 15 min, 2x1 min), puis lavée pas le DMF (3x 1 min). La DMAP (6.1 mg, 0.05 mmol, 0.1 équiv.) est ajoutée en solution dans 10 mL de DMF et la résine est agitée durant 20 min. Le FmocAsp(OAll)OH (1.98g, 5.0 mmol, 10 équiv.) est mis en solution dans 10 mL de DCM et 4 à 5 gouttes de DMF. Le mélange est placé à 0°C pendant 5 min le DIC (390 μL , 2.5 mmol, 5.0 équiv.) est ajouté sous atmosphère d'argon. Le mélange est agité à température ambiante pendant 20 min puis versé sur la résine. La résine est agitée durant 24h à température ambiante puis lavée par DMF (3x 1 min) et DCM (3x 1 min). La substitution de la résine est évaluée par dosage UV (voir annexe) à 290 nm. $S = 0.412 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, Rdt = 94 %

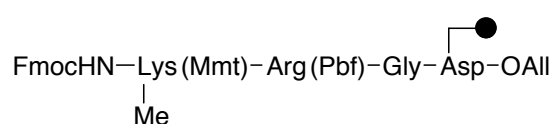


55. La résine est conditionnée dans le DCM (3x 1 min) puis DMF (3x1 min). Le bromure de benzyle (297 μL , 2.5 mmol, 5.0 équiv.) puis la DIPEA (870 μL , 5.0 mmol, 10 équiv.) sont ajoutés et le mélange est agité à température ambiante pendant 1h. Après lavage par DMF (3x 1 min), DCM (3x1 min) la résine est conditionnée dans le DMF (3x 1 min) et déprotégée par un mélange DMF/Pipéridine (4/1) (5x 5 min). Après lavages au DMF (3x 1 min), DCM (3x 1 min), un test Kaiser est réalisé et donne une coloration bleue (positif). La FmocGlyOH (1.486g, 5.0 mmol,



10.0 équiv.) est ajoutée en solution dans la NMP, puis la DIPEA (870 μL , 5.0 mmol, 10 équiv.), ClHOBT (848 mg, 5.0 mmol, 10 équiv.) et DIC (775 μL , 5.0 mmol, 10.0 équiv.) sont ajoutés successivement. Après 24h d'agitation, la résine est lavée par la NMP (3x 1 min) puis DCM (3x 1 min). Le test Kaiser est alors négatif. Cette opération déprotection/couplage est répétée successivement avec les acides aminés suivants : FmocArg(Pbf)OH (3.24g, 5.0 mmol, 10.0 équiv.) et FmocLys(Mmt)OH (1.60g, 2.5 mmol, 5.0 équiv.) pour conduire à la résine **53**. Un aliquot de résine est clivé par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) durant 1h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le composé est repris dans un mélange ACN/eau et analysé en masse. **MALDI/TOF** : $m/z = 737.3$ [MH^+].

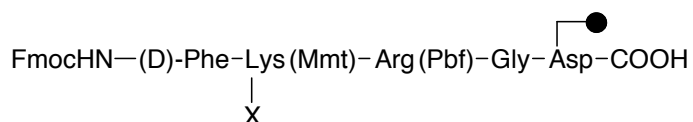
55b. La résine (0.25 mmol) est conditionnée dans le DCM (1x 30 min, 2x 1 min) puis le DMF



(3x 1 min). La déprotection est réalisée par un mélange DMF/Pipéridine (4/1) (5x 5 min) puis la résine est lavée par DMF (3x 1 min), DCM (3x 1 min) et NMP (3x 1 min). Test Kaiser positif. O-

NBSCl (222 mg, 1.0 mmol, 4.0 équiv.) et la collidine (162.5 μL ; 2.5 mmol, 10.0 équiv.) sont mis en solution dans la NMP (5 mL) et ajoutés à la résine. Après 2x 15 min d'agitation à température ambiante, le solvant est éliminé par filtration. Test Kaiser négatif. La résine est ensuite lavée par la NMP (3x 1 min) et du DBU (115 μL , 0.75 mmol, 3 équiv.) est ajouté dans 5 mL de NMP. Après 3 min d'agitation, Me_2SO_4 (240 μL , 2.5 mmol, 10.0 équiv.) est ajouté puis la résine est agitée durant 2x 2 min. Enfin, une solution de DBU (190 μL , 1.25 mmol, 5.0 équiv.) et de mercaptoéthanol (175 μL , 2.5 mmol, 10.0 équiv.) est ajoutée dans la NMP et la résine est agitée durant 2x 5 min. La résine **55b** obtenue est lavée par la NMP (3x 1 min), le DCM (3x 1 min). Un aliquot de résine est clivé par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) durant 1h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le composé est repris dans un mélange ACN/eau et analysé en masse. **ESI** : $m/z = 265.2$ [$\text{M} + 2\text{H}^+$] et 529.3 [$\text{M} + \text{H}^+$]

56 et **56b**. La résine **55** (resp. **55b**) (0.25 mmol) est conditionnée dans le DCM (1x 30 min, 2x 1 min) puis la NMP (3x 1 min). La Fmoc-



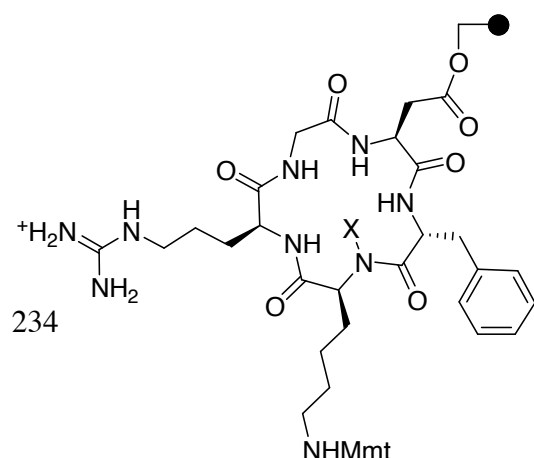
(D)-PheOH (0.49 g, 2.5 mmol, 10.0 équiv.) est ajoutée en solution dans la NMP, puis la DIPEA (218 μ L, 2.5 mmol, 10 équiv.), ClHOBT (212 mg, 2.5 mmol, 10 équiv.) et DIC (194 μ L, 2.5 mmol, 10.0 équiv.) sont ajoutés successivement. Après 24h d'agitation, la résine est lavée par la NMP (3x 1 min) puis DCM (3x 1 min). Un aliquot de résine est clivé par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) durant 1h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le composé est repris dans un mélange ACN/eau et analysé en masse.

- **56** X = H : ESI : m/z = 884.5 [M+ H⁺]
- **56b** X = Me : ESI : m/z = 449.9 [M+ 2H⁺], 898.5 [M+H⁺]

57 et **57b**. La résine **56** (resp. **56b**) est conditionnée dans le DCM (1x 30 min, 2x 1 min) puis CHCl₃ (3x 1 min). Le Pd(PPh₃)₄ (174 mg, 0.15 mmol, 3.0 équiv.) est dissous dans 8 mL d'un mélange CHCl₃ / NMM / AcOH (92.5% / 2.5% / 5.0%) et ajouté à la résine. La résine est agitée durant 24h à température ambiante et à l'abris de la lumière. Après lavages successifs par une solution de DIPEA à 0.5% dans le DMF (3x 1 min), une solution de diéthylthiocarbamate de sodium à 0.5% dans le DMF (3x 1 min), le DMF (3x 1 min), une solution de DIPEA à 8% dans le DMF (3x 1 min), le DMF (3x 1 min), et le DCM (3x 1 min), un aliquot est clivé par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) durant 1h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le composé est repris dans un mélange ACN/eau et analysé en masse.

- **57** X = H : ESI : m/z = 844.5 [M+ H⁺]
- **57b** X = Me : ESI : m/z = 429.7 [M+ 2H⁺], 858.4 [M+H⁺]

58 et **58b**. La résine **57** (resp. **57b**) est conditionnée dans le DCM (1x 30 min, 2x 1 min) puis le DMF (3x 1 min). La déprotection est réalisée par un mélange DMF/Pipéridine (4/1) (5x 5 min) puis la résine est lavée par DMF (3x 1 min), DCM (3x 1 min) et NMP (3x 1 min). La DIPEA (35 μ L, 0.2 mmol, 4 équiv.) puis HATU (38 mg, 0.1 mmol, 2

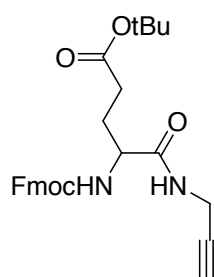


équival.) sont ajoutés en solution dans la NMP. Après 24h d'agitation, la résine est lavée par la NMP (3x 1 min) puis DCM (3x 1 min). Un aliquot de résine est clivé par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) durant 1h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le composé est repris dans un mélange ACN/eau et analysé en masse.

- **58** X = H : **ESI** : $m/z = 604.2 [M+H^+]$
- **58b** X = Me : **ESI** : $m/z = 309.2 [M+2H^+]$, $618.3 [M+H^+]$

IVe.2.1. Préparation des composés 59 et 60

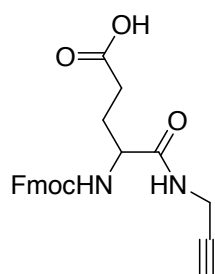
59. Le FmocGlu(OtBu)OH (4.25g, 10.0 mmol, 1.0 équival.) est mis en solution dans 50 mL de



DCM. La propargylamine (640 μ L, 10.0 mmol, 1.0 équival.) est ajoutée puis Cl-HOBt (2.03g, 12.0 mmol, 1.2 équival.), la DIPEA (8.7 mL, 50.0 mmol, 5.0 équival.), et le DCC (2.48 g, 12.0 mmol, 1.2 équival.). Le mélange est placé sous atmosphère d'argon et agité durant 24h à température ambiante. Le précipité de DCU est filtré puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle et lavé deux fois par une solution d'acide citrique (10%). Les phases organiques sont regroupées puis séchées sur

sulfate de sodium anhydre. Après évaporation de solvant sous pression réduite, l'huile obtenue est reprise dans le DCM et purifiée par chromatographie flash (éluant : AcOEt / Hexane 3/7, révélation UV 220 nm) pour conduire à **59** sous la forme d'un solide blanc (3.03 g, 6.55 mmol, 65%). **$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3)** : δ 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH Ar, Fmoc), 7.59 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH Ar, Fmoc), 7.35 (m, 4H, CH Ar, Fmoc), 1.92 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2 , Fmoc), 4.22 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, CH Glu), 4.08 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), 2.35 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-COO}$), 2.20 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.05 (m, 2H, CH_2), 1.46 (s, 9H, CH_3 , tBu); **$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3)** : δ 173.1 (CO, ester), 171.3 (CO, amide), 156.0 (CO, carbamate), 143.8-141.4 (C Ar, Fmoc), 127.8-120.1 (CH Ar, Fmoc), 81.3 (C, tBu), 79.2 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 71.9 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 67.2 (CH_2 , Fmoc), 54.1 (CH, Fmoc), 47.2 (CH, Glu), 31.7 (CH_2 , Glu), 29.3 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), 28.1 (CH_3 , tBu).

60. Le composé **59** (740 mg, 1.6 mmol) est mis en solution dans 20 mL de DCM/TFA (1/1) à

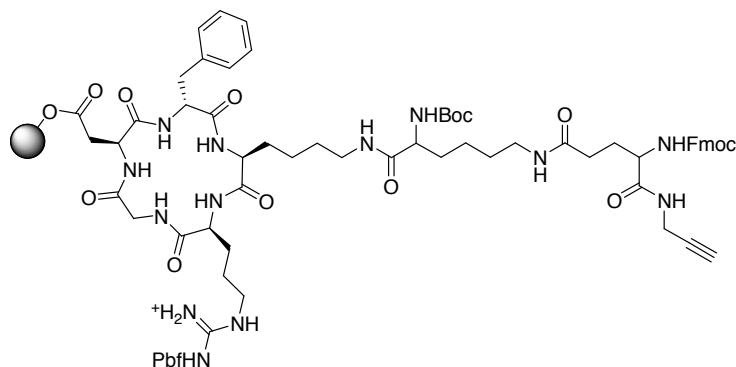


température ambiante durant 30 minutes. Le solvant est évaporé sous pression réduite puis du toluène est chassé à trois reprises. Le composé **59** est obtenu et utilisé directement sans purification. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : δ 8.44 (s, 1H, NH amide), 7.79 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH Ar, Fmoc), 7.66 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH Ar, Fmoc), 7.34 (m, 2H, CH Ar, Fmoc), 4.37 (m, 2H, CH_2 , Fmoc), 4.19 (t, 1H, $J = 6.75$ Hz, CH Glu), 4.12 (m, 1H, CH Fmoc), 3.96 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$),

5.58 (t, 1H, $J = 2.5$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.35 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, CH_2COO), 2.04 (m, 2H, CH_2 ; Glu) $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) : δ 177.3 (CO acide), 174.8 (CO amide), 159.3 (CO carbamate), 146.2-143.4 (C Ar, Fmoc), 129.6-121.8 (CH Ar, Fmoc), 81.3 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 73.1 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 68.8 (CH_2 , Fmoc), 56.5 (CH, Glu), 32.0 ($\text{CH}_2\text{-CC}$), 30.4 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{COO}$), 39.3 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{COO}$).

IVe.2.1. Préparation de c(RGDfK)-Lys-TriaS-PEG

63. La résine **58** (0.25 mmol) est conditionnée dans le DCM (1x 30 min, 2x 1 min), puis un

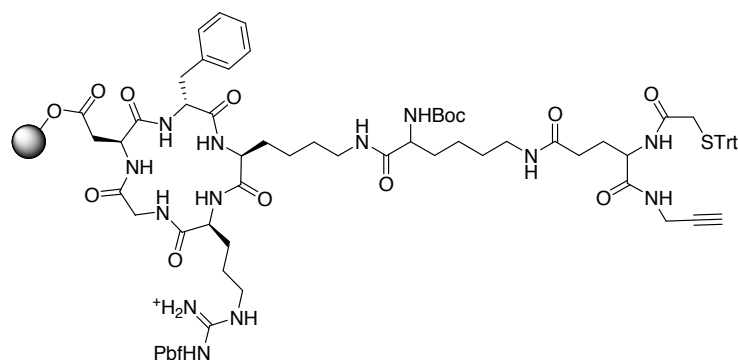


mélange TFE/DCM 1/1 (3x 1 min). 25 mL de solution de HOBt à 0.6M dans le TFE/DCM (1/1) sont ajoutés et la résine est agitée durant 30 minutes à température ambiante. Cette étape est répétée à deux reprises. La résine est rincée par un mélange DCM/TFE 1/1 (3x 1 min),

le DCM (3x 1 min), et la NMP (3x 1 min). La Boc-Lys(Fmoc)OH (1.17 g, 2.5 mmol, 10 équiv.) est dissoute dans 20 mL de NMP, puis Cl-HOBt (0.43 g, 2.5 mmol, 10 équiv.), la DIPEA (435 μL , 2.5 mmol, 10 équiv.) et le DIC (390 μL , 2.5 mmol, 10 équiv.) et ce mélange est ajouté à la résine. Après agitation à température ambiante durant 24h, la résine est lavée par la NMP (3x 1 min), le DCM (3x 1 min), et le DMF (3x 1 min), puis déprotégée par un mélange DMF/Pipéridine 4/1 (5x 5 min). Le composé **60** (1.20 g, 2.5 mmol, 10 équiv.) est mis en solution

dans 20 mL de NMP avec le DIC (390 μ L, 2.5 mmol, 10 équiv.) et la DIPEA (435 μ L, 2.5 mmol, 10 équiv.) puis ajouté à la résine. Après 24h d'agitation à température ambiante, la résine est lavée par la NMP (3x 1 min) puis DCM (3x 1 min). Un aliquot de résine est clivé par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) durant 1h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le composé est repris dans un mélange ACN/eau et analysé en masse. **MALDI/TOF** : 1120.5 [M+H⁺].

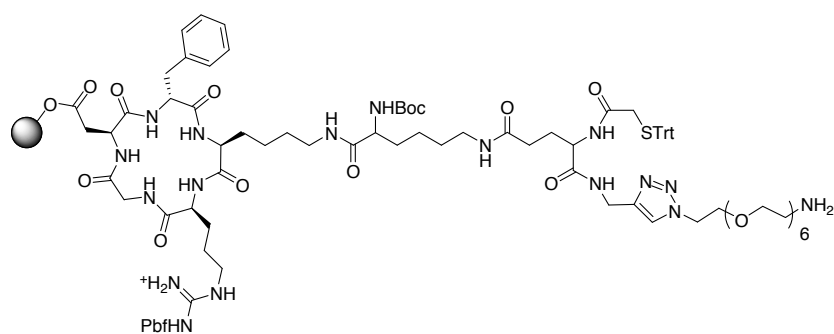
64. La résine **63** est (0.25 mmol) est conditionnée dans le DCM (1x 30 min, 2x 1 min), puis le



DMF (3x 1 min), puis déprotégée par un mélange DMF/Pipéridine 4/1 (5x 5 min) et lavée par le DMF (3x 1 min), le DCM (3x 1 min) et la NMP (3x 1 min). Le composé **15** (835 mg, 2.5 mmol, 10.0 équiv.) est mis en solution dans 10 mL de NMP, puis le HATU (952 mg, 2.5

mmol, 10.0 équiv.), et la DIPEA (435 μ L, 2.5 mmol, 10.0 équiv.) sont ajoutés. Le mélange est ajouté à la résine. Après 24h d'agitation à température ambiante, la résine est lavée par la NMP (3x 1 min) puis DCM (3x 1 min). Un aliquot de résine est clivé par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) durant 1h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le composé est repris dans un mélange ACN/eau et analysé en masse. **MALDI/TOF** : 972.0 [M+H⁺].

65. La résine **64** (0.125 mmol) est conditionnée dans le DCM (1x 30 min, 2x 1 min) puis la NMP



(3x 1 min). La résine est mise en solution dans 2.3 mL de NMP puis la L-proline (25 μ L de solution 1M, 0.025 mmol, 0.2

équivalent.), Na_2CO_3 (25 μL de solution 1M, 0.025 mmol, 0.2 équivalent.), l'ascorbate de sodium (50 μL de solution 1M, 0.05 mmol, 0.4 équivalent.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (25 μL de solution 1M, 0.025 mmol, 0.2 équivalent.), le O-(2-aminoéthyl)-O'-(2-azidoéthyl) pentaéthylène glycol (45.8 mg, 0.125 mmol, 1.0 équivalent.) et 130 μL d'eau sont ajoutés. La résine est alors placée au micro-ondes (80°C, 300W, 30 min) puis lavée par la NMP (3x 1 min), et le DCM (3x 1 min). Un aliquot de résine est clivé par un mélange TFA/TIPS/eau (95/2.5/2.5) durant 1h à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le composé est repris dans un mélange ACN/eau et analysé en masse. **MALDI/TOF** : 1322.6 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Conclusion et perspectives

Le travail présenté dans ce manuscrit avait pour objectif la mise au point d'une nouvelle plateforme pour le développement de traceurs technétiés pour l'imagerie moléculaire *in vivo*.

Nous avons choisi le technétium car il est présent à l'heure actuelle dans la grande majorité (85%) des traceurs radiodiagnostiques utilisés en routine en milieu hospitalier. Il s'agit d'un émetteur γ aux propriétés idéales pour l'imagerie et disponible sous forme de générateurs portables à un prix abordable. De plus, le rhénium, émetteur β^- qui présente des propriétés physico-chimiques très proches du technétium, offre des possibilités de développement de radiopharmaceutiques à visées thérapeutiques.

Lors du développement de traceurs technétiés, la principale limitation est le caractère empirique de l'optimisation des structures qui implique de synthétiser un grand nombre de composés analogues. Dans ce contexte, il était très intéressant de disposer d'une structure de base complexant le technétium et fonctionnalisable en de multiples positions via une chimie simple compatible avec une approche combinatoire.

Dans cette optique nous avons choisi d'étudier un ensemble de ligands dont la structure générale s'inspire des travaux réalisés par deux équipes en 1997 et 2006. D'une part, Schibli et coll ont développé en 2006 des complexes du technetium tricarbonyle dans lesquels le motif triazole du ligand est impliqué directement dans la complexation du métal. Ce motif triazole, formé par la cycloaddition dipolaire de Huisgen, permet d'envisager une approche combinatoire grâce à la chimie-click. D'autre part, les travaux de Rajagopalan et coll, ont montré en 1997 que des ligands tétradentates de type N_3S , dans lesquels un des azotes chélatants appartient à un motif de type pyridyle ou imidazole, peuvent complexer efficacement le cœur oxotechnétium. Ce

dernier présente l'avantage de former des complexes ayant une structure plus rigide que le cœur tricarbonyle.

Les ligands que nous avons développés étaient donc des ligands tétradentates de type N_3X ($X = S, O, N$) dans lesquels un des atomes d'azotes chélatants appartient à un motif triazole. Ainsi, nous avons conjugué au sein d'une même structure les potentialités de la chimie combinatoire via le concept de « click to chelate » développé par Schibli et coll à la structure rigide des complexes à cœur oxotechnétium. Un ensemble de 12 ligands a ainsi été préparé dont la structure générale est résumée à la figure C.1.

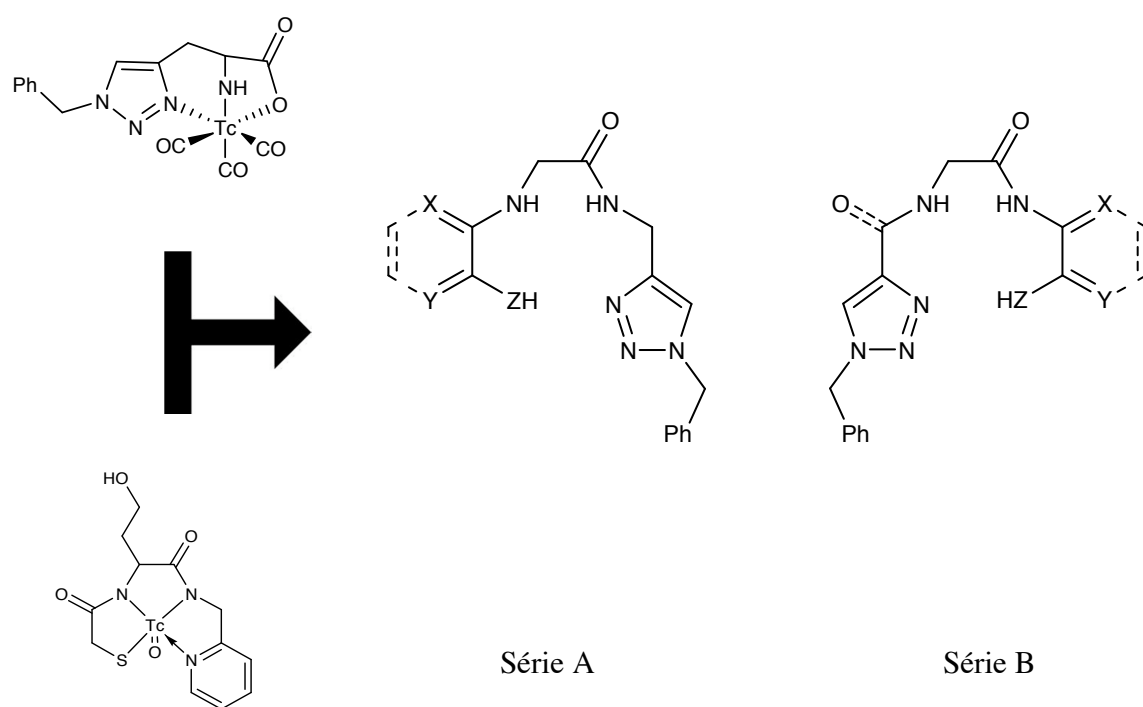


Fig. C.1. : La structure de base de la famille de complexes étudiés (A), la structure « symétrique » (B) avec $X, Y = O, CH$ et $Z = O, S, NH, NAc$.

La formation des complexes du ^{99m}Tc associés à ces ligands a été réalisée dans des conditions douces compatibles avec une utilisation quotidienne en milieu hospitalier. Dans ces conditions, le ligand **1** a conduit quantitativement au complexe de technétium correspondant. Il s'agit de $^{99m}Tc-1$ (Fig. C.2). La stabilité en plasma murin de ce complexe a ensuite été évaluée et comparée à deux complexes références de type N_3S et N_2S_2 sans noyau triazole. Il s'avère que

$^{99m}\text{Tc-1}$ présente une stabilité en plasma murin supérieure à 90% après 6h d'incubation à 37°C. L'analyse en radio-HPLC des prélèvements successifs ne laisse par ailleurs apparaître aucun produit de dégradation. Ce complexe sélectionné par ce double criblage a été baptisé **TriaS- ^{99m}Tc** .

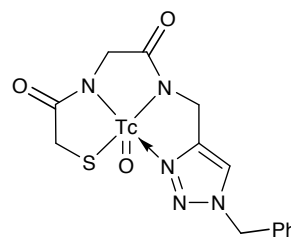
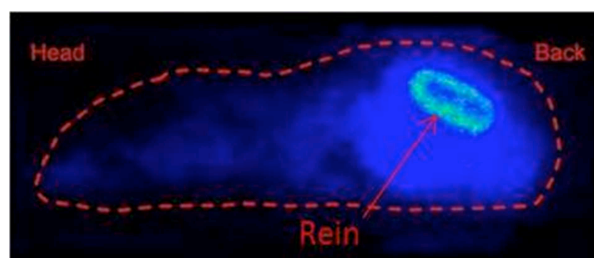
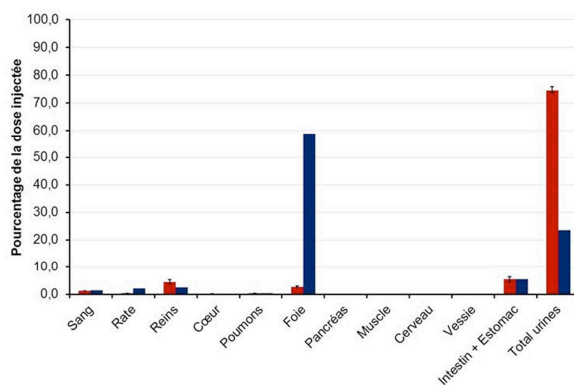


Fig. C.2 : Structures de $^{99m}\text{Tc-1}$ (ou **TriaS- ^{99m}Tc**).

Une étude in vivo de **TriaS- ^{99m}Tc** a ensuite été réalisée chez la souris. La biodistribution du complexe après injection a révélé une élimination efficace de l'organisme puisque plus de 80% de la dose injectée était retrouvée dans les reins et les urines. Le complexe **TriaS- ^{99m}Tc** est donc majoritairement éliminé par voie d'excrétion urinaire. La visualisation au β -imager d'une coupe longitudinale de souris saine traitée dans ces conditions confirme ce résultat puisque les reins apparaissent très nettement avec très peu de bruit de fond dans le reste du corps (Fig. C.3.A.). Ce résultat contraste avec ceux décrits par Rajagopalan et coll sur des complexes analogues à noyaux pyridyle et imidazole pour lesquels l'activité résiduelle est largement supérieure dans ces conditions d'observation, notamment dans le tractus gastrointestinal. D'autre part, l'étude a montré que **TriaS- ^{99m}Tc** se comportait très différemment du technétium libre réduit qui s'accumule principalement dans le foie (Fig. C.3.B.)



(A)



(B)

Fig. C.3. : Etude in vivo de **TriaS- ^{99m}Tc**

Enfin l'étude des urines recueillies deux heures après injection a révélé que l'essentiel de la dose recueillie correspond au complexe **Trias-^{99m}Tc** intact. Ainsi l'essentiel du complexe injecté n'a pas subi de dégradation durant son séjour dans le milieu circulant. L'un des autres constituants technétiés observés dans les urines (6%) a pu être identifié, il s'agit d'un complexe mixte Trias-^{99m}Tc-cystéine qui pourrait s'être formé au contact de la cystéine présente dans l'urine. Enfin un dernier produit de dégradation non identifié, représentant 25% environ de la dose recueillie dans les urines résulte de la métabolisation par un des composants du sang complet, très probablement les érythrocytes. Ces résultats très prometteurs nous ont incités à utiliser Trias-^{99m}Tc pour l'imagerie moléculaire.

Afin de démontrer les potentialités de la plateforme **Trias** pour la préparation de traceurs *in vivo*, nous avons développé deux types de traceurs technétiés ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, marqueur couramment utilisé pour l'imagerie moléculaire du cancer.

Dans un premier temps, nous avons développé plusieurs complexes intégrés (« Tc-essentiels ») mimant le tripeptide RGD dans lesquels la chélation du métal apporte sa rigidité à la structure. Ainsi, nous avons conservé le résidu arginine tandis qu'un mime d'aspartate était introduit au niveau du noyau triazole par chimie-click. Trois complexes ont ainsi été préparés parmi lesquels **^{99m}Tc-51a** (Fig. C.4.) qui a été plus particulièrement étudié. Malgré la présence de groupements fonctionnels qui pourraient perturber la chélation du métal, il s'est avéré que la complexation est toujours quantitative. Ce résultat est très encourageant et devra être confirmé par la réalisation d'autres structures fonctionnalisées avec des groupements divers avant d'être généralisé.

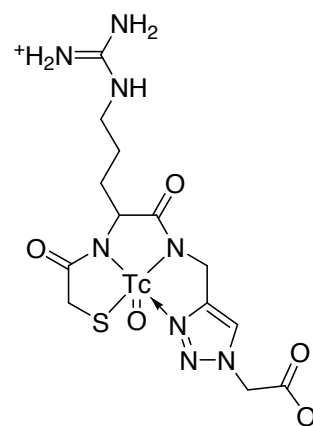


Fig. C.4. : ^{99m}Tc-51a

Le complexe fonctionnalisé **^{99m}Tc-51a** a également été évalué en plasma murin. Cette étude a mis en évidence une stabilité supérieure à 50% après 6h d'incubation à 37°C. Ce résultat, bien qu'inférieur à la stabilité affichée par **Trias-^{99m}Tc** reste néanmoins très intéressant. En outre, aucun produit de dégradation n'a été observé durant cette étude, suggérant plutôt une prise

en charge du complexe par les protéines du plasma. Ce phénomène n'est pas forcément négatif puisque la sérumalbumine est connue pour servir de transporteur à de nombreux médicaments.

En second lieu, nous avons souhaité illustrer l'intérêt de **Trias** pour le développement de traceurs bifonctionnels de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Dans cette étude, nous avons choisi d'effectuer le marquage du cyclopentapeptide cyclique c(RGDfK) qui est très décrit dans la littérature et conduit à des composés ayant de très bonnes affinités pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Nous avons choisi de relier cette biomolécule à **Trias** via un espaceur de type lysine par couplage peptidique. Ainsi, le noyau triazole du ligand formé par chimie-click reste disponible pour introduire, par chimie combinatoire, divers motifs susceptibles de moduler la biodistribution et la voie d'excrétion (PEG, glucide, polyamine, chaîne alkyle...). Pour l'exemple développé dans ce manuscrit, nous avons choisi d'utiliser un polyéthylène glycol commercial. Le ligand **c(RGDfK)-K-Trias-PEG** a ainsi été conçu et sa synthèse a été réalisée bien qu'une optimisation de l'étape de cycloaddition sur support solide reste nécessaire.

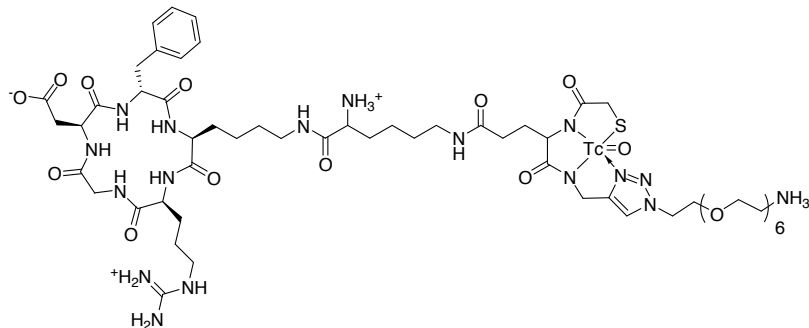


Fig. C.5.: Structure du complexe **c(RGDfK)-Lys-Trias-^{99m}Tc-PEG**

Trias-^{99m}Tc satisfait donc à tous les critères que nous nous étions fixés concernant cette plateforme par le développement de traceurs *in vivo*. Il s'agit d'une structure rigide, facilement fonctionnalisable et propice à la chimie combinatoire.

La suite de ce projet va maintenant consister à développer plus en profondeur les applications de cette plateforme. Dans un premier temps, il s'agira de terminer la préparation des

divers complexes Tc-essentiels et bifonctionnels décrits dans ce manuscrit notamment en optimisant les conditions de cycloaddition sur support solide. Tous ces composés pourront alors être évalués *in vitro* par de leur capacité à lier les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$. D'autre part, leur stabilité en plasma murin sera également étudiée.

Plusieurs perspectives sont envisageables dans le cadre de l'imagerie de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. D'une part, dans le cas des traceurs intégrés, les mimes de guanidinium et d'aspartate peuvent être introduits en d'autres points de fonctionnalisation de la structure de TriaS, permettant ainsi d'accéder à des conformations spatiales différentes (Fig. C.6.A et B). Cette exploration de l'espace conformationnel devrait permettre d'identifier de nouveaux ligands des intégrines présentant des sélectivités particulières.

D'autre part, dans le cas des traceurs BFCA, il s'agira dans un premier temps de faire varier la chaîne latérale introduite par chimie-click en introduisant des motifs hydrophiles ou hydrophobes afin de moduler la solubilité des composés. L'emploi du cilengitide ou d'autres formes N-méthylées du pentapeptide c(RGDfK) en tant que biomolécule ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est également une piste très prometteuse (Fig. C.6.C). Il sera aussi intéressant d'étudier l'influence sur l'affinité de l'espaceur séparant TriaS de la biomolécule, en particulier on pourra envisager l'emploi d'espaceurs PEG de longueur variable (Fig. C.6.D). **TriaS** présentant de multiples sites de fonctionnalisation, il est également envisageable de l'utiliser pour développer des multimères de cyclo-RGD dans lesquels **TriaS** joue le double rôle de structure chélatant le technétium et de cœur pour la ramification du composé (Fig. C.6.E).

D'autres applications de cette approche ont également été prévues dans le domaine de l'imagerie moléculaire du cancer, notamment des traceurs visant le récepteur de la FSH qui, depuis fin 2010, apparaît comme un marqueur extrêmement intéressant de la tumorigenèse de nombreux organes et ce, à tous les stades du développement de la tumeur.

Annexe

A.1 Chimie

A.1.1. Réactifs

Les réactifs chimiques et les solvants utilisés ont été obtenus chez Sigma-Aldrich, VWR, Fluka, et Molekula et étaient de pureté analytique. Résines et acides aminés utilisés en synthèse peptidique ont été obtenus chez Novabiochem.

A.1.2. Matériel

Les chromatographies flash ont été réalisées sur gel de silice 40-63 μm obtenue chez Merck. Le suivi des réactions a été effectué par chromatographie sur couche mince (plaques en verre Merck 60F₂₅₄) et la révélation a été effectuée par éclairage UV (254 nm), à la ninhydrine, ou au permanganate de potassium.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été réalisés sur un spectromètre Bruker AVANCE 250 MHz et les déplacements chimiques sont rapportés en ppm par rapport au triméthylsilane (TMS).

Les spectres de masse ont été réalisés sur deux types d'appareillages : un spectromètre de masse ESI (Electro Spray Ionization) trappe ionique (Esquire HTC, Bruker Daltonics), et un spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF (AB SCIEX, 4800).

A.1.3. Procédure générale de synthèse sur support solide en stratégie Fmoc

Toutes les résines utilisées sont conditionnées dans le DCM pour un gonflement maximal au début de chaque synthèse et après chaque lavage au méthanol. Toutes les synthèses ont été

réalisées dans des réacteurs cylindriques munis d'un filtre permettant l'élimination des excès de réactifs par aspiration.

Le premier résidu est greffé suivant une procédure spécifique décrite dans la partie expérimentale correspondante (couplage classique, méthode de l'anhydride symétrique...), la substitution de la résine après greffage du premier fragment est mesurée par dosage Fmoc quantitatif. Les résidus suivants sont greffés selon une méthode itérative. L'insertion d'un résidu se décompose en 4 étapes réalisées dans le DMF ou la NMP et l'efficacité du couplage est évaluée par test de Kaiser qualitatif et/ou dosage Fmoc.

1) Déprotection du groupement Fmoc

La résine est agitée à température ambiante dans un mélange pipéridine/DMF (1/4) pendant 5 minutes puis le solvant est éliminé par filtration. Cette étape est répétée à trois reprises.

2) Lavages de la résine

La résine est lavée successivement par 3 volumes (20 mL/mmol) de DMF (ou NMP), 3 volumes (20 mL/mmol) de DCM, puis 3 volumes (20 mL/mmol) du solvant utilisé pour le couplage (DMF ou NMP).

3) Couplage de l'acide aminé

En règle générale, les acides aminés utilisés étaient de type Fmoc-aa-OH. Nous avons utilisé deux stratégies de couplage : la stratégie DCC (ou DIC) /HOBt/DIPEA et la stratégie HATU/DIPEA pour les couplages délicats comme les cyclisations. La stratégie utilisée et sa mise en œuvre sont décrites dans les parties expérimentales des différents chapitres. Les temps de couplage utilisés sont de 4 heures ou une nuit selon leur difficulté. La complétion des réactions est contrôlée qualitativement par un test de Kaiser et/ou par dosage Fmoc quantitatif. Si le couplage n'est pas complet, celui-ci est relancé avec des réactifs frais.

4) Lavages de la résine

Après couplage, la résine est lavée par 3 volumes du solvant utilisé pour le couplage, puis 3 volumes de DCM. Dans le cas des couplages utilisant le couple DCC/HOBt, 3 lavages au méthanol sont effectués afin d'éliminer la dicyclohexylurée qui y est complètement soluble.

		Réactifs, solvants	Répétitions	Durée
1	Déprotection Fmoc	pipéridine/NMP 1/4 (ou pipéridine/DMF 1/4)	3	5 min
		NMP (ou DMF)	3	1 min
2	Lavages	DCM	3	1 min
		NMP (ou DMF)	3	1 min
3	Couplage	Fmoc-aa-OH, DIPEA Agent d'activation (DCC, DIC ou HAUT)	1 ou 2*	4h à une nuit
		NMP (ou DMF)	3	1 min
4	Lavages	DCM	3	1 min
		MeOH	3	1 min

Tableau A.1. : Etapes récurrentes du couplage d'un acide aminé sur support solide.

Contrôle de la complétion des couplages d'acides aminés

Contrôle qualitatif : test de Kaiser

Le test de Kaiser permet de révéler la présence d'amines primaires et est couramment utilisé pour contrôler le bon fonctionnement des étapes de couplage. Il utilise trois solutions disponibles commercialement (Kaiser test kit, Fluka Analytical) :

- Solution 1 : Phénol (~80% dans l'éthanol).
- Solution 2 : Cyanure de potassium (2% dans la pyridine).
- Solution 3 : Ninhydrine (6% dans l'éthanol).

Trois gouttes de chaque solution sont ajoutées à un échantillon de résine dans un tube à essai qui est chauffé à 110°C pendant 5 min. L'apparition d'une coloration bleue des billes de résine met en évidence la présence d'amine libre et donc un couplage partiel. A l'opposé, une absence de coloration indique que le couplage est terminé.

Contrôle quantitatif : dosage Fmoc

La déprotection du groupement Fmoc conduit à la formation de dibenzofulvène formant en présence de pipéridine un adduit absorbant en UV ($\epsilon = 5253 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $\lambda = 220 \text{ nm}$). Le dosage de cette entité permet de déterminer le taux de couplage de la résine.

Une masse m ($\sim 5 \text{ mg}$) est pesée, mise en suspension dans $V = 10 \text{ mL}$ d'un mélange pipéridine/DMF (1/4) et agitée durant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance (A) de la solution à 290 nm est alors mesurée.

La substitution (S) de la résine est alors donnée par la formule (S en $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$, n en mmol , m en g , V en mL , $l = 1 \text{ cm}$, $\epsilon = 5253 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$):

$$S = \frac{A \cdot V}{l \cdot \epsilon \cdot a}$$

La substitution théorique de la résine est donnée par :

$$S_{\text{th}} = \frac{S_i \cdot 1000}{1000 + S_i \cdot (M_2 - M_1)}$$

Avec S_i , la substitution initiale de la résine, M_1 , la masse moléculaire du groupement partant ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$), et M_2 la masse moléculaire du groupement ajouté ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Le rendement du couplage est donné par le rapport S/S_{th}

A.2. RP-HPLC

Les composés préparés dans ce manuscrit ont été analysés et purifiés par RP-HPLC sur les dispositifs suivants.

HPLC semi-préparative

Les purifications des ligands synthétisés ont été réalisées par HPLC semi-préparative en phase inverse sur un dispositif LAPREP (VWR Int). Toutes les purifications ont été effectuées sur colonne RP-HPLC semi-préparative Varian Pursuit C18 250x10, $5 \mu\text{m}$ utilisée avec un débit de $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

HPLC analytique

Les analyses de pureté des ligands et des complexes technétiés synthétisés ont été réalisées par HPLC analytique en phase inverse sur un dispositif Prostar Varian muni d'un détecteur à barette de diodes Varian 335 et d'un détecteur gamma HERM LB500 (Berthold). Les colonnes analytiques utilisées ont été de deux types :

- Pour l'analyse des ligands et complexes synthétisés : Varian Pursuit C18 250x4.6 mm, 5 μm protégée par une garde analytique C18 (Security Gard, Phenomenex), utilisée avec un débit de 1 mL.min⁻¹
- Pour les analyses *in vitro* et *in vivo* (plasma, urine) : Vydac Protein & Peptide C18 250x4.6 mm, 10 μm protégée par une garde analytique C18 (Security Gard, Phenomenex), utilisée avec un débit de 1 mL.min⁻¹

	t (min)	% A	% B
Sauf indication contraire, et dans un souci de reproductibilité, les purifications et analyses ont été effectuée grâce à un système binaire de solvants (A : eau + 0.1% TFA, B : ACN + 0.1% TFA) et à un gradient linéaire : 0-100% B en 30 min.	0	100	0
	30	0	100
	35	0	100
	40	100	0
	55	100	0

Tableau A.2. : Gradient 0-100% en 30 min

A.3. ^{99m}Tc et ^{99g}Tc

A.3.1. Marquage au ^{99m}Tc

La manipulation de ^{99m}Tc (émetteur γ , 140 keV) doit être effectuée dans des conditions strictes de radioprotection. Toute utilisation de ^{99m}Tc est réalisée derrière un « mur » de protection en plomb. Une solution saline à pH physiologique de pertechnétate de sodium (Na^{99m}TcO₄) est éluée à partir d'un générateur ⁹⁹Mo/^{99m}Tc calibré à 4 Gbq de type ELUMATIC-III (CisBio International). Le générateur est élué quotidiennement (5 ml). Un générateur de ce type peut être utilisé pendant une semaine (puis une semaine à très faible activité). Le comptage des échantillons contenant ^{99m}Tc est effectué grâce à un compteur MEDI 404 (Medisystem). Tout

le matériel ayant été en contact avec ^{99m}Tc est conservé dans un local exclusivement réservé à la manipulation de ce radioélément. Les échantillons de complexes placés dans des châteaux de plomb ainsi que le matériel souillé sont conservés derrière un mur protecteur en plomb. Après décroissance pendant 15 jours et vérification de l'activité, ces déchets peuvent être éliminés par la voie de traitement classique.

A.3.2. Marquage au ^{99g}Tc

La manipulation de ^{99g}Tc (émetteur β^- , 292 keV, période : $2,12 \cdot 10^5$ ans) doit être effectuée selon les procédures normales de sécurité afin d'éviter toute contamination. Il est utilisé sous forme de $[\text{}^{99g}\text{TcO}_4^-][\text{NH}_4^+]$ obtenu du Oak Ridge National Laboratory et purifié par traitement par le peroxyde d'hydrogène et l'hydroxyde d'ammonium dans le méthanol pendant une nuit. Après évaporation du solvant, une poudre blanche de pertechnétate d'ammonium est obtenue et stockée à température ambiante.

A.4. Biologie

A.4.1. Etudes *in vitro*

Le sang utilisé a été prélevé sur des souris Balb-C femelles de 20 à 25 g et utilisé dans l'heure.

Le plasma utilisé dans le cadre des études *in vivo* détaillées dans ce manuscrit a été obtenu à partir de prélèvements sanguins de souris BalbC femelles de 20 à 25g. Ces échantillons sont d'abord centrifugés pendant 15 minutes à $1600 \text{ tr} \cdot \text{min}^{-1}$ et le surnageant est à son tour centrifugé pendant 15 min à $1500 \text{ tr} \cdot \text{min}^{-1}$. Le plasma ainsi obtenu est conservé à -20°C pour une utilisation sous 3 jours ou -80°C dans une limite de 1 mois.

Les urines de souris saines utilisées lors des analyses *in vitro* sont conservées à -20°C et utilisées sous 3 jours.

A.4.2. Etudes in vivo

Les études animales ont été réalisées sur des souris BalbC femelles de 20 à 25g dans le respect du Décret sur l'Expérimentation Animale (Décret 87-848, 19 octobre 1987). Les manipulations ont été réalisées par une personne habilitée pour l'expérimentation animale.

Les solutions de complexes sont injectées par voie intra veineuse au niveau de la veine caudale de la souris. Ces solutions sont à pH physiologique sans solvant organique. Pour les analyses de biodistribution, les souris sont anesthésiées au bout de 2h à l'isoflurane 2% puis sacrifiées par exsanguination. Les liquides biologiques sang/urine sont recueillis puis l'ensemble des organes sont prélevés. Pour l'acquisition au β -imager, la souris a été anesthésiée à l'isoflurane 2% puis sacrifiée par congélation à -80°C . Des coupes « full body » sont réalisées au microtome et visualisées au β -imager (Biospace β -imager 2000).

Le travail décrit dans ce manuscrit consiste en l'identification, par criblage d'un ligand complexant quantitativement le cœur oxotechnétium TcO^{3+} , nommé TriaS. Le complexe TriaS- ^{99m}Tc ainsi formé présente une stabilité très intéressante en milieu biologique et est éliminé par voie rénale chez la souris avec très peu de dégradation. Par la suite, nous illustrons le potentiel de ce complexe pour le développement de traceurs technétiés par fonctionnalisation en nous appuyant sur l'exemple de l'imagerie de la néoangiogenèse tumorale.

Mots clés : imagerie moléculaire, technétium, chimie combinatoire, chimie-click, criblage, stabilité.

**CEA Saclay – Direction des Sciences du vivant
IBiTec-S
Service d'Imagerie Moléculaire des Protéines**

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex