



**HAL**  
open science

## Conceptions et évaluations biologiques de nouveaux radiotraceurs.

Claire Denis

► **To cite this version:**

Claire Denis. Conceptions et évaluations biologiques de nouveaux radiotraceurs.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2015. Français. NNT : 2015CLF1PP06 . tel-01657434

**HAL Id: tel-01657434**

**<https://theses.hal.science/tel-01657434>**

Submitted on 6 Dec 2017

**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 BLAISE PASCAL  
2015

UNIVERSITÉ D'Auvergne  
N° d'ordre

## ECOLE DOCTORALE des SCIENCES FONDAMENTALES

### Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Pharmacochimie

Soutenue le 17 décembre 2015

DENIS Claire

---

## Conceptions et Évaluations Biologiques de Nouveaux Radiotraceurs

---

- Rapporteurs :** Pr Alain FAIVRE-CHAUVET, UMR 892 INSERM/Université de Nantes, Nantes  
Pr Eric BENOIST, SPCMIB-UMR 5068, Université Paul Sabatier, Toulouse
- Membres du jury:** Dr David KRYSA, ISPB-Faculté de Pharmacie, Lyon  
Dr Elisabeth MIOT-NOIRAULT, UMR 990 INSERM/Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand
- Directeur de thèse :** Dr Jean-Claude MADELMONT, UMR 990 INSERM/Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand
- Co-directeur de thèse :** Dr Vincent GAUMET, UMR 990 INSERM/Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand
- Laboratoire :**  
UMR 990 « Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée »  
INSERM/Université d'Auvergne  
58 rue Montalembert, BP 184, 63005 Clermont-Ferrand, Cedex







UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL  
2015

UNIVERSITÉ D'Auvergne  
N° d'ordre

## ECOLE DOCTORALE des SCIENCES FONDAMENTALES

### Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Pharmacochimie

Soutenue le 17 décembre 2015

DENIS Claire

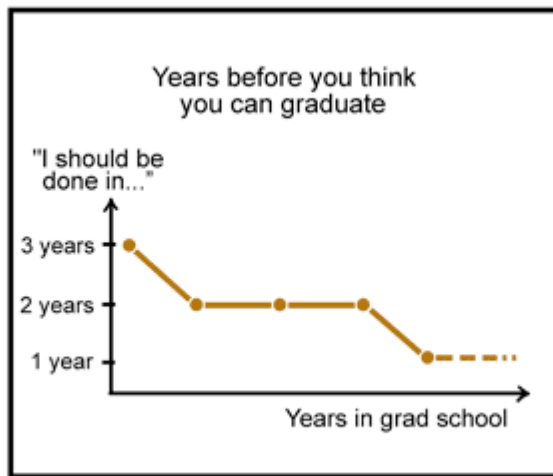
---

## Conceptions et Évaluations Biologiques de Nouveaux Radiotraceurs

---

- Rapporteurs :** Pr Alain FAIVRE-CHAUVET, UMR 892 INSERM/Université de Nantes, Nantes  
Pr Eric BENOIST, SPCMIB-UMR 5068, Université Paul Sabatier, Toulouse
- Membres du jury:** Dr David KRYSA, ISPB-Faculté de Pharmacie, Lyon  
Dr Elisabeth MIOT-NOIRAULT, UMR 990 INSERM/Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand
- Directeur de thèse :** Dr Jean-Claude MADELMONT, UMR 990 INSERM/Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand
- Co-directeur de thèse :** Dr Vincent GAUMET, UMR 990 INSERM/Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand
- Laboratoire :**  
UMR 990 « Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée »  
INSERM/Université d'Auvergne  
58 rue Montalembert, BP 184, 63005 Clermont-Ferrand, Cedex





JORGE CHAM © 2008





## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Alain FAIVRE-CHAUVEY et le Pr Eric BENOIST pour avoir accepté la charge de rapporteur de cette thèse, ainsi qu'au Dr David KRYSA et au Dr Elisabeth MIOT-NOIRAULT pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens à manifester ma reconnaissance à Monsieur le Pr Jean-Michel CHEZAL pour m'avoir accueilli dans son équipe, ainsi que pour ses analyses constructives et pertinentes.

Je tiens particulièrement à remercier mes encadrants, Monsieur le Dr Jean-Claude MADELMONT et Monsieur le Dr Vincent GAUMET, pour m'avoir donné l'opportunité de participer à ce projet. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour votre confiance, vos conseils avisés et pour votre disponibilité tout au long de ces années.

Je souhaite également remercier les biologistes impliqués dans ce projet, dont Madame le Dr Imen MILADI et Madame le Dr Elisabeth MIOT-NOIRAULT. Plus particulièrement, je tiens à remercier cette dernière pour sa disponibilité et son implication dans la correction de cette thèse.

Je remercie les permanents et les non-permanents de l'UMR 990 que j'ai pu croiser pendant ces (nombreuses) années passées à l'unité et qui m'ont aidée d'une manière ou d'une autre. Plus particulièrement je tiens à remercier Philippe AUZELOUX, Laurent AUDIN, Pierre LABARRE, Jacqueline LEFRANCOIS, Sophie BESSE.

Je tiens à remercier chaleureusement Aurélien VIDAL qui m'a encadré pendant les étapes de radiomarquages. Merci pour ta pédagogie, ta disponibilité et ta bonne humeur. Ton talent et ton engouement pour les trails et les courses de fond m'ont permis de renouer avec les longs footings. Mon marathon se termine enfin.

Une pensée pour Latifa RBAH-VIDAL, merci pour tout. Bonne chance à vous deux.

Merci à Fifa, Mathieu, Emilie et Zied pour toutes les discussions et les afters-boulots. On ne le dira jamais assez, une bonne hydratation est essentielle pour la récupération ! Bonne chance à vous.

Je remercie Emmanuelle MOUNETOU pour ses analyses et discussions constructives. Merci également à Michèle BOREL pour toute l'aide apporté pendant cette thèse. Tes remarques, ta disponibilité, ton expérience et surtout ton implication dans le projet m'ont beaucoup apportés. Ton soutien m'a été précieux.

Je remercie Delphine et Benaïssa, mes compagnons ATER. Excellente continuation pour la suite.

Un coucou à Vanessa, qui était présente sur la fin de ma rédaction, et qui était dans la même situation. Bravo pour ta thèse, bonne chance pour la suite.

Une pensée pour Laetitia qui, dans la course à la soutenance, a largement gagné. Bravo, je m'incline.

Une énorme gratitude et une éternelle reconnaissance à Marie-Joséphine GALMIER, à Sébastien TARRIT et à Marie-Joëlle COURET. Merci pour votre accueil, votre aide, et surtout pour votre soutien dans les moments difficiles. Le bureau 323 me manquera, j'y reviendrais avec plaisir.

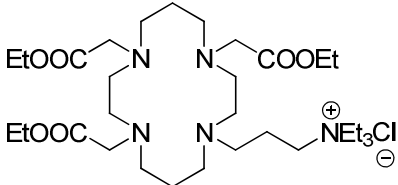
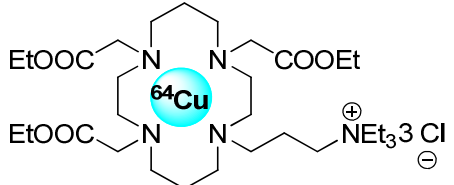
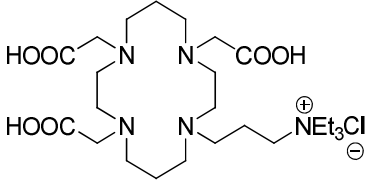
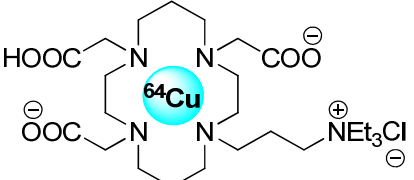
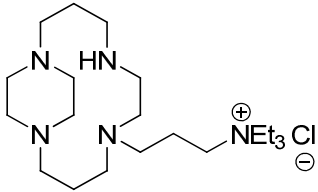
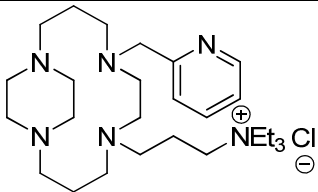
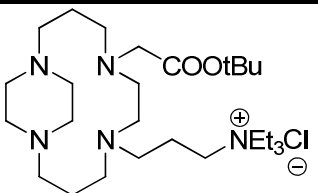
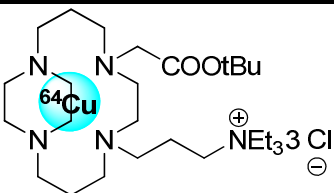
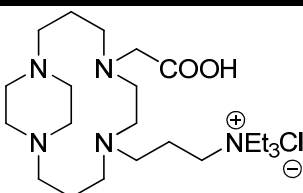
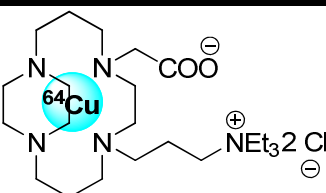
De plus, merci à Sébastien pour avoir réalisé toutes les analyses de masse et pour les discussions qui en ont découlés.

Cette thèse vous est dédiée.

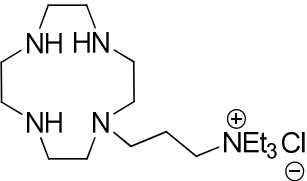
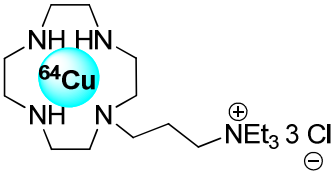
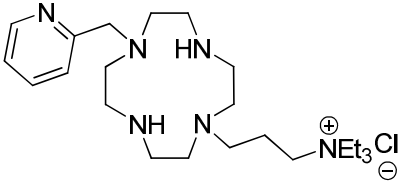
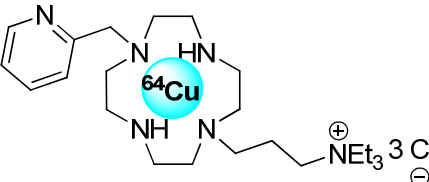
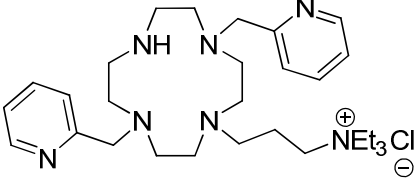
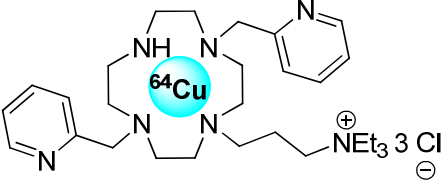
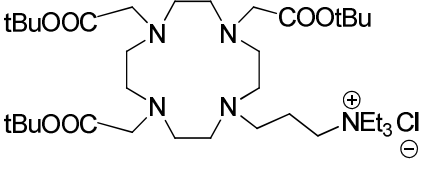
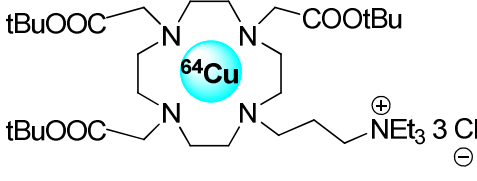
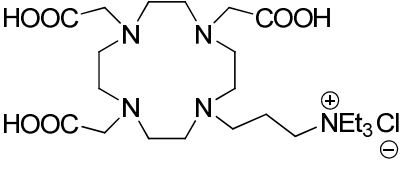
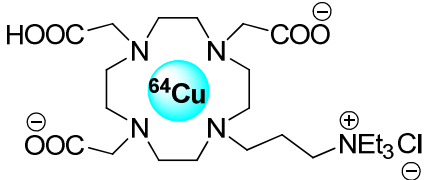
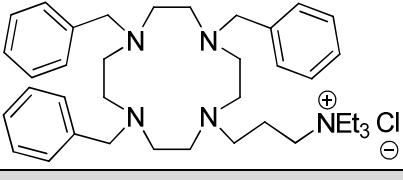
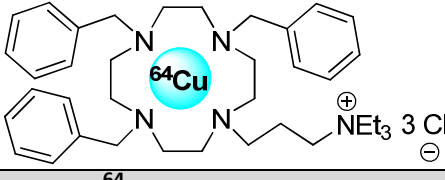
Last but not least : je remercie Céline qui a suivie toutes les étapes de cette thèse. J'ai relevé le défi de toucher la tache blanche, c'est parti en nyr grecque.

## Dérivés du cyclame

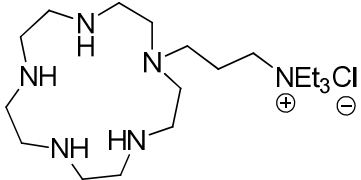
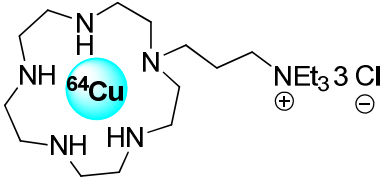
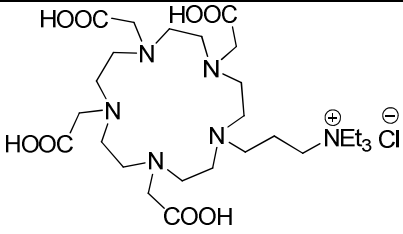
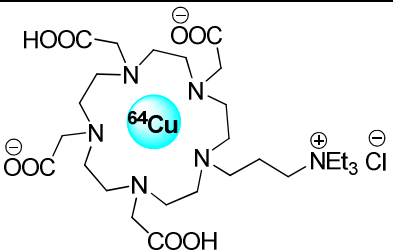
<b>Structure</b>		
<b>Abréviation</b>	<b>14-4 NTP</b>	<b><sup>64</sup>Cu-14-4 NTP</b>
<b>Numéro du composé</b>	<b>6</b>	<b>62</b>
<b>Structure</b>		
<b>Abréviation</b>	<b>1 PYR 14-4 NTP</b>	<b><sup>64</sup>Cu-1 PYR 14-4 NTP</b>
<b>Numéro du composé</b>	<b>10</b>	<b>63</b>
<b>Structure</b>		
<b>Abréviation</b>	<b>2 PYR 14-4 NTP</b>	<b><sup>64</sup>Cu-2 PYR 14-4 NTP</b>
<b>Numéro du composé</b>	<b>13</b>	<b>64</b>
<b>Structure</b>		
<b>Abréviation</b>	<b>TE2A(Et)2 NTP</b>	<b><sup>64</sup>Cu-TE2A(Et)2 NTP</b>
<b>Numéro du composé</b>	<b>21</b>	<b>65</b>
<b>Structure</b>		
<b>Abréviation</b>	<b>TE2A NTP</b>	<b><sup>64</sup>Cu-TE2A NTP</b>
<b>Numéro du composé</b>	<b>22</b>	<b>66</b>

<b>Structure</b>		
<b>Abréviation</b>	<b>TE3A(Et)3 NTP</b>	<b><sup>64</sup>Cu-TE3A(Et)3 NTP</b>
<b>Numéro du composé</b>	<b>27</b>	<b>67</b>
<b>Structure</b>		
<b>Abréviation</b>	<b>TE3A NTP</b>	<b><sup>64</sup>Cu-TE3A NTP</b>
<b>Numéro du composé</b>	<b>28</b>	<b>68</b>
<b>Structure</b>		-
<b>Abréviation</b>	<b>SB 14-4 NTP</b>	-
<b>Numéro du composé</b>	<b>31</b>	-
<b>Structure</b>		-
<b>Abréviation</b>	<b>SB 1 PYR 14-4 NTP</b>	-
<b>Numéro du composé</b>	<b>33</b>	-
<b>Structure</b>		
<b>Abréviation</b>	<b>SB TE1A(tBu) NTP</b>	<b><sup>64</sup>Cu-SB TE1A(tBu) NTP</b>
<b>Numéro du composé</b>	<b>36</b>	<b>69</b>
<b>Structure</b>		
<b>Abréviation</b>	<b>SB TE1A NTP</b>	<b><sup>64</sup>Cu-SB TE1A NTP</b>
<b>Numéro du composé</b>	<b>37</b>	<b>70</b>

## Dérivés du cyclène

Structure		
Abréviation	12-4 NTP	<sup>64</sup> Cu-12-4 NTP
Numéro du composé	41	71
Structure		
Abréviation	1 PYR 12-4 NTP	<sup>64</sup> Cu-1 PYR 12-4 NTP
Numéro du composé	45	72
Structure		
Abréviation	2 PYR 14-4 NTP	<sup>64</sup> Cu-2 PYR 12-4 NTP
Numéro du composé	48	73
Structure		
Abréviation	DO3A(tBu)3 NTP	<sup>64</sup> Cu-DO3A(tBu)3 NTP
Numéro du composé	50	74
Structure		
Abréviation	DO3A NTP	<sup>64</sup> Cu-DO3A NTP
Numéro du composé	51	75
Structure		
Abréviation	3 Bz 12-4 NTP	<sup>64</sup> Cu-3 Bz 12-4 NTP
Numéro du composé	53	76

## Dérivés de la 15-5

Structure		
Abréviation	<b>15-5 NTP</b>	<b><sup>64</sup>Cu-15-5 NTP</b>
Numéro du composé	<b>59</b>	<b>77</b>
Structure		
Abréviation	<b>4A 15-5 NTP</b>	<b><sup>64</sup>Cu-4A 15-5 NTP</b>
Numéro du composé	<b>61</b>	<b>78</b>

# Abréviations

<b>AQ</b>	Ammonium quaternaire
<b>CBF</b>	Chélatant bifonctionnel
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>CE</b>	Capture électronique
<b>DIV</b>	Disques intervertébraux
<b>DMA</b>	Diméthylacétamide
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane
<b>HFBA</b>	Acide heptafluorobutyrique
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>ITLC</b>	Instant thin-layer chromatography silica gel
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>p.i.</b>	Post injection
<b>PG</b>	Protéoglycane
<b>TA</b>	Température ambiante
<b>TEMP</b>	Tomographie par émission monophotonique
<b>TEP</b>	Tomographie par émission de positons
<b>THF</b>	Tétrahydrofurane





# Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Constituants essentiels de la matrice extracellulaire du cartilage .....	<b>10</b>
<b>Figure 2</b> : Articulations saine et arthrosique.....	<b>12</b>
<b>Figure 3</b> : Complexe de diéthylènetriaminopentaacétique (DTPA) gadolinium .....	<b>14</b>
<b>Figure 4</b> : L'hydroxyméthylène-diphosphonate marqué au technétium-99 métastable .....	<b>16</b>
<b>Figure 5</b> : Vues latérale et supérieure d'un DIV .....	<b>24</b>
<b>Figure 6</b> : Appareil de tomодensitométrie .....	<b>27</b>
<b>Figure 7</b> : Principe de la TEMP.....	<b>30</b>
<b>Figure 8</b> : Désintégration du positon, réaction d'annihilation ( <i>gauche</i> ) et détection des photons ( <i>droite</i> ).....	<b>31</b>
<b>Figure 9</b> : Structures chimiques du D-glucose et [ <sup>18</sup> F]FDG.....	<b>37</b>
<b>Figure 10</b> : Le radiotracteur <sup>99m</sup> Tc-NTP 15-5 .....	<b>38</b>
<b>Figure 11</b> : Structures des cinq anti-poisons.....	<b>39</b>
<b>Figure 12</b> : Structures de trois radiopharmaceutiques au <sup>99m</sup> Tc.....	<b>41</b>
<b>Figure 13</b> : Structure de la molécule 15-5.....	<b>43</b>
<b>Figure 14</b> : Structure schématique d'un chélatant bifonctionnel.....	<b>43</b>
<b>Figure 15</b> : Imagerie TEMP de la <sup>99m</sup> Tc-NTP 15-5 sur l'articulation fémoro-tibiale droite et gauche de rat sain et porteur d'arthrose à un stade précoce (jour 50) et tardif (jour 180) après la méniscectomie (F = fémur, T = tibia).....	<b>45</b>
<b>Figure 16</b> : Structures des polyamines acycliques EDTA et DTPA.....	<b>47</b>
<b>Figure 17</b> : Structures des polyamines cycliques cyclène, cyclame, DOTA, TETA et CB-TE2A.	<b>48</b>
<b>Figure 18</b> : Systèmes coronand et cryptand .....	<b>63</b>
<b>Figure 19</b> : Formation d'une fonction aminal .....	<b>64</b>
<b>Figure 20</b> : Structures du DOTA et du TETA .....	<b>65</b>
<b>Figure 21</b> : Renforcements « side-bridged » et « cross-bridged » sur le cyclène et le cyclame .....	<b>66</b>
<b>Figure 22</b> : Conformations du cyclam « cross-bridge » complexé.....	<b>67</b>
<b>Figure 23</b> : Mécanisme de clivage du pont glyoxal sur un cycle mono-fonctionnalisé pour l'obtention du renforcement side.....	<b>67</b>
<b>Figure 24</b> : Mécanisme de clivage du pont glyoxal sur un cycle di-fonctionnalisé pour l'obtention du renforcement cross.....	<b>67</b>
<b>Figure 25</b> : Proposition du mécanisme réactionnel de la condensation du glyoxal sur le cyclame .....	<b>73</b>
<b>Figure 26</b> : Structures moléculaires du cyclame-glyoxal (a) et du cyclène-glyoxal (b) .....	<b>73</b>
<b>Figure 27</b> : Proposition du mécanisme réactionnel de la condensation du formaldéhyde sur le cyclame .....	<b>76</b>
<b>Figure 28</b> : Structure moléculaire du cyclame-formaldéhyde .....	<b>77</b>
<b>Figure 29</b> : Schéma réactionnel hypothétique pour l'obtention du composé 16 .....	<b>78</b>

<b>Figure 30</b> : Comparaison des modes de coordinations du a) cyclène type I et b) cyclame type III .....	<b>92</b>
<b>Figure 31</b> : Schéma de désintégration du cuivre-64 .....	<b>100</b>
<b>Figure 32</b> : Imagerie TEP de la biodistribution du $^{64}\text{CuCl}_2$ aux temps 1 h et 3 h post-injection (n=2, A = 8,1 MBq) ; coupe coronale corps entier .....	<b>138</b>
<b>Figure 33</b> : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 62 (A = 12 MBq) ; coupe coronale corps entier.....	<b>139</b>
<b>Figure 34</b> : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 64 (A = 12 MBq) ; coupe coronale corps entier.....	<b>141</b>
<b>Figure 35</b> : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 65 (A = 12 MBq) ; coupe coronale corps entier.....	<b>142</b>
<b>Figure 36</b> : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 72 (A = 12 MBq) ; coupe coronale corps entier.....	<b>145</b>
<b>Figure 37</b> : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 73 (A = 12 MBq) ; coupe coronale corps entier.....	<b>146</b>
<b>Figure 38</b> : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 77 (A = 12 MBq) ; coupe coronale corps entier (a), coupe sagittale corps entier (b) .....	<b>148</b>
<b>Figure 39</b> : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 77 (A = 12 MBq) ; coupe coronale cage thoracique (a), coupe sagittale cage thoracique (b).....	<b>148</b>
<b>Figure 40</b> : Imagerie TEP 3 h p.i. du composé 77 (A = 12 MBq) ; prélèvement tumeur .....	<b>149</b>
<b>Figure 41</b> : Le radiotracteur $^{99\text{m}}\text{Tc-15-5 NTP}$ .....	<b>156</b>
<b>Figure 42</b> : Le radiotracteur $^{64}\text{Cu-15-5 NTP}$ (radiotracteur 77) .....	<b>157</b>

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Principaux GAGs .....	<b>7</b>
<b>Tableau 2</b> : Fonctionnalités de quelques PGs .....	<b>9</b>
<b>Tableau 3</b> : Comparaison entre imageries TEP et TEMP.....	<b>31</b>
<b>Tableau 4</b> : Principaux radionucléides utilisés en médecine nucléaire .....	<b>35</b>
<b>Tableau 5</b> : Rendement de synthèse en fonction de la nature du nucléofuge de l'alkylant et de la protection bisaminal.....	<b>75</b>
<b>Tableau 6</b> : Valeurs des constantes de formation des chélates 15-5, 14-4 et 12-4 .....	<b>93</b>
<b>Tableau 7</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 62.....	<b>103</b>
<b>Tableau 8</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 63.....	<b>105</b>
<b>Tableau 9</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 64.....	<b>106</b>
<b>Tableau 10</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 65.....	<b>108</b>
<b>Tableau 11</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 66.....	<b>110</b>
<b>Tableau 12</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 67.....	<b>112</b>
<b>Tableau 13</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 68.....	<b>113</b>
<b>Tableau 14</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 69.....	<b>115</b>
<b>Tableau 15</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 70.....	<b>117</b>
<b>Tableau 16</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 71.....	<b>118</b>
<b>Tableau 17</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 72.....	<b>119</b>
<b>Tableau 18</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 73.....	<b>120</b>
<b>Tableau 19</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 74.....	<b>122</b>
<b>Tableau 20</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 75.....	<b>123</b>
<b>Tableau 21</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 76.....	<b>124</b>
<b>Tableau 22</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 77.....	<b>125</b>
<b>Tableau 23</b> : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 78.....	<b>126</b>
<b>Tableau 24</b> : Biodistributions à 1 h p.i. et 3 h p.i. chez le rat ; résultats exprimés en % DI/g ± déviation standard .....	<b>135</b>
<b>Tableau 25</b> : Biodistributions à 1 h p.i. et 3 h p.i. chez le rat ; résultats exprimés en % DI/g ± déviation standard .....	<b>136</b>
<b>Tableau 26</b> : Rapports de fixation pour le composé 62.....	<b>140</b>
<b>Tableau 27</b> : Rapports de fixation à 1 h p.i. pour les composés 62 et 63.....	<b>141</b>
<b>Tableau 28</b> : Biodistributions à 1 h p.i. chez le rat de la <sup>64</sup> Cu-14-4 NTP et de la <sup>99m</sup> Tc-14-4 NTP (9) ; résultats exprimés en % DI/g ± déviation standard .....	<b>152</b>
<b>Tableau 29</b> : Biodistributions à 1 h p.i. chez le rat de la <sup>64</sup> Cu-15-5 NTP et de la <sup>99m</sup> Tc-15-5 NTP (9) ; résultats exprimés en % DI/g ± déviation standard .....	<b>152</b>



# Sommaire

<b>Avant-Propos</b> .....	<b>1</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>3</b>
<b>Chapitre 1 : Rappels bibliographiques</b> .....	<b>5</b>
<b>I. Les protéoglycanes et les pathologies liées à leurs atteintes</b> .....	<b>7</b>
<b>A. Glycosaminoglycanes et protéoglycanes</b> .....	<b>7</b>
<b>B. Arthrose</b> .....	<b>11</b>
1. Description .....	<b>11</b>
2. Diagnostic .....	<b>13</b>
3. Traitements .....	<b>16</b>
4. Conclusion .....	<b>18</b>
<b>C. Arthrite</b> .....	<b>19</b>
1. Description .....	<b>19</b>
2. Diagnostic .....	<b>19</b>
3. Traitement .....	<b>20</b>
4. Conclusion .....	<b>20</b>
<b>D. Chondrosarcome</b> .....	<b>21</b>
1. Description .....	<b>21</b>
2. Diagnostic .....	<b>21</b>
3. Traitement .....	<b>22</b>
4. Conclusion .....	<b>22</b>
<b>E. Les disques intervertébraux</b> .....	<b>23</b>
1. Structure et anatomie .....	<b>23</b>
2. Diagnostic et traitement .....	<b>24</b>
<b>II. Techniques d'imagerie médicale</b> .....	<b>26</b>
<b>A. Radiographie conventionnelle</b> .....	<b>26</b>
1. La radiographie standard (2D) .....	<b>26</b>
2. La tomodensitométrie (3D) .....	<b>27</b>
<b>B. Imagerie par Résonance Magnétique</b> .....	<b>28</b>
<b>C. L'imagerie scintigraphique</b> .....	<b>28</b>
1. Tomographie par émission monophotonique (TEMP) .....	<b>29</b>

2.	Tomographie par émission de positons (TEP) .....	<b>30</b>
3.	Comparaison TEP et TEM .....	<b>31</b>
D.	L'imagerie multimodale.....	<b>32</b>
<b>III.</b>	<b>Les explorations par émission en médecine nucléaire, applications aux protéoglycanes.....</b>	<b>34</b>
A.	Les radionucléides en médecine nucléaire .....	<b>34</b>
B.	Les médicaments radiopharmaceutiques .....	<b>36</b>
C.	Ciblage spécifique des protéoglycanes en TEMP au laboratoire .....	<b>38</b>
1.	Choix de la fonction ammonium quaternaire.....	<b>39</b>
2.	Choix du radionucléide .....	<b>40</b>
3.	Choix de la partie chélatante .....	<b>41</b>
4.	Conception et imagerie TEMP du radiotracteur .....	<b>43</b>
5.	Conception de nouveaux radiotraceurs.....	<b>45</b>
	<b>Chapitre 2 : Synthèses de nouveaux agents chélatants bi-fonctionnels (CBFs).....</b>	<b>61</b>
I.	<b>Synthèse du bromure de 3-bromo-<i>N,N,N</i>-triéthylpropan-1-aminium (composé 1)..</b>	<b>68</b>
II.	<b>CBFs dérivés du cyclame.....</b>	<b>69</b>
A.	Synthèse du chlorure de <i>N,N,N</i> -triéthyl-3-(1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)propan-1-aminium ou 14-4 NTP (composé 6).....	<b>69</b>
B.	Synthèse du chlorure de <i>N,N,N</i> -triéthyl-3-(8-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)propan-1-aminium ou 1 PYR 14-4 NTP (composé 10)..	<b>71</b>
C.	Synthèse du chlorure de 3-(4,11-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)- <i>N,N,N</i> -triéthylpropan-1-aminium ou 2 PYR 14-4 NTP (composé 13).....	<b>74</b>
D.	Synthèse du chlorure de 3-(4,11-bis(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)- <i>N,N,N</i> -triéthylpropan-1-aminium ou TE2A NTP (composé 22).....	<b>77</b>
E.	Synthèse du chlorure de 3-(4,8,11-tris(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)- <i>N,N,N</i> -triéthylpropan-1-aminium ou TE3A NTP (composé 28).....	<b>80</b>
F.	Synthèse du chlorure de 3-(1,5,8,12-tétraazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)- <i>N,N,N</i> -triéthylpropan-1-aminium ou SB 14-4 NTP (composé 31).....	<b>81</b>
G.	Synthèse du chlorure de <i>N,N,N</i> -triéthyl-3-(8-pyridin-2-ylméthyl)-1,5,8,12-tétraazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)propan-1-aminium ou 1 PYR SB 14-4 NTP (composé 33).....	<b>82</b>

H.	Synthèse du chlorure de 3-(8-(carboxyméthyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)- <i>N,N,N</i> -triéthylpropan-1-aminium ou SB TE1A NTP (composé 37) .....	<b>83</b>
<b>III.</b>	<b>CBFs dérivés du cyclène</b> .....	<b>84</b>
A.	Synthèse du chlorure de <i>N,N,N</i> -triéthyl-3-(1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminium ou 12-4 NTP (composé 41).....	<b>84</b>
B.	Synthèse du chlorure de <i>N,N,N</i> -triéthyl-3-(7-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminium ou 1 PYR 12-4 NTP (composé 45).....	<b>85</b>
C.	Synthèse du chlorure de 3-(4,10-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)- <i>N,N,N</i> -triéthylpropan-1-aminium ou 2 PYR 12-4 NTP (composé 48).....	<b>86</b>
D.	Synthèse du chlorure de <i>N,N,N</i> -triéthyl-3-(4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminium ou DO3A NTP (composé 51) .....	<b>87</b>
E.	Synthèse du chlorure de <i>N,N,N</i> -triéthyl-3-(4,7,10-tribenzyl-1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminium ou 3 Bz 12-4 NTP (composé 53).....	<b>88</b>
<b>IV.</b>	<b>CBFs dérivés de la 15-5</b> .....	<b>89</b>
A.	Synthèse du chlorure de <i>N,N,N</i> -triéthyl-3-(1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécan-1-yl)propan-1-aminium ou 15-5 NTP (composé 59).....	<b>89</b>
B.	Synthèse du chlorure de <i>N,N,N</i> -triéthyl-3-(4,7,10,13-tétrakis(carboxyméthyl)-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécan-1-yl)propan-1-aminium ou 4A 15-5 NTP (composé 61).....	<b>90</b>
<b>V.</b>	<b>Conclusion</b> .....	<b>91</b>
<b>Chapitre 3 : Radiomarquages <sup>64</sup>Cu</b> .....		<b>97</b>
<b>I.</b>	<b>La production du <sup>64</sup>Cu</b> .....	<b>99</b>
<b>II.</b>	<b>Le radiomarquage des CBFs au <sup>64</sup>Cu</b> .....	<b>100</b>
<b>A.</b>	<b>Méthode</b> .....	<b>101</b>
<b>1.</b>	<b>Radiomarquage</b> .....	<b>101</b>
<b>2.</b>	<b>Contrôle</b> .....	<b>102</b>
<b>B.</b>	<b><sup>64</sup>Cu-CBFs dérivés du cyclame</b> .....	<b>103</b>
<b>1.</b>	<b>Chlorure de chloro-<i>N,N,N</i>-triéthyl-3-(1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-14-4 NTP (composé 62)</b> .....	<b>103</b>
<b>2.</b>	<b>Chlorure de chloro-<i>N,N,N</i>-triéthyl-3-(8-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-1 PYR 14-4 NTP (composé 63)</b> .....	<b>104</b>



3. Chlorure de chloro-3-(4,11-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -2 PYR 14-4 NTP (composé 64)..... **106**
  4. Chlorure de chloro-3-(4,11-bis(éthylester)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -TE2A(Et)<sub>2</sub> NTP (composé 65) et chlorure de chloro-3-(4,11-bis(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -TE2A NTP (composé 66)... **107**
  5. Chlorure de chloro-3-(4,8,11-tris(éthylester)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -TE3A(Et)<sub>3</sub> NTP (composé 67) et du chlorure de chloro-3-(4,8,11-tris(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -TE3A NTP (composé 68)..... **111**
  6. Chlorure de chloro-3-(8-(éthanoate de *tert*-butyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -SB TE1A(*t*Bu) NTP (composé 69) et Chlorure de chloro-3-(8-(carboxyméthyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -SB TE1A NTP (composé 70)..... **115**
  7. Chlorure de 3-(1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium ou SB 14-4 NTP (composé 31) et chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(8-pyridin-2-ylméthyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)propan-1-aminium ou 1 PYR SB 14-4 NTP (composé 33) ..... **118**
- C.  $^{64}\text{Cu}$ -CBFs dérivés du cyclène ..... **118****
1. Chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -12-4 NTP (composé 71)..... **118**
  2. Chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(7-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -1 PYR 12-4 NTP (composé 72)..... **119**
  3. Chlorure de chloro-3-(4,10-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -2 PYR 12-4 NTP (composé 73) ..... **120**
  4. Chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tris(éthanoate de *tert*-butyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -DO3A(*t*Bu) NTP (composé 74) et chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -DO3A NTP (composé 75)..... **121**
  5. Chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tribenzyl-1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -3 Bz 12-4 NTP (composé 76)..... **124**

<b>D.</b>	<sup>64</sup> Cu-CBFs dérivés de la 15-5 NTP .....	<b>125</b>
1.	Chlorure de chloro- <i>N,N,N</i> -triéthyl-3-(1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécane-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup> Cu-15-5 NT (composé 77).....	<b>125</b>
2.	Chlorure de chloro- <i>N,N,N</i> -triéthyl-3-(4,7,10,13-tétrakis(carboxyméthyl)-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécane-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup> Cu-4A 15-5 NTP (composé 78).....	<b>126</b>
<b>E.</b>	Conclusion .....	<b>127</b>
<b>Chapitre 4 : Etudes de biodistribution et imagerie TEP des CBFs marqués au <sup>64</sup>Cu.....</b>		<b>131</b>
<b>I.</b>	<b>Biodistribution .....</b>	<b>133</b>
<b>II.</b>	<b>Imagerie TEP .....</b>	<b>137</b>
<b>A.</b>	<sup>64</sup> CuCl <sub>2</sub> .....	<b>138</b>
<b>B.</b>	CBFs dérivés du cyclame.....	<b>139</b>
1.	<sup>64</sup> Cu-14-4 NTP (composé 62).....	<b>139</b>
2.	<sup>64</sup> Cu-1 PYR 14-4 NTP (composé 63).....	<b>140</b>
3.	<sup>64</sup> Cu-2 PYR 14-4 NTP (composé 64).....	<b>141</b>
4.	<sup>64</sup> Cu-TE2A(Et) <sub>2</sub> NTP (composé 65).....	<b>142</b>
5.	<sup>64</sup> Cu-TE3A NTP (composé 68).....	<b>143</b>
6.	<sup>64</sup> Cu-SB TE1A(tBu) NTP (composé 69).....	<b>143</b>
7.	<sup>64</sup> Cu-SB TE1A NTP (composé 70).....	<b>144</b>
<b>C.</b>	CBFs dérivés du cyclène.....	<b>144</b>
1.	<sup>64</sup> Cu-12-4 NTP (composé 71).....	<b>144</b>
2.	<sup>64</sup> Cu-1 PYR 12-4 NTP (composé 72).....	<b>145</b>
3.	<sup>64</sup> Cu-2 PYR 12-4 NTP (composé 73).....	<b>146</b>
4.	<sup>64</sup> Cu-DO3A NTP (composé 75).....	<b>146</b>
5.	<sup>64</sup> Cu-3 Bz 12-4 NTP (composé 76).....	<b>147</b>
<b>D.</b>	CBFs dérivés de la 15-5.....	<b>148</b>
1.	<sup>64</sup> Cu-15-5 NTP (composé 77).....	<b>148</b>
2.	<sup>64</sup> Cu-4A 15-5 NTP (composé 78).....	<b>149</b>
<b>III.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>150</b>
<b>IV.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>153</b>
<b>Conclusions et Perspectives .....</b>		<b>156</b>
<b>Partie expérimentale .....</b>		<b>160</b>
<b>I.</b>	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>162</b>

<b>A.</b>	<b>Chimie</b> .....	<b>162</b>
<b>B.</b>	<b>Radiochimie</b> .....	<b>164</b>
<b>C.</b>	<b>Biologie</b> .....	<b>164</b>
<b>1.</b>	<b>Biodistribution</b> .....	<b>164</b>
<b>2.</b>	<b>Imagerie TEP</b> .....	<b>165</b>
<b>II.</b>	<b>Synthèses</b> .....	<b>165</b>

# Avant-Propos

Extrait du discours prononcé le 12 décembre 1935 par Frédéric Joliot lors de la remise du prix Nobel obtenu avec son épouse Irène Joliot-Curie :

*« The method of radioactive tracers until now confined to elements of large atomic weights can be extended to a large number of elements distributed over the full extent of the periodic classification. In biology, for example, the tracer method, making use of synthetic radio-elements, will simplify the problems of the location and elimination of the various elements introduced into living organisms. In this case, radioactivity serves only to determine the presence of an element in a particular region of the organism. There is no point, in research of this kind, in introducing large quantities of the radioactive tracer. The quantities are determined by the sensitivity of the radiation detecting apparatus and the size of the vegetable or animal organism. In places, which will be more readily known by the use of this method, the radiation emitted will produce its effect on the adjacent cells. For this second mode of employment, large quantities of radio-elements will be required. This will probably become a practical application in medicine. »*

« La méthode des indicateurs radioactifs jusqu'alors réservée aux éléments de masse atomique élevée peut être généralisée à un très grand nombre d'éléments distribués dans toute l'étendue de la classification périodique. En biologie, par exemple, la méthode des indicateurs, employant les radioéléments synthétiques, permettra d'étudier plus facilement le problème de la localisation et de l'élimination d'éléments divers introduits dans les organismes vivants. Dans ce cas, la radioactivité sert uniquement à déterminer la présence d'un élément dans telle ou telle région de l'organisme. Il n'est pas utile dans ces recherches d'introduire des quantités importantes de l'élément radioactif. Ces quantités sont fixées par la sensibilité de l'appareil détecteur de rayons et la grosseur de l'organisme végétal ou animal. Aux endroits, que l'on apprendra ainsi à mieux connaître, où les radioéléments seront localisés, le rayonnement qu'ils émettent produira son action sur les cellules voisines. Pour ce deuxième mode d'emploi, il sera nécessaire d'utiliser des quantités importantes de radioéléments. Ceci trouvera probablement une application pratique en médecine ».

Ce court texte de Frederic Joliot montre qu'il avait déjà perçu tout l'intérêt des radioisotopes (indicateurs radioactifs) pour la biologie et la médecine.

De ces lignes, il est possible d'extrapoler le rôle de ces isotopes radioactifs dans les études de mécanistiques en biologie mais aussi le potentiel de radiotraceur préfigurant l'imagerie *in vivo* par détection externe ainsi que la radiothérapie interne.

Il avait en fait anticipé la naissance du médicament radiopharmaceutique et perçu la nécessité de développer des détecteurs performants en parallèle.

C'est l'évolution concomitante de ces deux grands axes de développement : mise au point de radiotraceurs et évolution de la sensibilité des détecteurs qui ont conduit à la médecine nucléaire moderne que nous connaissons actuellement.

Dans ce travail, nous évoquerons la mise au point de nouveaux radiotraceurs, radiopharmaceutiques potentiels. Cette mise au point implique plusieurs étapes :

- Découvrir une cible biologique pertinente.

Son expression doit à la fois être quantitativement suffisante et ses variations doivent être étroitement corrélées à l'état normal ou pathologique de la cellule du tissu ou de l'organe.

- Concevoir et construire un radiotraceur spécifique de cette cible.

Le radiotraceur doit à la fois s'associer pour permettre la mise en évidence de la cible et ne pas perturber son fonctionnement. Selon la nature de son rayonnement, il trouvera des applications en imagerie par détection externe ou en radiothérapie interne.

- Montrer sa pertinence *in vivo* sur différents modèles.

Il ne doit pas être bio-transformé avant d'atteindre la cible, pour la marquer et donc la repérer, l'imager (lors d'un contraste suffisant), voire la quantifier ou la détruire.

- Préparer son transfert clinique.

C'est le but ultime du radiopharmaceutique.

Les trois premiers points, qui constituent la preuve de concept sont abordés dans cette thèse sur le thème des protéoglycanes, cible potentielle pour l'imagerie par tomographie de positons (TEP) des pathologies du cartilage.

# Introduction

L'Unité Mixte de Recherche 990 INSERM/Université d'Auvergne, intitulée « Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée », est rattachée à l'Institut Thématique Multi-Organisme « Technologies pour la Santé » et au Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA). Les recherches qui y sont effectuées se focalisent principalement sur le diagnostic et le traitement de la maladie cancéreuse. Ainsi des vecteurs moléculaires sont développés afin de servir de support pour adresser sélectivement un principe actif (radioactif ou non) capables de cibler un tissu ou un mécanisme biochimique propre aux lésions tumorales. Les travaux effectués au sein de cette unité portent notamment sur deux types de cancer : le mélanome et le chondrosarcome. La composition pluridisciplinaire de cette unité alliant des savoirs-faire de chimie, de radiochimie, de biologie moléculaire, de biochimie et de pharmacologie permet une approche transversale des différentes problématiques posées, en concertation étroite avec les cliniciens du Centre Régional de Lutte contre le Cancer Jean Perrin et du Centre Hospitalier Universitaire Gabriel Montpied.

Depuis plusieurs années les chercheurs de l'UMR 990 développent un radiotraceur, le  $^{99m}\text{Tc}$ -15-5 NTP, permettant de cibler les protéoglycanes (PGs), un des constituants du cartilage articulaire. Possédant une structure macrocyclique azotée adaptée à la complexation d'un isotope radioactif et fonctionnalisée par un vecteur des protéoglycanes, ce radiotraceur a prouvé son efficacité pour l'imagerie par tomographie d'émission mono-photonique (TEMP) du chondrosarcome.

Le chondrosarcome est une tumeur osseuse représentant environ 25% des tumeurs malignes osseuses, et dont la prévalence est estimée à 120 nouveaux cas par an en France. Caractérisé par la croissance anarchique de cellules cartilagineuses, ce cancer est généralement diagnostiqué à un stade avancé de la pathologie. Du fait de sa forte résistance à la chimiothérapie et radiothérapie, il est nécessaire d'avoir des marges chirurgicales larges, pouvant aboutir à une invalidité fonctionnelle majeure ou à l'amputation. Un diagnostic précoce de cette tumeur permettrait donc d'apporter une réponse thérapeutique appropriée, limitant ainsi les risques de dissémination ou de récurrence après traitement.

Le  $^{99m}\text{Tc}$ -15-5 NTP pourrait également devenir le radiotraceur de référence pour les pathologies dégénératives du cartilage, telles que l'arthrose, l'arthrite mais également les pathologies touchant les disques intervertébraux. Ces dernières, qui affectent un très grand nombre de personnes dans le monde, sont généralement détectées lors de l'apparition de douleurs, à un stade où les dégâts infligés au cartilage sont souvent irréversibles. La mise en place d'un examen permettant de diagnostiquer l'intégrité du cartilage à un stade post-symptomatique permettrait de contrôler ces affections.

Cette thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux de recherche, avec le développement d'une nouvelle gamme de radiotraceurs porteurs de la fonction vectrice aux PGs et permettant la complexation d'un isotope radioactif dédié à l'imagerie TEP. Cette méthodologie est en effet plus sensible que la TEMP et permet une quantification absolue, qui assure une identification de la densité de la zone radioactive, caractéristiques favorables pour établir un diagnostic précoce et assurer le suivi longitudinal des pathologies du cartilage.

Cette thèse s'articule autour de quatre grands chapitres. Le premier est consacré à une introduction bibliographique présentant les PGs, un des constituants essentiel du cartilage, ainsi que les pathologies liées à leurs atteintes et modifications. Un rappel des techniques d'imageries permettant de diagnostiquer ces pathologies ainsi qu'un historique du radiotraceur développé à l'unité permettront de compléter cette partie. Les chapitres 2, 3 et 4 décriront les travaux réalisés au cours de ce travail de thèse, respectivement en chimie, radiochimie et biologie. Enfin, les protocoles expérimentaux mis en jeu seront exposés à la suite du dernier chapitre.

# **Chapitre 1**

## **Rappels bibliographiques**





# I. Les protéoglycane et les pathologies liées à leurs atteintes

## A. Glycosaminoglycane et protéoglycane

Les glycosaminoglycane (GAGs) sont des polysaccharide non ramifié composé d'unités disaccharidique répétitive (1). Un des résidu glucidique de l'unité disaccharidique est un acide uronique et l'autre sucre, un ose aminé (*N*-acétylglucosamide ou *N*-acétylgalactosamine). Selon la nature de l'unité disaccharidique répétée, on distingue : l'héparane sulfate, le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, l'héparine, le kératane sulfate et l'acide hyaluronique (2). Ce dernier est le seul GAG constitué d'unités disaccharidique non sulfatées, c'est également le GAG qui possède la chaîne la plus longue, jusqu'à 25 000 unités disaccharidique (Tableau 1).

<b>Héparane sulfate</b>	<b>Chondroïtine sulfate</b>
<b>Dermatane sulfate</b>	<b>Héparine</b>
<b>Kératane sulfate</b>	<b>Acide hyaluronique</b>

Tableau 1 : Principaux GAGs

Les principales propriétés physico-chimiques des GAGs, conséquences directes de leurs structures chimiques chargées négativement à pH physiologique (1), sont :

- une impossibilité de former une structure globulaire compacte,
- un caractère hydrophile marqué,
- la formation de gels à faible concentration,
- la résistance à la compression.

Un PG est formé par liaison(s) covalente(s) d'une ou plusieurs chaînes de GAGs (à l'exception de l'acide hyaluronique et de l'héparine) sur une glycoprotéine appelée protéine centrale.

Les PGs forment un groupe varié de macromolécules. Cette diversité est le résultat des multiples combinaisons possibles entre :

- les différentes séquences et longueur des protéines centrales,
- le nombre, la longueur et le type des GAGs liés (3). Quand un PG est constitué de plusieurs types de GAGs, on parle de PG hybride.

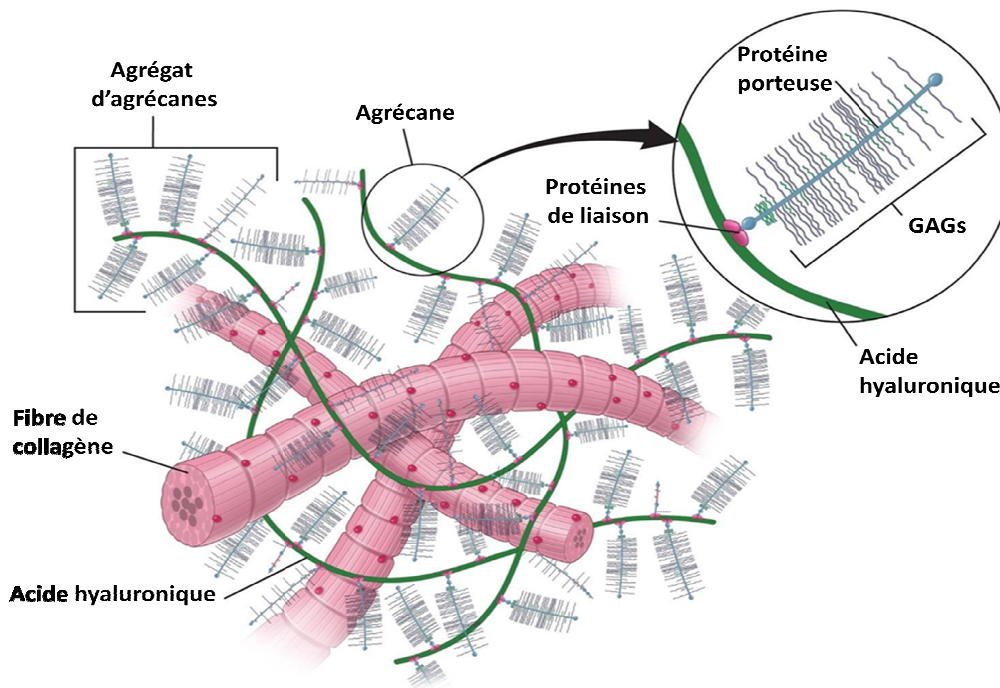
L'arrangement des résidus sucrés dans les chaînes de GAGs et la modification de sucres spécifiques dans ces chaînes peuvent déterminer leur fonction et celle des PGs qui les contiennent. Certains PGs jouent un rôle mécanique, d'autres dans la signalisation cellulaire, d'autres influent sur l'activité sécrétoire des cellules et d'autres encore agissent sur les processus de l'inflammation.

Les PGs peuvent être classés en deux catégories : ceux sécrétés dans la matrice extracellulaire (MEC) et ceux qui font partie de la membrane plasmique, aussi appelés PGs de surface ou transmembranaire. Pour ces derniers, la protéine centrale du PG traverse la bicouche lipidique ou est liée à un glycosyl phosphatidylinositol. Ils permettent ainsi de lier les cellules à la MEC et/ou de déclencher une réponse de la cellule à un signal extra cellulaire. Quelques protéoglycanes, leurs caractéristiques structurales et leurs fonctions sont répertoriées dans le tableau 2.

Protéoglycane	Poids moléculaire moyen de la protéine porteuse	Type de chaînes GAG	Nombre de chaînes GAG	Localisation	Fonctions
<b>Agrécane</b>	210 000	Chondroïtine sulfate + kératane sulfate	≈ 130	Cartilage	Support mécanique ; forment des agrégats d'agrécane avec l'acide hyaluronique
<b>Bêtaglycane</b>	36 000	Chondroïtine sulfate/dermatane sulfate	1	Matrice cellulaire ou péricellulaire	Couplage avec TGF-β
<b>Décorine</b>	40 000	Chondroïtine sulfate/dermatane sulfate	1	Tissus conjonctifs	Couplage avec les fibres de collagène de type I et TGF-β
<b>Perlécane</b>	600 000	Héparane sulfate	2-15	Lames basales	Fonction structurale et filtrante dans la lame basale
<b>Syndécane-1</b>	32 000	Chondroïtine sulfate + héparane sulfate	1-3	Cellules épithéliales	Adhésion cellulaire ; couplage avec FGF et d'autres facteurs de croissance
<b>Dally</b>	60 000	Héparane sulfate	1-3	Surface des cellules	Co-récepteur pour deux protéines de signalisation (Wg et Dpp)

**Tableau 2 : Fonctionnalités de quelques PGs**

Les PGs sont constitutifs des tissus de soutien, tels que le tissu conjonctif, dont le cartilage. L'agrécane constitue le PG majoritaire du cartilage. Celui-ci est constitué d'environ 100 chaînes de chondroïtine sulfate et de 30 chaînes de kératane sulfate liées à la protéine centrale riche en sérine et constituée par environ 3000 acides aminés, soit environ une chaîne de GAG tous les 20 acides aminés. Ces PGs, appelés monomères d'agrécane, sont liés de façon non covalente à une longue chaîne d'acide hyaluronique par l'intermédiaire de protéines de liaison pour former l'agrégat d'agrécane (Figure 1).



**Figure 1 : Constituants essentiels de la matrice extracellulaire du cartilage (4)**

Les agrégats d'agrécane, responsables de la densité anionique du cartilage, sont insérés dans un réseau de fibre de collagène. Ils sont à la base des propriétés physiques, mécaniques et biochimiques du cartilage, en particulier de son hydratation (l'eau occupe 70 à 80% du volume du cartilage) et de sa résistance aux forces compressives (5). Cette eau permet la souplesse et l'élasticité dans les mouvements mécaniques (6), ainsi que la nutrition du tissu (7), tandis que les fibres de collagène confèrent la résistance à l'étirement.

Le tissu cartilagineux est formé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes, répartis dans une MEC abondante (95% du volume total) et complexe (8). Les chondrocytes assurent la synthèse et la dégradation de tous les composants de la MEC cartilagineuse. Ce renouvellement de la matrice est primordial pour préserver l'intégrité physiologique et fonctionnelle du cartilage (9).

Le collagène et l'agrégat d'agrécane sont les deux constituants majoritaires de la MEC cartilagineuse. On peut distinguer :

- les cartilages hyalins (cartilages articulaires, cartilages costaux...) où parmi les différents collagènes présents, le collagène II est le plus abondant,

- les cartilages fibreux (disques intervertébraux, ménisques du genou...) où le collagène de type I prédomine.
- les cartilages élastiques (oreille externe, épiglotte, larynx...) où le collagène de type II prédomine.

La MEC est également constituée d'enzymes protéolytiques permettant la dégradation de la matrice au cours de son renouvellement (métalloprotéinases matricielles et agrécanases) et de nombreux facteurs de croissance et cytokines produits par les chondrocytes et/ou provenant d'autres cellules (monocytes/macrophages).

Une des particularités du cartilage est qu'il est aneural, avasculaire et alymphatique (1) (9) (10). Les chondrocytes vivent donc en milieu hypoxique, avec des taux d'oxygène compris entre 1% et 7% suivant la profondeur dans le tissu cartilagineux. Les éléments nutritifs et l'oxygène proviennent du liquide synovial qui diffuse dans le tissu par différences de pression osmotique au travers de la MEC (11) (12).

Le travail développé durant cette thèse consiste à développer et à caractériser des radiomarqueurs spécifiques des PGs du cartilage. Parmi eux, l'agrécan, un des constituants essentiels du cartilage avec le collagène, est une cible de choix. De nombreuses pathologies diagnostiquées tardivement découlent de l'atteinte de l'intégrité des PGs, résultant en une dégradation (arthrose, arthrite, pathologies des disques intervertébraux) ou à une surexpression (chondrosarcome) de ceux-ci. La mise au point d'un radiotraceur spécifique des PGs permettrait donc une meilleure prise en charge de ces pathologies tant sur le plan diagnostique que thérapeutique via l'établissement d'un suivi longitudinal efficace.

## **B. Arthrose**

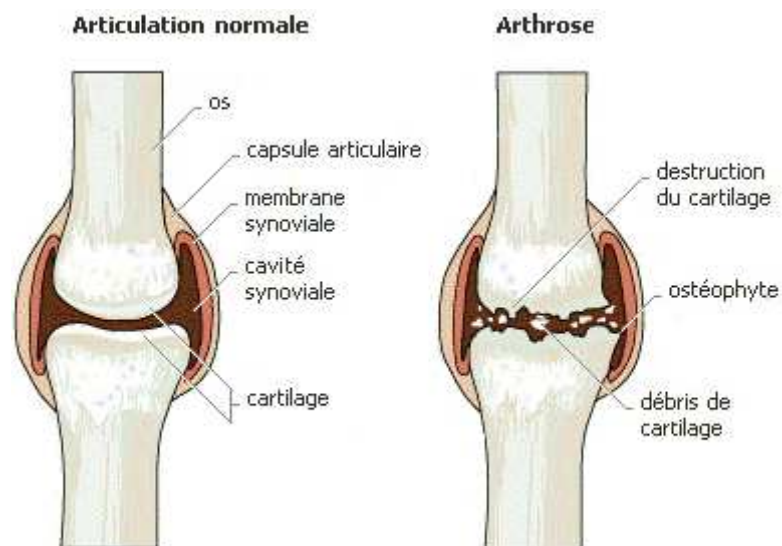
### **1. Description**

L'arthrose est une maladie chronique dégénérative affectant les articulations, principalement celles du genou, de la hanche et de la main (13). C'est une maladie commune touchant près de dix millions de français, elle affecte plus particulièrement les personnes de

plus de 65 ans, à hauteur de 60 à 70%. Les coûts directs de l'arthrose représentaient en 2002 près de 1,6 milliards d'euros, soit environ 1,7% des dépenses de l'assurance maladie en France (14).

Elle se caractérise par la destruction plus ou moins rapide du cartilage qui s'étend à toutes les structures de l'articulation, la sclérose des os et la formation d'ostéophytes ou de kystes (7) (15). L'arthrose est source de douleurs provoquant un handicap majeur avec une perte de mobilité.

En effet, dans une articulation saine, le glissement entre les deux os, recouverts à cet endroit de cartilage pour réduire les frictions, est assuré par un liquide lubrifiant appelé liquide synovial ou synovie, contenu dans une cavité délimitée par la membrane synoviale, elle-même entourée d'une capsule fibreuse appelée capsule articulaire. Dans une articulation arthrosique, la dégradation du cartilage entraîne un pincement de l'articulation, les deux extrémités osseuses se rapprochent, exposant les os à des frictions. Ceux-ci vont se fissurer et se fracturer dans la cavité synoviale, engendrant une prolifération osseuse vers l'extérieur de l'articulation et aboutissant à la formation d'excroissances osseuses appelées ostéophytes (Figure 2).



**Figure 2 : Articulations saine et arthrosique (16)**

Dans les premiers stades de la maladie, l'activité de synthèse des chondrocytes augmente face à l'agression pour stimuler la synthèse de la matrice cartilagineuse dans une

tentative de réparation. Mais parallèlement la synthèse d'enzymes de dégradation du cartilage, les métalloprotéases matricielles (MMPs), et de cytokines cataboliques pro-inflammatoires augmente également (17). Les chondrocytes se retrouvent rapidement dans l'incapacité de compenser le déséquilibre conduisant à un état proche de l'apoptose (11) (12) (18) (19) (20). La perte locale des PGs influent directement sur l'hydratation du cartilage à l'origine de ses propriétés viscoélastiques et des propriétés rhéologiques de l'articulation.

Le déséquilibre anabolisme/catabolisme observé pour les PGs associée à des modifications délétères de leurs chaînes de GAG (21) et la rupture de l'homéostasie tissulaire, favorisent les processus de dégradation au détriment des mécanismes de biosynthèse et représentent des facteurs déterminants de la détérioration du cartilage et de la fonction articulaire (21) (22).

## **2. Diagnostic**

L'arthrose peut être diagnostiquée par différentes méthodes d'imagerie, chacune basées sur des facteurs caractéristiques de la maladie.

- Par radiographie :

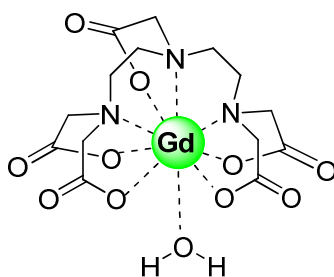
La technique d'imagerie de référence la plus simple, la moins onéreuse et la plus largement répandue pour poser le diagnostic de l'arthrose est la radiographie conventionnelle (23). Elle permet de visualiser les conséquences indirectes de l'arthrose, par la mesure de l'espace inter-articulaire et la présence d'ostéophytes au stade tardif de la pathologie (24). Cette technique d'imagerie présente toutefois quelques inconvénients. En effet, elle est limitée pour une évaluation précoce de la maladie à cause de son seuil de détection. Dans l'exemple du genou, la plus petite différence détectable dans le calcul de l'espace articulaire est d'environ 0,20 mm pour une diminution annuelle prévue d'environ 0,15 mm (13). La radiographie conventionnelle ne permet pas de visualiser le tissu cartilagineux (25), et est peu adaptée à la progression lente de la maladie (26).



- Par IRM :

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est la technique d'imagerie anatomique du cartilage la plus répandue, bien qu'elle soit plus coûteuse (23). Elle reste néanmoins un outil important dans la recherche médicale des pathologies dégénératives des articulations, permettant un excellent contraste et un accès aux changements morphologiques (informations sur la taille et l'intégrité structurelle) du tissu cartilagineux à un stade très précoce de la pathologie (27). En routine, elle est essentiellement exploitée pour mesurer l'épaisseur du cartilage.

Parmi les techniques d'IRM appliquées, une en particulier est intéressante : appelée dGEMRIC (delayed Gadolinium Enhanced MRI of Cartilage), elle est destinée à mesurer la densité de charges négatives dans le cartilage. Un agent de contraste, un complexe au gadolinium Gd-DTPA (Figure 3), est injecté au patient avant l'imagerie. Gd-DTPA étant un complexe anionique, il va être repoussé de la MEC qui est fortement chargée négativement. Par conséquent, la présence de Gd-DTPA au sein du cartilage sera inversement proportionnelle à la concentration en PGs (28). Cette technique est une méthode non invasive d'évaluation indirecte de la concentration en PGs du tissu cartilagineux. Cependant, elle présente l'inconvénient d'un temps d'attente, nécessaire pour atteindre l'équilibre, trop long entre l'injection du produit et l'examen d'imagerie proprement dit (28). Bien que permettant d'imager les PGs en surface, une pénétration incomplète de la molécule dans les couches profondes du cartilage va résulter en une surestimation de la quantité de PGs, remettant en question cette méthode comme outil dans les recherches cliniques pour la détection précoce de la dégradation du cartilage dans les pathologies dégénératives des articulations (29). L'encombrement stérique du maillage collagénique sera plus ou moins affecté selon le degré d'avancement de la pathologie, influençant la diffusion de l'agent de contraste (30). Enfin, l'utilisation d'une telle séquence sur l'appareil n'est pas routinière (31).



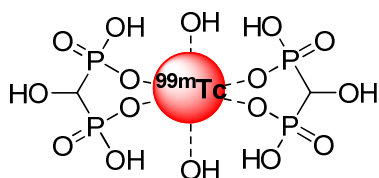
**Figure 3 : Complexe de diéthylènetriaminopentaacétique (DTPA) gadolinium**

L'IRM utilisant un agent de contraste cationique présente l'avantage de faciliter sa diffusion au sein du cartilage de l'articulation (32). Cette notion est illustrée depuis longtemps par l'IRM du sodium. En effet cet ion est très présent dans le liquide synovial afin de contrebalancer la forte densité négative du cartilage et assurer l'électroneutralité de l'environnement articulaire. La proportion de sodium sera donc équivalente à celle des PGs, et l'étude de ce noyau par IRM va permettre une étude non invasive de l'intégrité du cartilage (33). L'inconvénient de cette méthode est que le signal du sodium est très bref et donc difficile à capter, sa durée de vie est mille fois inférieure à celle du proton, affectant la sensibilité de la méthode. La difficulté de sa mise en œuvre *in vivo* ainsi qu'une mauvaise résolution spatiale sont actuellement un frein à cette technique. Cette méthode d'imagerie est intéressante mais nécessite des études plus poussées ainsi qu'une optimisation pour une utilisation en routine pour pouvoir prétendre à un usage routinier en diagnostic clinique (23).

- Par scintigraphie :

L'imagerie scintigraphique peut également être utilisée pour diagnostiquer l'arthrose afin de donner des informations sur les changements métaboliques au sein de l'articulation pathologique. La TEP utilisant le radiopharmaceutique 2-<sup>18</sup>F-fluoro-2-désoxy- $\alpha$ -glucose ([<sup>18</sup>F]FDG) met en évidence le métabolisme du glucose, et permet la détection d'inflammations associées à l'arthrose (34) (35). Il a été démontré que cette technique d'imagerie permettait la délimitation de la zone inflammatoire déclenchée par la présence d'ostéophytes dans la cavité synoviale des grosses articulations telles que le genou ou la hanche, mais qu'elle ne permettait pas de visualiser le cartilage articulaire (34). De plus, le manque de résultats concernant les premiers stades de la maladie arthrosique ne permet pas d'établir un schéma évolutif prédictif de la maladie.

L'imagerie TEMP du métabolisme osseux est également utilisée. Le <sup>99m</sup>Tc-HMDP (Figure 4), qui se fixe sur un constituant minéral de l'os, permet la visualisation de lésions au niveau du squelette. Cependant, l'atteinte osseuse n'apparaît que lorsque le cartilage est lui-même très dégradé. Cette approche est non seulement indirecte pour quantifier l'atteinte du cartilage, mais également tardive.



**Figure 4 : L'hydroxyméthylène-diphosphonate marqué au technétium-99 métastable**

- Par arthroscopie :

Une autre technique, appelé arthroscopie, est une pratique chirurgicale permettant de visualiser l'articulation, d'effectuer des prélèvements ou de réaliser des petits gestes chirurgicaux. Permettant une visualisation directe du cartilage et des structures environnantes, elle trouve son intérêt dans la détection précoce de l'arthrose et peut être utilisée en complément des autres techniques d'imagerie (36). Malgré le fait qu'elle permette une évaluation non destructive de la structure et des propriétés anatomiques du cartilage (37), elle reste néanmoins une technique invasive qui ne permet pas de différencier l'arthrose des autres maladies articulaires dégénératives (38).

- A l'aide de marqueurs biochimiques :

Les marqueurs biochimiques du métabolisme des articulations saines ou arthrosiques sont des molécules ou des fragments de molécules qui sont relarguées dans le liquide synovial essentiellement. Ils permettent d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de l'arthrose et la prédiction des changements structurels. Cependant, le doute persiste sur la réelle lecture que l'on peut leur donner.

### **3. Traitements**

Comme évoqué précédemment, le cartilage est aneural, par conséquent les changements apparaissant au sein de sa structure ne révèlent des signes cliniques qu'au moment où les tissus innervés de l'environnement direct sont touchés : la membrane synoviale en particulier, mais aussi l'os sous-chondral, les ligaments et les tendons. C'est une des raisons pour laquelle l'arthrose est diagnostiquée à un stade avancé de la maladie (13). La douleur est le principal symptôme à traiter, ainsi la seule attitude thérapeutique consiste

en la prescription d'analgiques et d'anti-inflammatoires (39). Cependant, leur action, certes rapide, se limite aux symptômes sans agir directement sur les mécanismes constitutifs de la maladie arthrosique. De plus, leur prescription au long terme n'est pas dénuée d'effets indésirables digestifs graves (ulcères, perforations, hémorragies) et rénaux, ce qui limite leur utilisation dans le temps, surtout chez les sujets âgés ou présentant des antécédents de pathologie digestive. Ainsi, le seul traitement actuel consiste en la pose d'une prothèse, permettant de remplacer l'articulation atteinte.

Certains traitements ont également démontrés leur effet thérapeutique sur la douleur, réduisant la prescription médicamenteuse. Parmi ceux-ci, on peut citer l'injection d'acide hyaluronique, particulièrement utilisée dans l'arthrose du genou. Celle-ci vise le rétablissement des propriétés visco-élastiques du liquide synovial dans le but de diminuer les lésions cartilagineuses dues aux contraintes mécaniques. Cependant, certaine forme d'arthrose (telle qu'affectant la hanche et le genou) peuvent engendrer des handicaps sévères, justifiant la pose d'une prothèse. Si elle permet le plus souvent d'améliorer nettement la qualité de vie, son efficacité est néanmoins limitée à une quinzaine d'année en moyenne.

Les recherches actuelles pour le traitement de l'arthrose se focalisent sur la mise au point d'agents permettant la réduction voire l'arrêt de la progression de la maladie. Très nombreux, ces agents, connus sous l'appellation DMOADs (disease modifying osteoarthritis drugs), ciblent différentes voies telles que le remodelage osseux (vitamine D...) ou la réparation du cartilage articulaire au stade précoce de la pathologie (doxycycline...). Cependant, elles nécessitent d'intervenir au début de la pathologie. Ces stratégies ne résultent pas en une réparation complète du cartilage défaillant et ne perdurent pas sur le long terme, mais elles permettent de réduire provisoirement les symptômes associés à l'arthrose (39).

#### 4. Conclusion

Les pathologies dégénératives du cartilage, telles que l'arthrose, posent un réel problème de santé publique dans les pays développés du fait du vieillissement de la population. La prise en charge thérapeutique est, jusqu'à présent, essentiellement symptomatique, (générant plus de 14 millions de prescriptions par an en France, auxquelles il convient d'ajouter l'ensemble des thérapeutiques « libres ») visant à soulager les douleurs et la gêne fonctionnelle. Concernant l'arthrose, tous les auteurs sont aujourd'hui d'accord sur la nécessité d'un dépistage précoce, en raison des espoirs apportés par les nouveaux médicaments « chondroprotecteurs » (40). A ce stade précoce, les cliniciens manquent de critères objectifs fiables et sensibles permettant de quantifier la pathologie au cours de sa progression (41). La méthode de référence actuelle, consistant à mesurer l'espace inter-articulaire par les techniques radiographiques, présente de nombreuses limitations liées à la précision et à la sensibilité de la mesure. Il a même été suggéré récemment, qu'une réduction du volume du cartilage de l'ordre de 20% était le seuil minimum de détection par la radiographie X. Les techniques d'IRM (42) et les dosages des marqueurs biochimiques pertinents ont été évalués. Ces différentes méthodes manquent de spécificité et/ou sensibilité et ne permettent pas de traduire les infimes modifications tant anatomiques que biochimiques qui surviennent dans l'arthrose (43). Un constat similaire peut être établi pour l'imagerie scintigraphique (44) (45) (46) (47). En effet, les radiopharmaceutiques actuellement disponibles n'explorent que le métabolisme ostéoblastique osseux (e.g.  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP) ou l'inflammation (e.g.  $^{18}\text{F}$ FDG). Qu'il s'agisse de scintigraphie conventionnelle, de Tomographie d'Emission MonoPhotonique (TEMP) ou de Tomographie à Emission de Positons (TEP) couplée ou non à un scanner X (TEMP-TDM ou TEP-TDM), ces méthodes ne fournissent que des informations sur les conséquences de la dégradation du cartilage, à savoir l'inflammation et l'altération de l'os sous-chondral au stade tardif de la pathologie (48).

Au vu de ces données, une méthode non invasive évaluant l'intégrité et la fonctionnalité du cartilage et permettant le diagnostic précoce, le suivi longitudinal et l'évaluation de la réponse à la thérapie pour les pathologies arthrosiques serait d'un grand intérêt.

## **C. Arthrite**

### **1. Description**

L'arthrite désigne l'ensemble des phénomènes inflammatoires qui affectent l'articulation, généralement accompagnés de douleurs plus ou moins sévères, d'enflures et de raideurs (49). Les pathologies aiguës ou chroniques (évolutives) liées à l'arthrite concernent en premier lieu la population adulte à partir de 40 ans, sachant que certaines formes peuvent aussi affecter l'enfant et le jeune adolescent. C'est une maladie généralement bénigne mais qui peut être très invalidante et qui touche près de 1% de la population mondiale (49), et plus fréquemment les femmes que les hommes (50). En 2011, l'arthrite représentait près de 1 milliard des dépenses de l'assurance maladie en France (51).

L'arthrite peut avoir deux origines : auto-immune ou infectieuse. Plusieurs articulations peuvent être atteintes, le terme polyarthritique est alors utilisé.

L'arthrite est une affection inflammatoire chronique caractérisée par une hyperplasie du tissu synovial. Cette prolifération synoviale trouve son origine dans un déséquilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose dans la couche interne de la membrane synoviale articulaire (52) (53), déséquilibre provoqué par le stress oxydant généré par l'inflammation (54). Le cartilage articulaire est alors affecté, résultant en une diminution de son volume et en sa destruction.

Le plus souvent l'arthrite est une inflammation liée à une maladie auto-immune et à des facteurs génétiques ou héréditaires conduisant à une arthrite rhumatoïde. La forme la plus connue de cette pathologie est la polyarthrite rhumatoïde.

### **2. Diagnostic**

Il n'existe aucun test spécifique de l'arthrite, ainsi le diagnostic se base sur un interrogatoire et un examen clinique permettant d'inspecter les articulations et vérifier

l'amplitude des mouvements. Des examens peuvent être prescrits, tels que l'échographie et l'IRM (55) afin de visualiser et évaluer le degré des atteintes articulaires par la recherche de calcifications, qui sont les marqueurs des réponses inflammatoires systémiques aiguës (56), ainsi que le degré d'érosion osseuse et les œdèmes articulaires.

La scintigraphie peut également être utilisée pour imager les inflammations et les dommages infligés aux articulations par l'arthrite (57), ces derniers étant révélés avec l'utilisation du [<sup>18</sup>F]FDG en TEP. Une récente étude réalisée en collaboration avec notre unité a en effet confirmée la capacité de ce radiotracer lors de l'imagerie d'articulations arthritiques (58). D'autres marqueurs de l'inflammation sont également étudiés, tels que des nanoparticules, des anticorps... (59) (60)

Cependant une étude a révélé que les informations obtenues lors d'un examen TEP au [<sup>18</sup>F]FDG étaient équivalentes à celles obtenues par IRM, conduisant à l'utilisation préférentielle de l'IRM, une technique plus usuelle et moins onéreuse pour la pose du diagnostic (61).

### **3. Traitement**

Les traitements actuels consistent à atténuer les symptômes comme la douleur et l'inflammation principalement par des prescriptions médicamenteuses, mais également à l'aide de programmes de physiothérapie ou d'exercices visant à améliorer le tonus musculaire (62).

### **4. Conclusion**

Un radiotracer spécifique aux particularités de l'arthrite autre que l'inflammation serait donc du plus grand intérêt. Un des symptômes de cette pathologie est la dégradation chimique du cartilage résultant en une réduction du volume du cartilage articulaire, par conséquent la mise au point d'un radiotracer spécifique des PGs de ce type de cartilage permettrait d'identifier la pathologie à un stade primitif, permettant une prise en charge rapide ainsi qu'un suivi thérapeutique adapté.

## **D. Chondrosarcome**

### **1. Description**

Le chondrosarcome est la tumeur osseuse primitive la plus rencontrée après l'ostéosarcome (63). Elle est caractérisée par la formation d'une matrice cartilagineuse par des cellules cancéreuses et identifiée comme un groupe hétérogène de lésions avec diverses caractéristiques morphologiques et comportements cliniques (64). Il peut être soit primitif (survenant sur un os sain), soit secondaire (évolution d'une tumeur bénigne préexistante), et représente environ 25% des tumeurs maligne osseuse (65) avec une prévalence estimée à 120 nouveaux cas par an en France. Les sites les plus fréquemment concernés correspondent aux os les plus longs, à savoir le bassin, le fémur, le rachis et le genou (66).

Basé sur les caractéristiques cytologiques des lésions (prenant notamment en compte la densité cellulaire, la taille des noyaux et le degré d'hyper-chromatisme nucléaire), les chondrosarcomes peuvent être classés en trois grades de malignité croissante (65) (67), déterminé selon la classification de Evans et la nature de la MEC. Les grades les plus élevés présentent de fort taux de métastases à distance réduisant considérablement la survie du patient (66) (68).

### **2. Diagnostic**

Le diagnostic se base principalement sur deux types d'imagerie pour diagnostiquer le chondrosarcome, il s'agit de la tomodensitométrie (scanner) et l'IRM. Le premier va permettre de visualiser les zones osseuses détruites, les légères calcifications de la tumeur et la mesure des zones intra et extra-osseuse. Quant à l'IRM, elle apporte des informations quant à la taille, la localisation et la dissémination des tumeurs (69). Cependant les signes radiologiques dépendent de l'âge et de la topographie de la tumeur sur l'os (centrale ou périphérique) et du degré de malignité. De plus, ces examens vont révéler la présence d'une masse sans identifier sa nature, à savoir un chondrosarcome ou un ostéosarcome (70) (71). Or, ces deux tumeurs ne sont pas traitées de la même façon. Par conséquent, une biopsie est nécessaire pour permettre l'identification et orienter le traitement.



L'imagerie scintigraphique est également importante. L'imagerie TEP utilise le radiotracer  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ , l'imagerie TEMP des traceurs osseux marqués au technétium-99m. Cependant, le stade précoce du chondrosarcome combine deux particularités, à savoir la faible vascularisation tumorale ainsi que la formation de la MEC chondrogénique, freinant l'acheminement de ces radiopharmaceutiques jusqu'aux cellules tumorales. Par conséquent, ces radiotraceurs ne sont malheureusement pertinents qu'au plus haut grade de la pathologie (72) (73) (74).

### **3. Traitement**

Le chondrosarcome possède une faible vascularisation et une pression interstitielle accrue. Ajoutée au fait qu'il se définit par la formation d'une MEC chondrogénique dense, ces caractéristiques lui confèrent la particularité de limiter fortement la délivrance d'un médicament. La chimiothérapie et la radiothérapie peuvent donc être affectées (75). Le traitement est principalement chirurgical pour tous les types de chondrosarcomes et consiste en une exérèse complète de la tumeur (69), en incluant une marge de résection aussi large que raisonnable mais également une marge de tissu sain afin de limiter les récurrences locales, associées à des métastases et la mort du patient (76). Cette opération présente des taux de survie à 10 ans allant de 30% à 80% selon le grade de la tumeur (77). Dans le cas de tumeur à un stade très avancée, l'amputation est souvent appliquée en cas de récurrence locale, afin de limiter les risques de dissémination.

### **4. Conclusion**

La mise au point d'un radiotracer permettant la détection précoce et spécifique du chondrosarcome permettrait de traiter les patients à un stade où le taux de réponse reste élevé. Cette approche a été exploitée par le laboratoire avec la validation d'un traceur marqué au technétium-99m ciblant les PGs. Sa spécificité pour les agrécans du cartilage articulaire a été démontrée dans de nombreux travaux (78) (79) (80). Ce radiotracer sera détaillé dans la suite de la thèse.

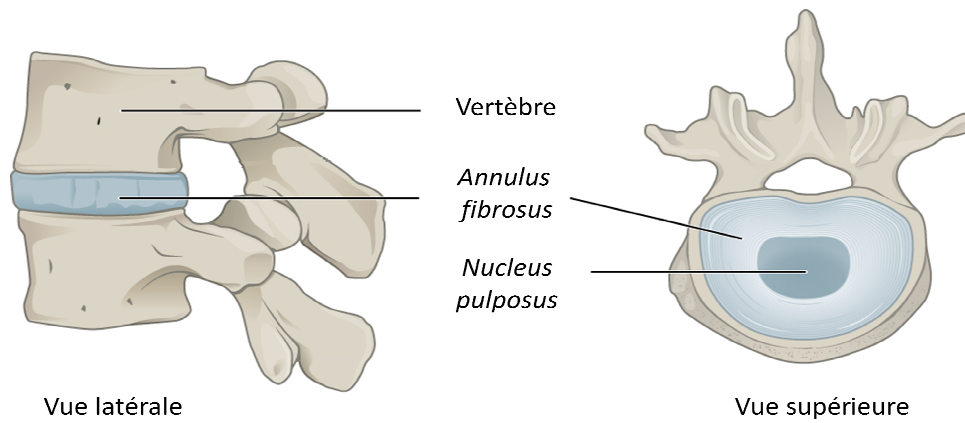
## E. Les disques intervertébraux

La lombalgie associée aux pathologies des disques intervertébraux est un problème de santé public majeur dans la société actuelle (81), avec des implications économiques et sociales conséquentes. En effet, une étude réalisée en 2007 relate que plus de la moitié de la population française âgée de 30 à 64 ans a souffert au moins un jour de douleurs lombaires (82). Cette pathologie est directement imputable à la dégénérescence des disques intervertébraux (DIVx), résultant de la vieillesse ou de facteurs de risques dont certains sont identifiés. Ces DIVx vont être décrits ci-dessous afin de démontrer leur dépendance vis-à-vis de l'intégrité des PGs les constituant dans le but de corréler l'intérêt d'une méthode d'imagerie moléculaire fonctionnelle pour le diagnostic précoce et le suivi thérapeutique des pathologies résultant d'une atteinte des PGs.

### 1. Structure et anatomie

Les disques intervertébraux (DIV), au nombre de 23 dans le corps humain, se situent entre deux vertèbres consécutives au sein de la colonne vertébrale. Le DIV a principalement une fonction mécanique d'amortissement et de transmission des mouvements.

Le DIV sain est constitué de trois régions distinctes : l'*Annulus Fibrosus* (AF) qui entoure le *Nucleus Pulposus* (NP), et les plateaux vertébraux sur lesquels sont enchâssés le NP et l'AF (83) (Figure 5). Si le DIV contient peu de cellules, (dont la structure semble néanmoins comparable à celle des chondrocytes articulaires), sa matrice extracellulaire est très proche de celle du cartilage hyalin avec ses deux constituants principaux : les collagènes et les PGs. Tout comme pour le cartilage articulaire, la majorité des PGs du DIV sont des agrécanes. Sur la base d'analyses phénotypiques des cellules du NP et biochimiques de sa MEC, il a été suggéré l'existence d'une forte analogie de phénotype entre les cellules du NP et les chondrocytes articulaires, d'une part, et la structure biologique de leur MEC (84) (85) (86).



**Figure 5 : Vues latérale et supérieure d'un DIV (87)**

Le rôle des cellules et de la MEC du NP dans la physiopathologie de la dégénérescence du DIV est considéré comme majeur. En effet, lors de la dégénérescence du DIV, le NP constitue le premier élément affecté avec (i) une altération et une diminution de la teneur en PG aboutissant à une déshydratation et une désorganisation de la MEC et (ii) une diminution de sa densité cellulaire (84) (88). L'AF qui entoure le NP ne sera touché qu'ultérieurement mais son atteinte signe un processus irréversible.

## 2. Diagnostic et traitement

Les examens d'imagerie, tels qu'ils sont pratiqués en routine clinique pour l'évaluation de cette pathologie, à savoir la radiographie, l'IRM et le scanner, apportent des informations d'ordre anatomiques (pincement de l'espace intersomatique, calcifications, pincement du disque, fissures radiaires...), seulement lorsque la pathologie est déjà bien installée (89) (90) (91).

Il n'existe actuellement aucun traitement à la dégénérescence des DIVx et seule la chirurgie est efficace (92). Cependant des avancées ont été réalisées pour alléger ou retarder les symptômes. En effet plusieurs thérapies ont vu le jour, basée sur l'implantation de cellules souches (réparation de la MEC ou retard dans la dégénération) ou de protéines (stimulation de la synthèse des PGs) (93).

Une imagerie fonctionnelle du cartilage des DIVx pourrait permettre de visualiser correctement ses modifications et atteintes au cours du temps et ainsi donner des indications précieuses sur la progression de la dégénérescence ou l'efficacité d'un traitement.

## **Conclusion**

**L'expression des PGs de la MEC est révélatrice de la fonctionnalité du cartilage. Leur forte densité négative en fait une cible de choix pour la mise au point d'un radiotraceur ciblant ces PGs afin d'évaluer *in vivo* par imagerie leur intégrité et leur fonctionnalité. Des radiopharmaceutiques et agents de contraste ont déjà exploité cette particularité, mais leur manque de spécificité et/ou de sensibilité de la technique d'imagerie qui les exploitait n'a pas permis de répondre aux attentes initiales. Ainsi, un radiotraceur ciblant spécifiquement les PGs et utilisant une technique d'imagerie fonctionnelle quantitative appropriée pourrait permettre le diagnostic précoce des pathologies se caractérisant par une atteinte des PGs telles que les maladies dégénératives et tumorales, mais également le suivi médical pour évaluer leur réponse face aux traitements. De plus, leur localisation pourrait permettre de distinguer les zones d'accumulation des PGs, présentes dans le cas d'un chondrosarcome. Un tel radiotraceur a été mis au point dans l'unité, et une évolution de celui-ci pour améliorer la sensibilité des images scintigraphiques sera expliquée dans cette thèse.**

## II. Techniques d'imagerie médicale

L'imagerie médicale regroupe l'ensemble des techniques utilisées par la médecine pour le diagnostic mais également le traitement et le suivi d'un grand nombre de pathologies. Elle permet l'acquisition et la reconstitution d'images du corps humain à partir de différents phénomènes physiques tels que l'absorption des rayons X, la réflexion d'ondes ultrasons, la résonance magnétique nucléaire ou la radioactivité. Ces examens permettent la visualisation indirecte de l'anatomie (volume, intégrité) et l'analyse du fonctionnement (physiologie, métabolisme) du corps humain (94).

L'arsenal des techniques, souvent complémentaires, autorise une exploration ciblée pour différentes finalités :

- **L'imagerie structurelle** recueille des informations sur la morphologie des organes, tissus ou cellules, comme la taille, le volume, la localisation, ou encore la forme d'une éventuelle lésion...
- **L'imagerie fonctionnelle**, encore appelée imagerie métabolique et moléculaire, vise à étudier le fonctionnement et l'activité physiologique des organes, tissus ou cellules (techniques scintigraphiques notamment),

### A. Radiographie conventionnelle

L'imagerie médicale a commencé en 1895 avec la découverte des rayons X par le physicien allemand Wilhelm Conrad Röntgen, dont l'ensemble des découvertes et travaux fut récompensé par la remise du premier prix Nobel de physique en 1901 (95).

#### 1. La radiographie standard (2D)

Le patient est placé entre une source et un détecteur de rayons X. Les rayons X sont émis pendant environ une demi-seconde, et vont être plus ou moins atténués en traversant le corps du patient (96) selon que la densité des tissus traversés est grande ou faible (97). La radiographie permet ainsi d'imager les structures osseuses. Il est également possible

d'opacifier certaines structures creuses en injectant un produit de contraste opaque aux rayons X. La radiographie est un examen usuel et rapide mais elle reste très irradiante pour le patient du fait de l'exposition aux rayons X.

## 2. La tomodensitométrie (3D)

La tomodensitométrie (TDM), plus communément appelé scanner ou CT-scan (Computed Tomographic Scanner) a été mise au point en 1972 par l'ingénieur britannique Godfrey Hounsfield, prix Nobel de médecine en 1979. Le principe de cette technique repose sur le balayage d'un faisceau de rayons X en rotation autour du corps et l'enregistrement de l'absorption par un détecteur tournant en opposition à la source (Figure 6). Les points ainsi collectés sont synthétisés par un ordinateur qui produit une image tomographique. Cette technique d'imagerie va permettre de mettre en évidence des lésions internes au sein de certains organes, dont la densité permettra de les caractériser et d'en déduire la nature. Elle peut également être pratiquée sur corps entier dans la recherche de métastases pour un bilan d'extension d'un cancer. La tomodensitométrie est un examen rapide mais plus onéreux et irradiant qu'une radiographie standard (96).

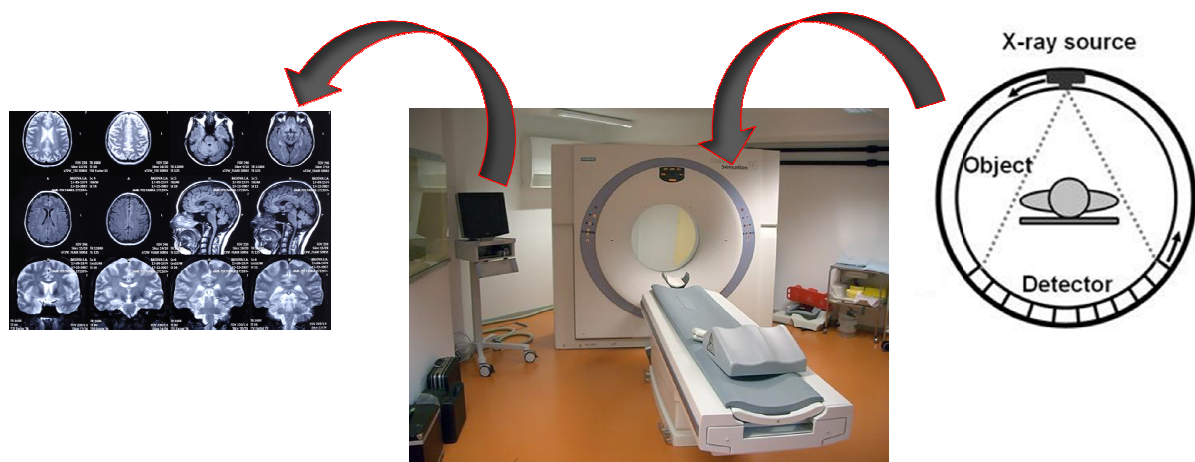


Figure 6 : Appareil de tomodensitométrie

## **B. Imagerie par Résonance Magnétique**

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est l'application à l'imagerie médicale, dans les années 1970, du phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) découvert en 1946 par les physiciens américains Edward Mills Purcell et Felix Bloch (prix Nobel de physique en 1952). Elle permet l'acquisition d'images en coupes, dans tous les plans de l'espace, ainsi que des représentations tridimensionnelles. L'IRM met en jeu les moments magnétiques des noyaux, en particulier celui de l'atome d'hydrogène, constitué par un unique proton. L'hydrogène est quantitativement de loin l'élément le plus important des tissus : l'eau qui constitue pondéralement 70 à 80% du corps humain est formée, en nombre d'atomes, aux 2/3 par de l'hydrogène. D'autres noyaux présents dans le corps humain ont de telles propriétés ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ), mais sont en trop faible proportion et nécessitent une chaîne de radiofréquence adaptée à leurs fréquences de résonance, les cantonnant dans le domaine de la recherche.

L'IRM permet l'étude des tissus mous, tels que les muscles et certaines tumeurs, ce qui en fait un outil de prédilection pour la neurologie. Des produits de contraste (chélates de gadolinium) peuvent être injectés pour améliorer le contraste des vaisseaux et organes. Cette technique d'imagerie présente l'avantage de ne pas être irradiante et invasive, avec une résolution spatiale de l'ordre du millimètre. Cependant, c'est un examen coûteux.

Dans le cas des maladies dégénératives du cartilage, les techniques d'imageries telles que la tomographie ou l'IRM, déterminent la perte de cartilage comme étant la variation de volume ou le changement d'épaisseur moyen de ce tissu. Une approche fonctionnelle est donc nécessaire pour estimer la perte ou l'accroissement anarchique de la MEC et apprécier le suivi longitudinal de la pathologie.

## **C. L'imagerie scintigraphique**

La scintigraphie est une méthode d'imagerie médicale de médecine nucléaire. Celle-ci est issue de la découverte, en 1896, de la radioactivité naturelle par le physicien français

Henri Becquerel, dont les travaux furent repris par les physiciens français Pierre et Marie Curie (tous trois prix Nobel de physique en 1903). Irène et Frédéric Joliot-Curie, en découvrant la radioactivité artificielle, permettront d'envisager la production de radio-isotopes à partir d'éléments du tableau périodique et poseront ainsi les bases de la médecine nucléaire. Leurs travaux furent également couronnés d'un prix Nobel en 1935 (98).

L'administration au patient d'un isotope à vie brève fixé sur une molécule à tropisme connue permet un marquage tissulaire sélectif dans l'organisme et l'obtention d'une cartographie précise de la distribution de celui-ci dans l'organisme, par la détection du signal radioactif à l'aide d'un appareillage spécialisé. La scintigraphie se distingue des autres techniques d'imagerie médicale car c'est une imagerie d'émission, à savoir que le rayonnement vient du patient après injection du radiopharmaceutique, par opposition à l'imagerie de transmission, telles que la radiographie ou l'IRM, dont le faisceau est externe et traverse le patient. L'imagerie scintigraphique permet l'analyse fonctionnelle du corps humain au travers d'images en deux et trois dimensions, autant en diagnostic qu'en suivi thérapeutique. Elle est particulièrement utilisée en cancérologie, cardiologie et neurologie.

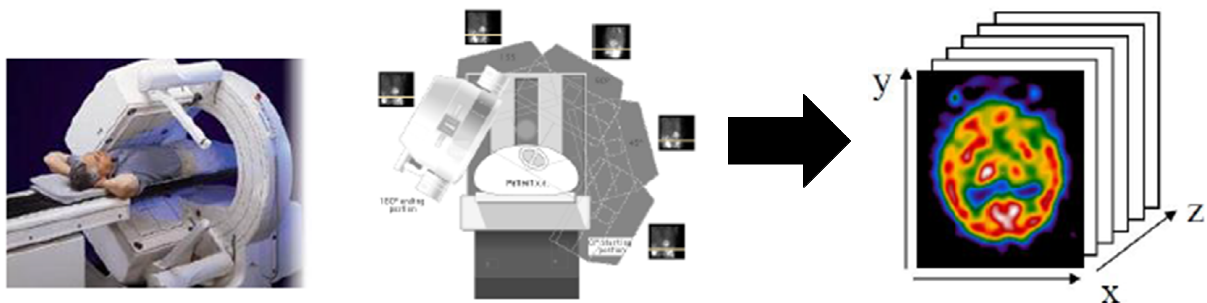
Il existe deux techniques d'imagerie scintigraphique : la tomographie d'émission monophotonique (TEMP) et la tomographie par émission de positons (TEP). Ce sont des examens rapides et non invasifs mais coûteux qui ne sont réalisables que dans de grands centres hospitaliers (99).

### **1. Tomographie par émission monophotonique (TEMP)**

Pour effectuer une TEMP, il est nécessaire d'injecter au patient un radiopharmaceutique émetteur de photon  $\gamma$ . On réalise l'image de la distribution de ce radiopharmaceutique à l'aide d'une  $\gamma$ -caméra tournant autour du patient (Figure 7). Celle-ci est essentiellement constituée d'un collimateur (permettant la sélection angulaire des photons) et de détecteurs de rayons  $\gamma$ . Grâce à un algorithme de reconstruction



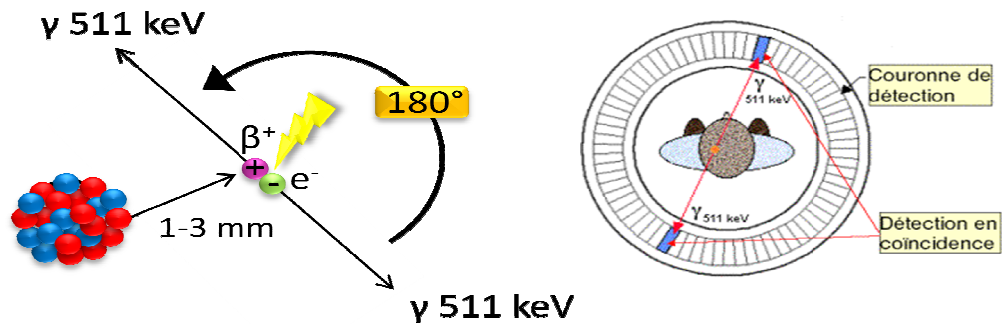
tomographique, la cartographie tridimensionnelle de l'activité radioactive est estimée, permettant d'imager la distribution du radiopharmaceutique dans l'organisme.



**Figure 7 : Principe de la TEMP**

## **2. Tomographie par émission de positons (TEP)**

Pour effectuer une TEP, il est nécessaire d'injecter au patient un radiopharmaceutique émetteur de positons  $\beta^+$  (masse égale à celle d'un électron mais de charge opposée). Une fois émis, le positon parcourt 1 à 3 millimètres dans les tissus avant d'interagir avec un électron du milieu suivant une réaction d'annihilation au cours de laquelle la masse des deux particules se transforme en deux photons  $\gamma$  de 511 keV, émis dans des directions opposées. Le principe de base de la TEP consiste à détecter les deux photons  $\gamma$  de 511 keV émis en coïncidence pour déterminer le lieu précis de la réaction d'annihilation. L'information mesurée correspond au lieu d'annihilation et non à celui de l'émission  $\beta^+$ . La distance entre ces deux lieux est appelée libre parcours moyen du positon, elle est de quelques millimètres et est déterminée par l'énergie d'émission des positons, elle constitue la limite en termes de résolution spatiale (Figure 8).



**Figure 8 : Désintégration du positon, réaction d'annihilation (*gauche*) et détection des photons (*droite*)**

Le principe de détection d'une TEP repose sur le même principe que celle d'une TEMP. Ainsi, la plupart des TEP sont constitués d'une série de couronnes de détecteurs élémentaires répartis en anneau autour du patient qui vont mesurer quasi simultanément deux photons  $\gamma$  de 511 keV. Cette couronne de détecteurs est statique, contrairement à la TEMP où ceux-ci tournent autour du patient, et le circuit électronique mesure les coïncidences vraies qui correspondent à la détection des deux photons  $\gamma$  de 511 keV provenant de la même annihilation.

### 3. Comparaison TEP et TEMP (100) (101) (102) (103)

La nature du rayonnement émis par le radionucléide va conditionner l'utilisation de l'une ou de l'autre des techniques d'imagerie scintigraphique. La sensibilité et la résolution de chaque technique sont résumées dans le tableau 3.

	TEP clinique	TEMP clinique	TEP pré-clinique	TEMP pré-clinique
<b>Sensibilité</b>	1%-3%	0,01%-0,03%	~2%-4%	~0,3%
<b>Résolution</b>	~5 mm	~10 mm	~1,5 mm	~1,2 mm
<b>Champ d'observation</b>	~50 cm	~50 cm	~7 cm	~8 cm

**Tableau 3 : Comparaison entre imageries TEP et TEMP (100)**

La détection par coïncidence de deux photons et leur collimation électronique font de la TEP une méthode plus précise que la TEMP pour la reconstruction tomographique et la localisation anatomique de l'évènement. La TEP est également plus sensible, avec 1 à 3% des rayonnements détectés, soit 100 fois plus que pour la TEMP. Elle permet enfin d'accéder plus aisément à une quantification absolue (sous réserve de corrections d'atténuation, de diffusion, de volume partiel,...).

Actuellement, la TEMP est la technique d'imagerie scintigraphique de référence dans le cadre d'examens de routine en milieu hospitalier. Cependant, au vu des qualités de résolution de la TEP, cet examen est l'objet de nombreux développements et est en passe de constituer la modalité d'imagerie d'avenir. En effet cet examen permet une quantification absolue, à savoir une évaluation de la fixation du radiotraceur par gramme d'organe, ce que ne permet pas la TEMP. L'arrivée de nouveaux radionucléides émetteurs de positons sur le marché permettra de développer une nouvelle gamme de radiopharmaceutiques pour la TEP, confortant son futur statut d'examen primordial en milieu hospitalier.

#### **D. L'imagerie multimodale**

En imagerie scintigraphique, la localisation anatomique précise des zones de captation du radiotraceur est rendue difficile par manque de références morphologiques. Aussi des appareils hybrides combinant une TDM et une TEP (PET scan ou PET-CT) ou une TEMP (SPECT scan ou SPECT-CT) ont vu le jour. Grâce à eux, les acquisitions radiographique et scintigraphique sont réalisées simultanément. La superposition des deux projections 3D obtenues permet alors une excellente localisation anatomique des foyers fixant le radiotraceur.

## Conclusion

Véritable outil d'investigation dans de nombreux secteurs de la santé, allant de la recherche fondamentale à la prise en charge des patients, en passant par le développement de produits, l'imagerie médicale ne cesse d'évoluer. Les améliorations sans cesse apportées permettent d'augmenter la fiabilité des diagnostics et ouvrent la voie à la mise en place de traitements adaptés, voire personnalisés. De plus l'imagerie médicale permet aujourd'hui, au-delà de l'examen clinique, une exploration du vivant et une amélioration des connaissances en biologie moléculaire et cellulaire. Compte tenu de l'accroissement constant du nombre d'êtres humains, associé à une augmentation globale de la longévité et du niveau de vie des populations, les besoins mondiaux en imagerie médicale sont croissants. Ces besoins ciblent une meilleure prévention, un diagnostic de plus en plus précoce et un suivi thérapeutique personnalisé. Le choix de la modalité d'imagerie dépend du problème médical posé, des performances des technologies et de leur disponibilité.

Des avancées majeures ont été réalisées ces 20 dernières années en imagerie scintigraphique, tant d'un point de vue technologique (amélioration des détecteurs, de la reconstruction des images, développement de caméras hybrides), que sur la mise au point de nouveaux radiotraceurs fonctionnels ayant un tropisme avéré pour certains organes ou tissus. L'identification de marqueurs biochimiques associés aux processus physiopathologiques, sert également de base au développement de nouveaux radiopharmaceutiques qui trouvent ou trouveront leur utilité pour le diagnostic précoce, le suivi thérapeutique ou l'évaluation de la progression d'une maladie.

### III. Les explorations par émission en médecine nucléaire, applications aux protéoglycanes

#### A. Les radionucléides en médecine nucléaire

Les radioisotopes utilisés en médecine nucléaire se caractérisent par un temps de demi-vie relativement court pour l'imagerie diagnostique et plus long pour la thérapie. Ceci nécessite donc pour certains la proximité d'un cyclotron pour leurs productions (ex :  $^{18}\text{F}$ ), ou la présence d'un générateur portable afin de s'affranchir du temps de transport (ex :  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ). La présence d'une radiopharmacie au sein de l'édifice médical est également indispensable afin de produire et/ou dispenser le radiopharmaceutique suivant les normes édictées par les agences réglementaires (ANSM, ASN). Les cinétiques de ces synthèses doivent être rapides afin de disposer de suffisamment de temps pour réaliser l'examen. Une fois l'examen effectué, les radionucléides doivent être éliminés le plus rapidement possible de l'organisme du patient par les voies naturelles afin de limiter l'irradiation. Suivant le radionucléide utilisé, les déchets biologiques sont récupérés et traités spécifiquement.

Selon la nature de leur émission, les radioisotopes peuvent trouver deux applications :

- l'imagerie ( $\gamma$  et  $\beta^+$ )
- la thérapie ( $\beta^-$  et  $\alpha$ )

Parmi les nombreux radionucléides utilisés en médecine nucléaire (Tableau 4), les plus utilisés sont l'iode-123 et le technétium-99m pour les émetteurs  $\gamma$ , le fluor-18 comme émetteur  $\beta^+$ , et enfin l'iode-131, le strontium-89, l'yttrium-90 et le samarium-153 comme émetteurs  $\beta^-$ .

Radionucléides	Période radioactive	Types d'émissions et Energies maximales	Applications et Commentaires	Production
<sup>11</sup> C	20,4 min	$\beta^+$ (960 keV, 100%) $\gamma$ (511 keV, 200%)	TEP	cyclotron
<sup>18</sup> F	110 min	$\beta^+$ (634 keV, 97%) $\gamma$ (511 keV, 194%)	TEP	cyclotron
<sup>64</sup> Cu	12,7 h	$\beta^+$ (653 keV, 18%) $\beta^-$ (578 keV, 39%) $\gamma$ (511 keV, 40%)	TEP Radiothérapie	cyclotron
<sup>67</sup> Cu	62 h	$\beta^-$ (141 keV, 100%) $\gamma$ (93 keV, 16%, et 186 keV, 49%)	Radiothérapie	cyclotron
<sup>68</sup> Ga	68 min	$\beta^+$ (1,90 MeV, 88%) $\gamma$ (511 keV, 178%)	TEP	générateur
<sup>82</sup> Rb	75 s	$\beta^+$ (3,35 MeV, 96%) $\gamma$ (511 keV, 192%)	TEP cardiologie	générateur
<sup>89</sup> Sr	50,7 j	$\beta^-$ (1,49 MeV, 100%)	Radiothérapie, oncologie	générateur
<sup>90</sup> Y	2,7 j	$\beta^-$ (2,28 MeV, 100%)	Radiothérapie, oncologie	générateur
<sup>99m</sup> Tc	6 h	$\gamma$ (140 keV, 89%)	TEMP	générateur
<sup>111</sup> In	2,8 j	$\gamma$ (245 keV, 94%) $\gamma$ (171 keV, 90%)	TEMP, radiothérapie	cyclotron
<sup>123</sup> I	13,2 h	$\gamma$ (159 keV, 83%)	TEMP	cyclotron
<sup>131</sup> I	8 j	$\beta^-$ (606 keV, 90%) $\gamma$ (365 keV, 82%, et 637 keV, 7%)	Radiothérapie, oncologie	réacteur nucléaire
<sup>153</sup> Sm	46,3 h	$\beta^-$ (634 keV, 35%, 703 keV, 44%, 807 keV, 21%)	Radiothérapie, oncologie	réacteur nucléaire
<sup>177</sup> Lu	6,7 j	$\beta^-$ (497 keV, 79%) $\gamma$ (208 keV, 11%)	Radiothérapie, oncologie	réacteur nucléaire
<sup>188</sup> Re	17 h	$\beta^-$ (2,12 MeV, 72%) $\gamma$ (155 keV, 15%)	Radiothérapie, oncologie	générateur
<sup>211</sup> At	7,2 h	$\alpha$ (5,98 MeV, 42%)	Radiothérapie	cyclotron

**Tableau 4 : Principaux radionucléides utilisés en médecine nucléaire (104) (105) (106)**

Dans le paragraphe suivant, nous verrons que la nature métallique ou non métallique du radioisotope conditionne en partie le choix de la structure hôte.

## **B. Les médicaments radiopharmaceutiques**

D'après le code de la santé publique (article L5121-1, paragraphe 7), « Un médicament radiopharmaceutique correspond à tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radionucléides, incorporés à des fins médicales ». Les applications médicales sont doubles : diagnostiques et/ou thérapeutiques. Un médicament radiopharmaceutique, est composé d'une entité (molécules, anticorps, hormones, cellules...) biologiquement active, le vecteur, marquée avec un isotope radioactif. La nature de l'entité est choisie dans le but de ne pas altérer le processus physiologique examiné en présentant les mêmes propriétés biologiques et le même métabolisme que le composé non marqué « froid » qu'elle permet d'observer (98). L'isotope radioactif peut cumuler les fonctions de vecteur et d'isotope (ex : cas de l'iode pour la thyroïde). Sa demi-vie doit être adaptée aux délais de concentration spécifique (biolocalisation) et aux propriétés d'élimination du radiopharmaceutique. Elle doit être suffisamment longue pour que le marquage de l'entité puisse être réalisée et qu'il atteigne sa cible, et suffisamment courte pour limiter le temps d'irradiation du patient.

Un radiopharmaceutique doit respecter 3 critères importants :

- une fixation rapide et spécifique à la cible,
- une accumulation faible au niveau des organes non cibles,
- une élimination rapide des organes non cibles.

L'étape de marquage est prépondérante dans la préparation du radiotracer. La méthode doit être simple, une ou deux étapes maximum, et avec un délai de synthèse en rapport avec la période du radionucléide. La pureté radiochimique doit être la plus élevée possible. La méthode de marquage doit préférentiellement ne pas nécessiter de purification afin d'éviter une rupture de la chaîne de stérilité et de diminuer le temps de préparation. Enfin, toutes les préparations doivent pouvoir se diluer dans du sérum physiologique ou une solution tampon susceptible d'être injecté à l'homme.

Selon la nature du radionucléide, il existe deux stratégies de radiomarquage pour obtenir les radiotraceurs : greffage par liaison covalente pour un radionucléide non métallique, ou par complexation pour un radionucléide métallique (107) (108) (109). Dans le premier cas, l'intérêt principal est la faible modification des propriétés chimiques et structurales des molécules radiomarquées (exemple du [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, Figure.9). En fonction de la structure chimique des vecteurs, le marquage peut être isotopique (remplacement d'un élément présent par un isotope radioactif, méthode largement utilisée avec le carbone-11) ou nécessitera la pharmacomodulation de l'entité vectrice. A titre d'exemple, les radiohalogènes peuvent être introduits par substitution nucléophile (e.g. obtention du [ $^{18}\text{F}$ ]FDG via un précurseur triflate) ou électrophile (e.g. marquage directe d'anticorps sur les résidus tyrosines ou radioiododéméallation d'un précurseur après oxydation *in situ* d'un iodure radioactif) (110).



**Figure 9 : Structures chimiques du D-glucose et [ $^{18}\text{F}$ ]FDG**

Pour les radionucléides métalliques il n'est pas possible de réaliser une liaison covalente avec la molécule vectrice, et il est donc nécessaire de concevoir un chélate stable. Ces derniers mettent en jeu des ligands organiques qui peuvent être linéaires, cycliques ou polycycliques ainsi que le radiométal sous forme oxydée simple (par exemple  $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ,  $^{111}\text{In}^{3+}$ ) ou combiné à un hétéroatome (par exemple  $^{99\text{m}}\text{TcO}^{3+}$ ,  $^{99\text{m}}\text{TcN}^{2+}$ ).

La stabilité chimique et les propriétés pharmacocinétiques conditionnent aussi le comportement des radiopharmaceutiques. Ils doivent être stables dans le milieu circulant et la présence du radionucléide ne doit pas perturber les propriétés ciblantes du vecteur. Les contraintes pharmacocinétiques sont les mêmes que pour les médicaments et une excrétion trop rapide ou des interactions non spécifiques sont des obstacles à la biodisponibilité. Le



temps de circulation doit être suffisamment long pour que le produit atteigne sa cible, étape qui doit être la plus courte possible. Le taux de dissociation de la cible doit être faible et l'élimination rénale doit être prépondérante et rapide pour éviter une accumulation de radioactivité dans le système gastro-intestinal (107).

Cette thèse traite des pathologies du cartilage articulaire, dont le dénominateur commun est l'atteinte des PGs. Comme vu dans le premier chapitre de cette partie bibliographique, beaucoup de pathologies sont le résultat de l'atteinte de ces PGs, quand d'autres se caractérisent par une surexpression de ce constituant de la matrice extracellulaire du cartilage.

Depuis plusieurs années, le laboratoire développe un radiotracer marqué au technétium-99m ciblant ces PGs. La prochaine partie de ce chapitre va présenter l'historique, les résultats obtenus et les attentes pour ce radiotracer destiné à l'imagerie TEMP.

### C. Ciblage spécifique des protéoglycanes en TEMP au laboratoire

Le laboratoire utilise depuis plus de dix ans un radiotracer mis au point pour l'imagerie TEMP du cartilage, le  $^{99m}\text{Tc}$ -NTP 15-5 (41) (Figure 10). Testé et validé sur plusieurs modèles expérimentaux (souris, rats, cobayes, lapins), ces travaux ont permis la publication de nombreux articles démontrant son intérêt et son originalité dans le diagnostic des pathologies dégénératives et tumorales du cartilage.

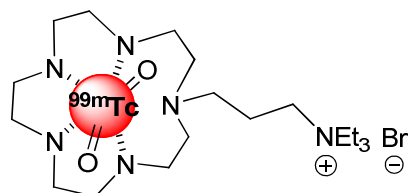


Figure 10 : Le radiotracer  $^{99m}\text{Tc}$ -NTP 15-5

## 1. Choix de la fonction ammonium quaternaire

Dans les années 1990, l'unité a étudié cinq anti-poisons. Ces composés sont des réactivateurs d'acétylcholine estérase empoisonné par les organophosphorés utilisés comme gaz de combat. Ces molécules présentent toutes dans leur structure une ou deux fonctions ammonium quaternaires (AQs) (Figure 11). Une étude pharmacologique chez l'animal a montré une concentration intense de ces molécules dans les tissus cartilagineux. L'affinité de la charge positive des AQs pour les fonctions carboxylates et sulfates des PGs du cartilage est le fruit d'interactions électrostatiques (111) (112) (113) (114). Cette caractéristique a été mise à profit pour le développement de radiotraceurs ciblant le cartilage articulaire en imagerie scintigraphique TEMP (42) (43) (44) (115) (116).

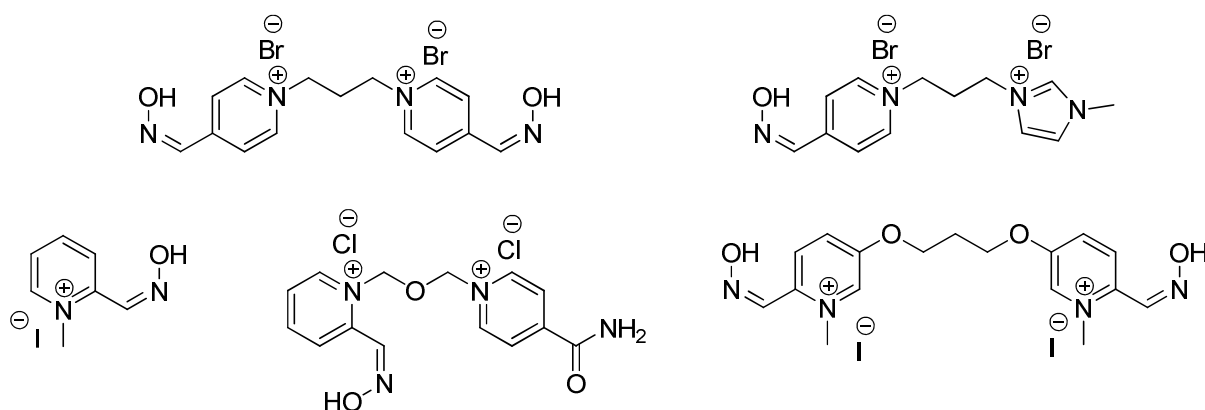


Figure 11 : Structures des cinq anti-poisons

Cette affinité AQs-PGs, illustrée par la présence de cations, principalement des ions sodium, au sein de la cavité synoviale pour contrebalancer les effets des charges négatives des PGs, fut exploitée en recherche médicale par plusieurs autres équipes.

Ainsi, dans les années 70, Shindo *et al.* mirent au point une gamme de radiotraceurs marqués au carbone-14 et porteurs de deux fonctions AQ. Des études de biodistribution de ces composés démontrèrent une accumulation rapide des radiotraceurs au niveau des sites riches en PGs tels que le cartilage (113) (117). Quelques années plus tard, Korn *et al.* développèrent un radiotracer toujours di-AQs mais marqué cette fois à l'iode-125. Après injection sur des rats porteurs de chondrosarcome, ils mirent en évidence une accumulation

du radiotracteur au niveau de la tumeur (118). Dans le même temps, Yu *et al.* proposèrent un radiotracteur di-AQs marqué au sélénium-75 (111) (119). Celui-ci a démontré une bonne accumulation au niveau du cartilage et présentait un intérêt pour le suivi de pathologies évolutives telles que l'arthrose. En 2010, Gibbs-Strauss *et al.* ont étudiés huit fluorophores porteurs de deux ou trois fonctions AQ afin de proposer une visualisation des pathologies liées à l'anneau fibreux des DIVs lors d'interventions chirurgicales. Trois des fluorophores ont démontré une bonne accumulation dans ce tissu (120).

## 2. Choix du radionucléide (107) (121)

Le choix initial du laboratoire s'est porté sur le technétium-99m, radioélément très utilisé pour l'imagerie TEMP depuis les années 80 grâce à sa grande disponibilité par générateurs et son faible coût de production. Cet isotope correspond à un état nucléaire excité métastable du noyau  $^{99}\text{Tc}$ .  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  possède une période de 6 heures pendant laquelle il décroît en émettant des ondes  $\gamma$  de 140 keV. La durée relativement courte de sa période radioactive impose toutefois des contraintes quant à sa chimie (cinétique des synthèses mises en jeux).

Le technétium est un élément de transition, il possède sept électrons sur sa couche de valence (configuration électronique  $[\text{Kr}] 4d^5 5s^2$ ). Comme tous les éléments de transition, sa chimie de radiomarquage est dominée par la formation de complexe métal/ligand. Le technétium existe à différents degrés d'oxydation de (-I) à (+VII), cependant seuls les états (+I), (+III), (+IV) et (+VII) sont stables en présence d'eau. En solution aqueuse, à potentiel élevé et à pH physiologique (pH = 7,4), sa forme stable est l'anion  $\text{TcO}_4^-$  (+VII), forme fournie par le générateur. Cependant, cet état ne permet pas la formation de structures coordonnées suffisamment stables pour être utilisées comme radiopharmaceutique. Les complexes de technétium doivent donc être synthétisés avec des formes réduites du technétium. Cette réduction s'effectue en milieu aqueux en présence de chlorure d'étain II ( $\text{SnCl}_2$ ), qui permet d'éviter la formation de l'espèce réduite insoluble  $\text{TcO}_2$ .

### 3. Choix de la partie chélatante (46)

Le technétium étant un métal, il ne peut être introduit dans un radiotracteur que *via* une complexation par un ou plusieurs ligands.

La force des interactions métal-ligand peuvent être évaluée selon le concept HSAB (Hard and Soft Acids Bases), permettant d'expliquer la stabilité d'un complexe et ses mécanismes de réactions. Les acides et bases gardent la même définition que pour la théorie de Lewis, à savoir que les acides sont des accepteurs (présence de lacune électronique) et les bases des donneurs (présence de doublet non liants), et les qualificatifs durs et mous font intervenir des propriétés physiques. Ainsi, un acide dur possède une forte charge positive et un faible rayon ionique, les bases dures sont quant à elles très électronégatives et faiblement polarisées. Les acides mous sont alors volumineux et possède une faible charge positive, et les bases molles sont fortement polarisables et faiblement électronégatives. Les complexes les plus stables sont ceux qui contiennent des acides durs liés avec des bases dures, ou des acides mous avec des bases molles.

Les ligands acycliques sont largement utilisés pour la complexation du technétium-99m. Par exemple, le ligand monodentate méthoxyisobutyle isocyanide (MIBI) s'organise dans une configuration octaédrique pour complexer le radionucléide et trouve son application en scintigraphie cardiaque. Le ligand bidentate méthyldiphosphonate (MDP) est doublement présent autour du radionucléide, le complexe est utilisé en scintigraphie osseuse, enfin le ligand tétradentate hexaméthylpropylèneamine oxime (HMPAO) stabilise un technétium-99m pour la scintigraphie cérébrale (Figure 12).

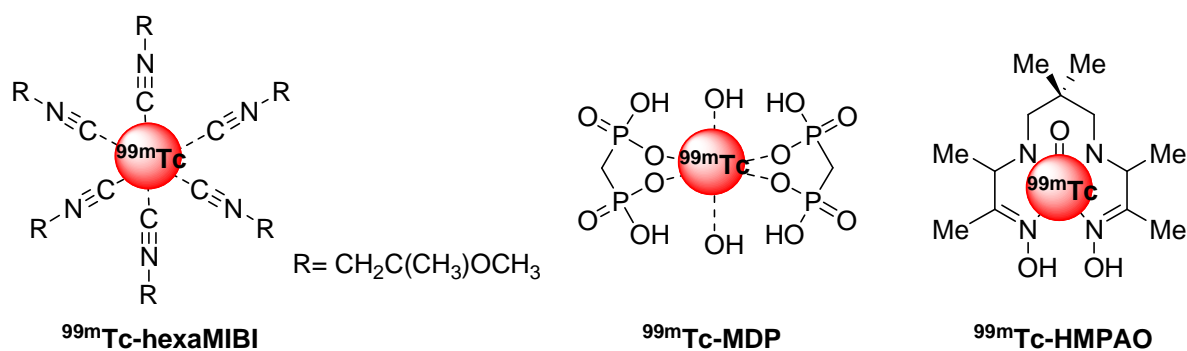


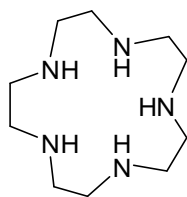
Figure 12 : Structures de trois radiopharmaceutiques au  $^{99m}\text{Tc}$

Les ligands monodentates et polydentates se différencient par la stabilité des complexes qu'ils engendrent. Cet effet stabilisateur est essentiellement dû à un effet entropique. Ainsi, les complexes formés à partir de ligands polydentates seront plus stables et moins propices à la dissociation que ceux avec des ligands monodentates de force semblables (ou d'atomes donneurs semblables), car ils favorisent l'encapsulation de l'atome métallique.

Face aux propriétés des ligands polydentates, la recherche d'une stabilité plus importante a permis le développement de ligands cycliques. Ceux-ci sont intéressants de part leur pré-organisation moléculaire, permettant d'améliorer la stabilité du complexe. C'est l'effet macrocyclique. L'atome métallique, piégé au cœur de la couronne, aura besoin de plus d'énergie pour se dissocier. L'utilisation de ligands macrocycliques impose *de facto* une contrainte sur les dimensions des espèces métalliques pouvant être complexées. Parmi ces macrocycles, on retrouve les polyazamacrocycles saturés qui font l'objet de nombreuses études depuis plusieurs années.

L'intérêt porté aux polyazamacrocycles saturés a pour origine principalement leur grande affinité vis-à-vis des cations métalliques qui se manifeste par une stabilité thermodynamique et cinétique remarquable de leurs complexes. Les polyazamacrocycles peuvent complexer les atomes métalliques en milieu aqueux et être utilisés *in vivo*. De plus, la fonctionnalisation du macrocycle par des groupes coordinants disposés à la périphérie du cycle conduit à des récepteurs plus sophistiqués. Il en découle que les polyazamacrocycles peuvent être adaptés aux métaux ayant un nombre de coordination élevé sans perdre l'avantage de la pré-organisation du ligand. Ainsi, l'affinité du ligand vis-à-vis d'un ion métallique peut être contrôlée en faisant varier le nombre et la nature des bras fonctionnels liés au macrocycle.

Au vu des propriétés des macrocycles, le laboratoire a choisi de travailler sur un macrocycle polyazoté, composé de 5 atomes d'azotes reliés par des chaînes éthyle (15ane-N5, abrégé 15-5) (Figure 13).

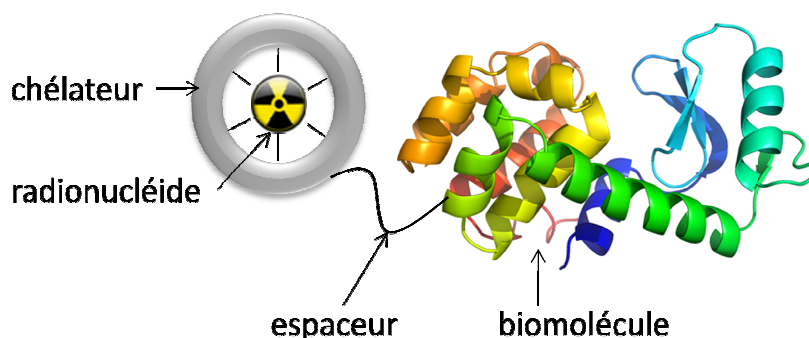


**Figure 13 : Structure de la molécule 15-5**

#### **4. Conception et imagerie TEMP du radiotracteur (42) (43) (47) (121) (122) (80) (123) (124)**

Notre structure hôte susceptible d'accueillir le radionucléide doit également présenter un tropisme élevé pour les protéoglycanes du cartilage. La NTP 15-5 remplit ces deux pré-requis, elle fait partie de la famille des chélatants bifonctionnels (CBFs) qui sont particulièrement utilisés en recherche médicale.

Le rôle du CBF est de fixer l'élément radioactif afin de former un complexe stable et inerte dans les conditions biologiques (e.g. inertie aux phénomènes de transmétallation et de transchélation). Il doit également posséder une fonction vectrice introduite soit directement sous la forme d'une fonction chimique, soit *via* la présence d'un site d'ancrage assurant le couplage avec une biomolécule vectrice (protéine, peptide ou toute autre entité d'intérêt biologique). Le complexe et le vecteur peuvent être liés de manière covalente par l'intermédiaire d'un espaceur (Figure 14). Celui-ci a pour rôle de modifier, si nécessaire, les propriétés pharmacocinétiques du radiotracteur. Cette approche présente l'avantage de préserver l'affinité de la molécule ciblante pour son récepteur en éloignant le motif chélatant.

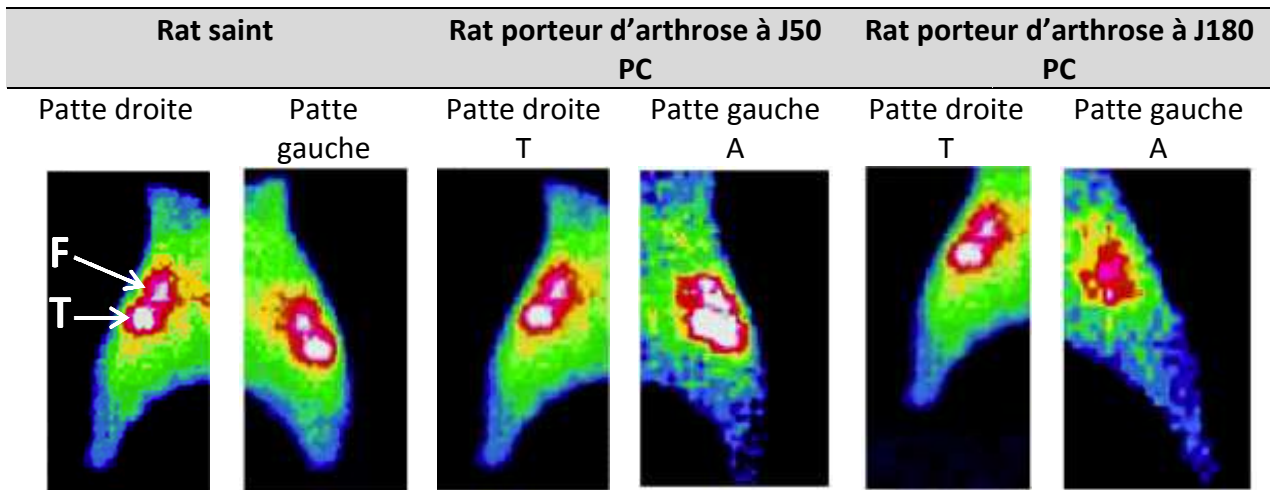


**Figure 14 : Structure schématique d'un chélatant bifonctionnel**

La fonction vectrice (ammonium quaternaire) est introduite sur la structure 15-5 par l'intermédiaire d'une chaîne propyle jouant le rôle d'espaceur. Ce ligand est appelé NTP 15-5, dénomination simplifiée de sa nomenclature IUPAC *N*-[(3-triéthylammonio)propyl]-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane.

L'optimisation du marquage de ce ligand par le radionucléide  $^{99m}\text{Tc}$  permet aujourd'hui de préparer ce complexe technétié prêt à injecter en 30 minutes avec une pureté radiochimique de l'ordre de 93%.

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* de la  $^{99m}\text{Tc}$ -NTP 15-5 ont été faites au laboratoire afin de valider la fixation de ce radiotracer sur les PGs du cartilage articulaire (122). En particulier, un suivi longitudinal de rats porteurs d'arthrose, a permis d'évaluer la capacité du radiotracer à visualiser le cartilage articulaire du genou. Des scintigraphies ont été effectuées à 50 et 180 jours après la méniscectomie (post chirurgie = PC), sur la patte gauche arthrosique (A) et la patte droite témoin (T) (Figure 15). Nous observons ainsi une différence de fixation du radiotracer entre le stade précoce et tardif de la maladie. En effet, à J50 PC, une forte accumulation de la  $^{99m}\text{Tc}$ -NTP 15-5 sur l'articulation fémoro-tibiale nous dévoile la tentative de réparation de la MEC pour palier à la dégradation du cartilage. La prolifération des chondrocytes engendre une surproduction de PGs pour tenter de régénérer le cartilage articulaire atteint. Cependant, cette réparation s'avère rapidement insuffisante et les PGs disparaissent progressivement. Cet état est ainsi visible à J180 PC, où la radioactivité est moins importante par rapport à la patte droite témoin.



**Figure 15 : Imagerie TEMP de la  $^{99m}\text{Tc}$ -NTP 15-5 sur l'articulation fémoro-tibiale droite et gauche de rat sain et porteur d'arthrose à un stade précoce (jour 50) et tardif (jour 180) après la ménisectomie (F = fémur, T = tibia) (124)**

De ces travaux ressort la conclusion que le radiotracer  $^{99m}\text{Tc}$ -NTP 15-5 est un excellent marqueur de l'intégrité du cartilage, et peut être facilement applicable pour un usage routinier en imagerie TEMP. Dans le cas de maladies articulaires dégénératives, la  $^{99m}\text{Tc}$ -NTP 15-5 pourra permettre une détection précoce des altérations et un suivi longitudinal de la maladie. Dans celui de pathologies caractérisées par une surexpression de la MEC, ce radiotracer permettra d'une part de visualiser la zone affectée et la pose d'un diagnostic, d'autre part de proposer un traitement.

## 5. Conception de nouveaux radiotraceurs

La  $^{99m}\text{Tc}$ -NTP 15-5 a prouvé son originalité et son efficacité en imagerie TEMP par de nombreuses études pré-cliniques réalisées au sein du laboratoire. Or, comme vu précédemment la TEP surpasse la TEMP en termes de résolution et de quantification absolue dans le cadre d'un examen clinique. Par conséquent, un radiotracer spécifique des PGs utilisable en TEP permettrait d'améliorer la précision quant à la localisation exacte de l'hyperfixation de la radioactivité chez le patient, autant crucial pour le diagnostic que pour le suivi thérapeutique. Cependant, pour changer de technique d'imagerie, il est nécessaire de changer la nature du radionucléide, mais également de déterminer un nouveau ligand pour le fixer.

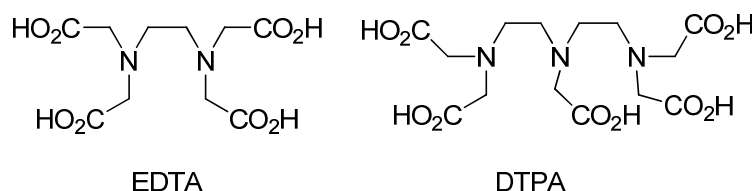


Le choix du radionucléide s'est porté sur le cuivre. En effet, parmi ses nombreux isotopes, un est particulièrement prometteur pour des usages médicaux : le cuivre-64. Ses désintégrations caractéristiques ( $\beta^+$ , 18% ;  $\beta^-$ , 39% ; CE, 43%) en font un radionucléide intéressant pour l'imagerie TEP et pour la radiothérapie ciblée du cancer. De plus, son temps de demi-vie ( $T_{1/2} = 12,7$  heures) suffisamment long est compatible avec l'échelle de temps requise pour le radiomarquage (125).

Le cuivre est également un métal largement disponible et accessible économiquement pour permettre des études avec cet élément à froid. En milieu aqueux, la chimie de coordination du cuivre est surtout limitée à trois états d'oxydation : Cu(I), Cu(II) et Cu(III) (126). L'état d'oxydation le plus faible, Cu(I), a une configuration  $3d^{10}$ . Due à la labilité de la plupart des complexes avec Cu(I), ceux-ci n'ont pas une stabilité cinétique suffisante pour des applications pharmaceutiques. Le Cu(III) a une configuration  $3d^8$  et est relativement rare et difficile à obtenir sans l'utilisation de forts ligands donneurs de liaisons  $\pi$ . L'état d'oxydation dominant est le Cu(II) avec une configuration en  $3d^9$ . Dépendamment de la structure du chélateur et des atomes donneurs, le nombre de coordination du Cu(II) peut aller de 4 à 6 (127). Le Cu(II) qui est moins labile par rapport aux échanges de ligands, donc plus inerte vis-à-vis de la décomplexation, est le meilleur candidat pour la préparation de radiopharmaceutiques. De plus, cet état d'oxydation est directement disponible en sortie d'un cyclotron lors de la formation du cuivre-64, permettant une méthode de radiomarquage directe, au contraire du radionucléide  $^{99m}\text{Tc}$  pour lequel une étape de réduction est nécessaire avant sa complexation.

Les ligands qui peuvent former des complexes de  $^{64}\text{Cu(II)}$  stables et hautement inertes vis-à-vis de la décomplexation (transchélation ou transmétallation) sont idéaux. Il est important que la formation du complexe entre le chélateur et le Cu(II) ait une cinétique rapide. L'utilisation du  $^{64}\text{Cu(II)}$  nécessite qu'il soit incorporé dans un chélateur bi-fonctionnel (CBF). Les CBFs utilisés à des fins radiopharmaceutiques sont dominés par des chélateurs de type macrocycle et cage. Initialement, des chaînes acycliques polyaminocarboxylate telles que l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) et le DTPA (acide diéthylène triamine penta-acétique) ont été développées pour la complexation de nombreux cations métalliques (Figure 16) (128). Cependant, la faible stabilité des complexes correspondants à faibles pH

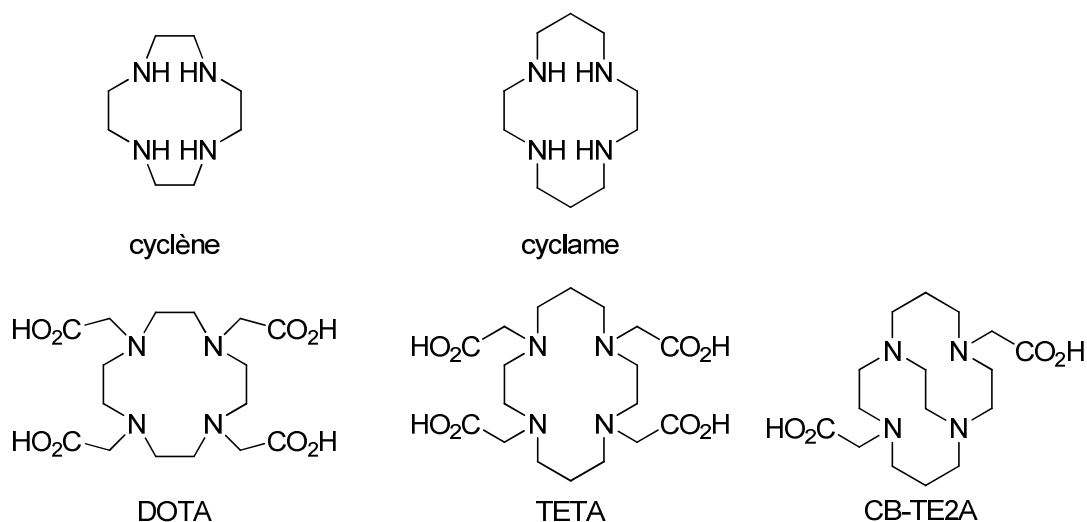
ou en présence d'autres cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) a freiné leur utilisation *in vivo*. Moi *et al.* ont mis en évidence que ces deux CBFs, une fois complexés avec le Cu(II), ne sont pas stables dans du sérum humain, se traduisant par la démétallation du Cu(II) des CBFs et sa complexation avec l'albumine, alors que ces chélateurs avaient une constante de stabilité très haute avec le cuivre *in vitro* (129).



**Figure 16 : Structures des polyamines acycliques EDTA et DTPA**

Les chélateurs de  $^{64}\text{Cu}$  les plus développés sont des ligands de type polyamines cycliques, à l'image des tétraazamacrocycles cyclène (1,4,7,10-tétraazacyclododécane) et cyclame (1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane) (Figure 19). Ces couronnes ont l'avantage d'être disponible facilement dans le commerce à un coût abordable. Comme vu précédemment, ceux-ci combinent l'effet chélate et l'effet macrocycle qui augmentent la stabilité du complexe formé. Les chélateurs les plus utilisés de cette classe sont les macrocycles polyaminocarboxylates (125) (130) (131) (132). Ceux-ci ont été très étudiés et les résultats ont démontrés une stabilité *in vitro* et *in vivo* supérieure aux chélateurs acycliques (128) (131) (132) (133). Cette stabilité est en grande partie due à la contrainte de géométrie du macrocycle. Parmi les macrocycles les plus étudiés on retrouve le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane tétraacétique) et le TETA (acide 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane tétraacétique) (figure 17). Le DOTA est le CBF le plus utilisé pour le marquage avec des radionucléides métalliques.

De plus, une nouvelle classe de tétraazamacrocycles a vu le jour depuis plusieurs années, celle des cages renforcées. Celles-ci possèdent en effet un pont éthylénique entre deux atomes d'azotes de la cage, formant deux cycles adjacents, et ont démontrées des capacités d'accroissement de l'inertie cinétique vis-à-vis du métal complexé. Parmi ceux-ci, CB-TE2A (1,8-*N,N'*-bis-(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane) (Figure 17), qui possède deux ligands carboxyméthyles, forme un complexe très stable avec le Cu(II) doublé d'un profil pharmacocinétique favorable (134).



**Figure 17 : Structures des polyamines cycliques cyclène, cyclame, DOTA, TETA et CB-TE2A**

Cette thèse consiste en la mise au point d'une nouvelle gamme de CBFs innovants pour le diagnostic précoce des pathologies dégénératives et tumorales du cartilage articulaire en imagerie TEP. A l'image de ces chélateurs du  $^{64}\text{Cu}$ , les CBFs que nous avons développés sont à base macrocyclique (15-5, cyclène et cyclame) et porteurs de la fonction vectrice des PGs du cartilage, à savoir une fonction de type ammonium quaternaire telle que celle introduite sur le radiotracteur  $^{99\text{m}}\text{Tc-NTP 15-5}$ . Dans le but de compléter la sphère de coordination des cages pour le radionucléide cuivre-64, nous avons introduits des bras complexant de différentes natures par fonctionnalisation au niveau des atomes d'azote (N-fonctionnalisation), mais également un renforcement de type pont éthylénique au sein de la cage.

**Les objectifs de ce travail de thèse ont été :**

- la synthèse de chélatants bi-fonctionnels (CBFs) ;
- la mise au point d'une méthode de marquage au Cuivre-64 ;
- l'étude des profils pharmacocinétiques des différents radiotraceurs *in vivo* sur des rats sains ou porteurs de chondrosarcome en collaboration avec les biologistes de notre unité.

Une fois ces objectifs atteints, les CBFs pertinents seront ceux pour lesquels les conditions suivantes seront remplies :

- hyperfixation du radiotraceur sur le cartilage articulaire et/ou les lésions cancéreuses,
- stabilité accrue *in vivo* du complexe cuivrique,
- innocuité du radiotraceur *in vivo*.

Le cuivre présente plusieurs isotopes potentiellement exploitables en médecine nucléaire. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer le cuivre-67, émetteurs  $\beta^-$ , qui est particulièrement indiqué pour la radiothérapie. Ainsi, selon la nature de l'isotope de cuivre utilisé, les CBFs sélectionnés pourront permettre l'imagerie TEP de l'intégrité du cartilage articulaire et/ou la détection d'une formation cancéreuse, et dans ce dernier cas proposer une thérapie adaptée. La structure du CBF n'étant pas modifiée, seule la nature de l'isotope du cuivre va définir la finalité du radiotraceur.



1. **Roughley, P. J.** The structure and function of cartilage and proteoglycans. *European Cells and Materials*. 2006, Vol. 12, pp. 92-101.
2. **Couchman, J. R, Pataki, C. A.** An introduction to proteoglycans and their localization. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2012, Vol. 60, 12, pp. 885-97.
3. **Praillet, C., Lortat-Jacob, H, Grimaud, J.-A.** Les protéoglycanes, molécules aux multiples fonctions. *Médecine/Sciences*. 1998, Vol. 14, pp. 412-420.
4. <http://galleryhip.com/hyaluronic-acid-proteoglycan.html>. [En ligne] Lippincott, Williams & Wilkins ; Wolters Kluwer Health, 2011.
5. **Praillet, C., Lortat-Jacob, H, Grimaud, J.-A.** Les protéoglycanes, rôle en pathologie. *Médecine/Sciences*. 1998, Vol. 14, pp. 421-428.
6. **Carney, S. L, Muir, H.** The structure and function of cartilage proteoglycans. *Physiological Review*. 1998, Vol. 68, pp. 858-910.
7. **Martel-Pelletier, J. et al.** Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*. 2008, Vol. 22, 2, pp. 351-384.
8. **Hauselmann, H. J. et al.** Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix*. 1992, Vol. 12, pp. 116-129.
9. **Aigner, T, Stöve, J.** Collagens major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advance Drug Delivery Review*. 2003, Vol. 55, pp. 1569-1593.
10. **Buckwalter, J. A, Mankin, H. J.** Articular cartilage repair and transplation. *Arthritis and Rheumatism*. 1998, Vol. 41, 8, pp. 1331-1342.
11. **Henrotin, Y. E., Bruckner, P, Pujol, J.-P. L.** The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2003, Vol. 11, pp. 747-755.
12. **Henrotin, Y., Kurz, B, Aigner, T.** Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation friends or foes. *Osteoarthritis and Cartilage*. Review article, 2005, Vol. 13, pp. 643-654.
13. **Bijlsma, J. W. J., Berenbaum, F, Lafeber, F. P. J. G.** Osteoarthritis an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 2011, Vol. 377, pp. 2115-2126.
14. **Le Pen, C., Reygobellet, C, Gérentes, I.** Financial cost of osteoarthritis in France, the COART France study. *Joint Bone Spine*. 2005, Vol. 72, 12, pp. 567-570.
15. **Prado Simao, A. et al.** Involment of BDNF in knee osteoarthritis : The relationship with inflammation and clinical parameters. *Rheumatology International*. 2014.

16. obnet.chez-alice.fr. *ObNet*. [En ligne]
17. **Mobasheri, A. et al.** Glucose transport and metabolism in chondrocytes : a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histology and Histopathology*. Review article, 2002, pp. 1239-1267.
18. **Mobasheri, A.** Role of chondrocyte death and hypocellularity in ageing human articular cartilage and the pathogenesis of osteoarthritis. *Medical Hypotheses*. 2002, Vol. 58, 3, pp. 193-197.
19. **Aigner, T. et al.** Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritic human articular knee cartilage. *Arthritis & Rheumatism*. 2001, Vol. 44, 6, pp. 1304-1312.
20. **Roach, H. I., Aigner, T, Kouri, J. B.** Chondroptosis : a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis*. 2004, Vol. 9, pp. 265-277.
21. **Bui, Catherine.** *Exploration des enzymes de biosynthèse des protéoglycanes et leurs altérations lors de pathologies articulaires*. 2009. UMR 7561, Université Henri Poincaré, Nancy I.
22. **Poole, A. R.** Proteoglycans in health and disease : structures and functions. *Biochemistry Journal*. Review article, 1986, Vol. 236, pp. 1-14.
23. **Guermazi, A. et al.** Osteoarthritis : a review of strengths and weaknesses of different imaging options. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*. 2013, Vol. 39, pp. 567-591.
24. **Neumann, G. et al.** Location specific radiographic joint space width for osteoarthritis progression. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2009, Vol. 17, pp. 761-765.
25. **Braun, H. J, Gold, G. E.** Diagnosis of osteoarthritis imaging. *Bone*. 2012, Vol. 51, pp. 278-288.
26. **Eckstein, F., Wirth, W, Newitt, M. C.** Recent advances in osteoarthritis imaging the osteoarthritis initiative. *Nature Reviews Rheumatology*. 2012, Vol. 8, 10, pp. 622-630.
27. **Gold, G. E. et al.** MRI of articular cartilage in OA : novel pulse sequences and compositional/functional markers. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2006, Vol. 14, pp. 76-86.
28. **Salo, E.-N. et al.** Diffusion of Dg-DTPA<sup>2-</sup> into articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012, Vol. 20, pp. 117-126.
29. **Mosher, T. J. et al.** Osteoarthritis year 2013 in review imaging. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013, Vol. 21, pp. 1425-1435.
30. **Kulmala, K. A. M. et al.** Diffusion coefficients of articular cartilage for different CT and MRI contrast agents. *Medical Engineering & Physics*. 2010, Vol. 32, pp. 878-882.

31. **Burstein, D, Gray, L. M.** Is MRI fulfilling its promise for molecular imaging of cartilage in arthritis? *Osteoarthritis and Cartilage*. Editorial, 2006, Vol. 14, pp. 1087-1090.
32. **Wiener, E. et al.** Contrast enhancer cartilage imaging : comparison of ionic and non-ionic contrast agents. *European Journal of Radiology*. 2007, Vol. 63, pp. 110-119.
33. **Shapiro, E. M. et al.** Sodium visibility and quantitation in intact bovine articular cartilage using high <sup>23</sup>Na MRI and MRS. *Journal of Magnetic Resonance*. 2000, Vol. 142, pp. 24-31.
34. **Nakamura, H. et al.** Positron emission tomography with <sup>18</sup>F-FDG in osteoarthritis knee. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2007, Vol. 15, pp. 673-681.
35. **Tremoleda, J. L. et al.** Imaging technologies for preclinical models of bone and joint disorders. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Research*. 2001, Vol. 1, pp. 11-25.
36. **Oakley, S. P, Lassere, M. N.** A critical appraisal of quantitative arthroscopy as an outcome measure in osteoarthritis of the knee. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2003, Vol. 33, 2, pp. 83-105.
37. **Oakley, S. P. et al.** Arthroscopy - A potential "gold standard" for the diagnosis of the chondropathy of early osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005, Vol. 13, 5, pp. 368-378.
38. **Bredella, M. A. et al.** Accuracy of T2-weighted fast spin-echo MR imaging with fat saturation in detecting cartilage effects in the knee : comparison with arthroscopy in 103 patients. *American Journal of Roentgenology*. 1999, Vol. 172, 4, pp. 1073-1080.
39. **Martel-Pelletier, J., Wildi, L. M, Pelletier, J.-P.** Future therapeutics for osteoarthritis. *Bone*. 2012, Vol. 51, pp. 297-311.
40. **Billotey, C. et al.** *Nanoparticules fonctionnalisées pour le ciblage des protéoglycanes et leurs applications*. FR2981849 France, 2011.
41. **Madelmont, J. C. et al.** *Novel quaternary ammonium derivatives, methods for preparing same and pharmaceutical use for treatment or diagnosis of pathologies affecting cartilage*. Brevet FR2795412 France, 2000.
42. **Maurizis, J.C. et al.** In vitro binding of oxime acetylcholinesterase reactivators to proteoglycans synthesized by cultured chondrocytes and fibroblasts. *Biochemical Pharmacology*. 1992, Vol. 17, pp. 1927-1933.
43. **Nicolas, C. et al.** New quaternary ammonium oximam derivatives targeted toward cartilage : synthesis, pharmacokinetic studies, and antiinflammatory potency. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1999, Vol. 42, 25, pp. 5235-5240.



44. **Giraud, I. et al.** Application to a cartilage targeting strategy : synthesis and in vivo biodistribution of <sup>14</sup>C-labeled quaternary ammonium - glucosamine conjugates. *Bioconjugates Chemistry*. 2000, Vol. 11, 2, pp. 212-218.
45. **Maurizis, J.-C. et al.** Disposition in rats of N-pyridinium-propyl-cyclam, N-triethylammonium-propyl-cyclam, and N-[triethylammonium]-3-propyl-[<sup>15</sup>anne-N5, potential cartilage imaging agents. *Drug Metabolism and Disposition*. 2000, Vol. 28, pp. 418-422.
46. **Nicolas, C. et al.** Synthesis of N-quaternary ammonium [<sup>3</sup>H] and [<sup>99m</sup>Tc]polyazamacrocycles, potential radiotracers for cartilage imaging. *Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2000, Vol. 43, pp. 585-594.
47. **Ollier, M. et al.** Joint scintigraphy in rabbits with <sup>99m</sup>Tc-N-[3-(triethylammonio)propyl]-15ane-N5, a new radiodiagnostic agent for articular cartilage imaging. *Journal of Nuclear Medicine*. 2001, Vol. 42, pp. 141-145.
48. **Giraud, I. et al.** Synthesis and in vitro evaluation of quaternary ammonium derivatives of chlorambucil and melphalan, anticancer drugs designed for the chemotherapy of chondrosarcoma. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002, Vol. 45, pp. 2116-2119.
49. **Sweeney, S. E, Firestein, G. S.** Rheumatoid arthritis regulation of synovial inflammation. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004, Vol. 3, 6, pp. 372-378.
50. **Viatte, S., Plant, D, Raychaudhuri, S.** Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews of Rheumatology*. 2013, Vol. 9, 3, pp. 141-153.
51. **Assurance Maladie.** *Améliorer la qualité du système de santé et maîtriser les dépenses : propositions de l'Assurance Maladie pour 2014*. 2013.
52. **Doroshevskaya, A. Y. et al.** Apoptosis regulator proteins : Basis for the developpment of innovation strategy for the treatment of rheumatoid arthritis in patients of different age. *Bulletin of Experimental Biology & Medecine*. 2014, Vol. 156, 3, pp. 377-38.
53. **Koh, E.-M. et al.** Slug suppression induces apoptosis via Puma transactivation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes treated with hydrogen peroxide. *Experimental & Molecular Medecine*. 2010, Vol. 42, 6, pp. 428-436.
54. **Tak, P. P. et al.** Rheumatoid arthritis and p53 : how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. *Immunology Today*. 2000, Vol. 21, 2, pp. 78-82.
55. **Colebatch, A. N. et al.** EULAR recommendations for the use of imaging of the joints in the clinical management of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2013, Vol. 72, pp. 804-814.

56. **Kourilovitch, M., Galarza-Maldonado, C., Ortiz-Prado, E.** Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*. 2014, Vol. 48-49, pp. 26-30.
57. **Basu, S. et al.** Functional imaging of inflammatory diseases using nuclear medicine techniques. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2009, Vol. 39, 2, pp. 124-145.
58. **Khairnar, A. et al.** <sup>99m</sup>Tc-NTP 15-5 imaging for cartilage involvement in experimental rheumatoid arthritis : comparison with routinely used molecular imaging methods and sensitivity to chronic nonsteroidal antiinflammatory drug treatment. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2015, Vol. 56, 5, pp. 798-804.
59. **Put, S. et al.** SPECT imaging of joint inflammation with nanobodies targeting the macrophage mannose receptor in a mouse model for rheumatoid arthritis. *Journal of Nuclear Medicine*. 2013, Vol. 54, 5, pp. 801-807.
60. **Fuchs, K. et al.** In vivo imaging of cell proliferation enables the detection of the extent of experimental rheumatoid arthritis by 3'-deoxy-3'-<sup>18</sup>F-Fluorothymidine and small-animal PET. *Journal of Nuclear Medicine*. 2013, Vol. 54, 1, pp. 151-158.
61. **Palosaari, K. et al.** Contrast-enhanced dynamic and static MRI correlates with quantitative <sup>99m</sup>Tc-labelled nanocolloid scintigraphy. Study of early rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology*. 2004, Vol. 43, 11, pp. 1364-1373.
62. **Kelley, G. A., Kelley, K. S.** Effects of exercise on depressive symptoms in adults with arthritis and other rheumatic disease : a systematic review of meta-analyse. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2014, Vol. 15, 121.
63. **Lichtenstein, L., Jaff, H. L.** Chondrosarcoma of bone. *American Journal of Pathology*. 1942, Vol. 19, pp. 553-574.
64. **Fletcher, C. D. M., Unni, K. K., Mertens, F.** Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. *World Health Organization - Classification of Tumours*. IARC Press, 2002, pp. 234-257.
65. **Coca-Pelaz, A. et al.** Chondrosarcomas of the head and the neck. *European Archives of Otorhinolaryngology*. Review article, 2013.
66. **Gelderblom, H. et al.** The clinical approach towards chondrosarcomas. *The Oncologist*. 2008, Vol. 13, 3, pp. 320-329.
67. **O'Neal, L. W., Ackerman, L. V.** Chondrosarcoma of bone. *Cancer*. 1952, Vol. 5, 3, pp. 551-577.
68. **Angelini, A. et al.** Clinical outcome of central conventional chondrosarcoma. *Journal of Surgical Oncology*. 2012, Vol. 106, 8, pp. 929-937.

69. **Ollivier, L., Vanel, D., Leclère, J.** Imaging of chondrosarcomas. *Cancer Imaging*. Review article, 2003, Vol. 4, pp. 36-38.
70. **Logie, C. I. et al.** Chondrosarcoma : A diagnostic imager's guide to decision making and patient management. *Seminars in Musculoskeletal Radiology*. 2013, Vol. 17, 2, pp. 101-115.
71. **Murata, H. et al.** Clinical usefulness of thallium-201 scintigraphy and magnetic resonance imaging in the diagnosis of chondromyxoid fibroma. *Annals of Nuclear Medicine*. 2008, Vol. 22, 3, pp. 221-224.
72. **Douis, H, Saifuddin, A.** The imaging of cartilaginous bone tumours. II. Chondrosarcoma. *Skeletal radiology*. 2013, Vol. 42, 5, pp. 611-626.
73. **Hicks, R. J., Toner, G. C, Choong, P. F. M.** Clinical applications of molecular imaging in sarcoma evaluation. *Cancer Imaging*. 2005, Vol. 5, pp. 66-72.
74. **Brenner, W., Conrad, E. U, Eary, F.** FDG PET imaging fo grading and prediction of outcome in chondrosarcoma patients. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2004, Vol. 31, 2, pp. 189-195.
75. **Bovée, J. V. M. G. et al.** Cartilage tumours and bone development : molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nature Review Cancer*. 2010, Vol. 10, 7, pp. 481-488.
76. **Lee, F. Y. et al.** Chondrosarcoma of bone : An assessment of outcome. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1999, Vol. 81, 3, pp. 326-338.
77. **David, E. et al.** The bone niche of chondrosarcoma : A sanctuary for drug resistance, tumour growth and also a source of nex therapeutic targets. *Sarcoma*. 2011.
78. **Peyrode, C. et al.** A "proteoglycan targeting strategy" for the scintigraphic imaging and monitoring of the Swarm rat chondrosarcoma orthotopic model . *Sarcoma*. 2011.
79. **Miot-Noirault, E. et al.** First preclinical imaging of primary cartilage neoplasm and its local recurrence using 99mTc-NTP 15-5 radiotracer. *Journal of Nuclear Medicine*. 2009, Vol. 50, 9, pp. 1541-1547.
80. **Miot-Noirault, E. et al.** First in vivo SPECT imaging of mouse femorotibial cartilage using 99mTc-NTP 15-5. *Molecular Imaging*. 2008, Vol. 7, 6, pp. 263-271.
81. **Koes, B. W., Van Tulder, M. W, Thomas, S.** Diagnosis and treatment of low back pain. *British Medical Journal*. Clinical Review, 2006, Vol. 232, pp. 1430-1434.
82. **Gourmelen, J. et al.** Fréquence des lombalgies dans la population française de 30 à 64 ans. Résultats issus de deux enquêtes nationales. *Annales de Réadaptation et de Médecine Physique*. 2007, Vol. 50, pp. 633-639.

83. **Urban, J. P. G, Roberts, S.** Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Research & Therapy*. Review, 2003, Vol. 5, 3, pp. 120-130.
84. **Clouet, J. et al.** The intervertebral disc : From pathophysiology to tissue engineering. *Joint Bone Spine*. 2009, Vol. 76, pp. 614-618.
85. **Rannou, F. et al.** Biochimie et Biologie du disque intervertébral. *Revue du Rhumatisme*. 2000, Vol. 67, 4, pp. 214-218.
86. **Alkhatib, B. et al.** Acute mechanical injury of the human intervertebral disc : link to degeneration and pain. *European Cells and Materials*. Vol. 28, pp. 98-111.
87. Open Stax College. <http://cnx.org/content/m46352/latest/>. [En ligne]
88. **Roughley, P. J. et al.** The structure and degradation of aggrecan in human intervertebral disc. *European Spine Journal*. 2006, Vol. 15, 3, pp. 326-332.
89. **Sether, L. A. et al.** Intervertebral disk : normal age-related changes in MR signal intensity. *Radiology*. 1990, Vol. 177, 2, pp. 385-388.
90. **Pfirschmann, C. W. et al.** Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine*. 2001, Vol. 26, pp. 1873-1878.
91. **Finch, P.** Technology insight : imaging of low back pain. *Nature Clinical Practise Rheumatology*. 2006, Vol. 2, pp. 554-561.
92. **Mens, J. M. A.** The use of medication in low back pain. *Best Practise & Research Clinical Rheumatology*. 2005, Vol. 19, 4, pp. 609-621.
93. **Gopal, D. et al.** Molecular basis of intervertebral disc degeneration. *Advances in Experimental Medecine and Biology*. 2012, Vol. 760, pp. 114-133.
94. Encyclopédie Larousse. [En ligne]
95. **Bradley, W. G.** History of medical imaging. *Proceedings of the American Phylosophical Society*. 2008, Vol. 152, 3, pp. 349-361.
96. Cours d'imagerie médicale. *Ecole de Technologie Supérieure, Québec*. [En ligne]
97. [www.ouest-radiology.com/radiographie-standard/](http://www.ouest-radiology.com/radiographie-standard/). *ouest-radiologie*. [En ligne]
98. **Dubois, P.** Historique de l'imagerie médicale nucléaire. *Ingénierie et Recherche Biomédicale*. 2009, Vol. 30, pp. 40-46.
99. **Daurat, A., Noblet, V, Rousseau, F.** Dispositif d'imagerie médicale, cours de Master Images, Sciences et Technologies de l'Information. *Université de Strasbourg*. [En ligne]

100. **Jansen, F. P, Vanderheyden, J.-L.** The future of SPECT in a time of PET. *Nuclear Medicine and Biology*. 2007, Vol. 34, 7, pp. 733-735.
101. **De Dreuille, O. et al.** Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP). *Encyclopédie Médico-chirurgicale*. 2002, 35-310-A-10.
102. **Seret, A.** Cours d'imagerie médicale expérimentale. *Université de Liège*. [En ligne]
103. **Seret, A.** Will high-resolution/high-sensitivity SPECT ensure that PET is not the only survivor in nuclear medicine during the next decade? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2009, Vol. 36, 3, pp. 533-535.
104. **Zimmermann, R.** *La médecine nucléaire*. s.l. : EDP Sciences, 2006.
105. **Chérel, M. et al.** Radionucléides à usage médical, Aspects diagnostiques et thérapeutiques. *Rencontres Nucléaires*. 2012.
106. **Garrido, E.** *Production de radio-isotopes : de la mesure de la section efficace à la production*. SUBATEC, Université de Nantes, 2011.
107. **Auford, M.** *Chimiothèques de complexes du technétium et du rhénium ciblant l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  : développement de traceurs pour la détection de la néoangiogenèse tumorale*. CEA, Université Paris-Sud 11, 2008.
108. **Ardisson, V.** *Evaluation de nouveaux radiopharmaceutiques – Synthèse, évaluation et biodistribution de nouveaux radioligands peptidiques de VCAM-1 et  $\alpha V\beta 3$* . Université Joseph Fourier, Inserm 0340, Grenoble I, 2006.
109. **Alberto, R. et al.** Basic aqueous chemistry of  $[M(OH_2)_3(CO)_3]^+$  (M = Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application. *Coordination Chemistry Reviews*. 1999, Vol. 190-192, pp. 901-919.
110. **Billaud, E.** *Développement de radiotraceurs fluorés et iodés multimodaux. Applications en imagerie TEP et en radiothérapie interne vectorisée du mélanome*. UMR990 Université d'Auvergne/Inserm, Clermont-Ferrand, 2013.
111. **Yu, S. W. K. et al.** Biodistribution of bis- $[\beta-(N,N,N\text{-Trimethylamino})ethyl]selenide\text{-}^{75}Se$  diiodide, a potential articular cartilage imaging agent. *Nuclear Medicine and Biology*. 1988, Vol. 15, 2, pp. 229-259.
112. **Asghar, K, Roth, L. J.** Distribution of hexamethonium and other quaternary ammonium compounds in cartilage. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1971, Vol. 176, 1, pp. 83-92.
113. **Shindo, H., Takahashi, I, Nakajima, E.** Autoradiographic studies on the distribution of quaternary ammonium compounds. II. Distribution of  $^{14}C$ -Labeled decamethonium,

hexamethonium and dimethonium in mice. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1971, Vol. 19, 9, pp. 1876-1885.

114. **Huang, C. C., Korn, N, Counsell, R. E.** Potential organ-or tumor-imaging agents. 18. Radioiodinated diamines and bisquaternaries. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1979, Vol. 22, 4, pp. 449-452.

115. **Garrigue, H. et al.** Disposition and metabolism of two acetylcholinesterase reactivators, pyrimidoxime and HI 6, in rats submitted to organophosphate poisoning. *Xenobiotica*. 1990, Vol. 20, 7, pp. 699-709.

116. **Garrigue, H. et al.** Disposition and metabolism of acetylcholinesterase reactivators 2PAM-I, and R665 in rats submitted to organophosphate poisoning. *Xenobiotica*. 1991, Vol. 21, 5, pp. 583-595.

117. **Shindo, H. et al.** Autoradiographic studies on the distribution of quaternary ammonium compounds. III. Distribution, excretion, and metabolism of carbon-14 labeled pancuronium bromide in rats. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1974, Vol. 22, 11, pp. 2502-10.

118. **Korn, N. et al.** Bisquaternary ammonium compounds as potential tumor imaging agents. *International Journal of Nuclear Medicine and Biology*. 1979, Vol. 6, pp. 153-161.

119. **Yu, S. W. K. et al.** The biodistribution of [75Se]bis-[ $\beta$ -(N,N,N-Trimethylamino)ethyl]selenide diiodide in adult guinea pigs. *Nuclear Medicine and Biology*. 1989, Vol. 16, 3, pp. 255-259.

120. **Gibbs-Strauss, S. L. et al.** Molecular imaging agents specific for the annulus fibrosus of the intervertebral disk. *Molecular Imaging*. 2010, Vol. 9, 3, pp. 128-140.

121. **Vidal, A.** *Vectorisation de molécules d'intérêt vers le cartilage - Application au traitement et au diagnostic de l'arthrose*. UMR990 Université d'Auvergne/Inserm, Clermont-Ferrand, 2004.

122. **Cachin, F. et al.** Nouveaux traceurs TEMP : exemple des traceurs des protéoglycanes et de la mélanine. *Médecine Nucléaire*. 2009, Vol. 33, pp. 161-167.

123. **Cachin, F. et al.** First ex vivo study demonstrating that 99mTc-NTP 15-5 radiotracer binds to human articular cartilage. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2011, Vol. 38, pp. 2077-2082.

124. **Miot-Noirault, E. et al.** Early detection and monitoring of cartilage alteration in the experimental meniscectomised guinea pig model of osteoarthritis by 99mTc-NTP 15-5 scintigraphy. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2007, Vol. 34, pp. 1280-1290.

125. **Shokeen, M, Anderson, C. J.** Molecular imaging of cancer with copper-64 radiopharmaceuticals and positron emission tomography (TEP). *Accounts of Chemical Research*. 2009, Vol. 42, 7, pp. 832-841.
126. **Blower, P. J., Lewis, J. S, Zweit, J.** Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *Nuclear Medicine & Biology*. 1996, Vol. 23, pp. 957-980.
127. **Wadas, T. J. et al.** Copper chelation chemistry and its role in copper radiopharmaceuticals. *Current Pharmaceutical Design*. 2007, Vol. 13, pp. 3-16.
128. **Cutler, C. S. et al.** Radiometals for combined imaging therapy. *Chemical Reviews*. 2013, Vol. 113, pp. 858-883.
129. **Moi, M. K. et al.** Copper chelates as probes of biological systems : stable copper complexes with a macrocyclic bifunctional chelating agent. *Analytical Biochemistry*. 1985, Vol. 148, 1, pp. 249-253.
130. **Bartholomä, M. D.** Recent developments in the design of bifunctional chelators for metal-based radiopharmaceuticals used in Positron Emission Tomography. *Inorganica Chimica Acta*. 2012, Vol. 389, pp. 36-51.
131. **Ramogida C. F. and Orvig C.** Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy. *Chemical Communication*. 2013, Vol. 49, pp. 4720-4739.
132. **Price E. W. and Orvig C.** Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chemical Society Review*. 2014, Vol. 43, pp. 260-290.
133. **Donnelly P. S.** The role of coordination chemistry in the development of copper and rhenium radiopharmaceuticals. *Dalton Transaction*. 2011, Vol. 40, pp. 999-1010.
134. **Pandya, D. N. et al.** A new synthesis of TE2A - A potential bifunctional chelator for <sup>64</sup>Cu. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2010, Vol. 44, pp. 185-192.

# **Chapitre 2**

**Synthèses de nouveaux agents  
chélatants bifonctionnels (CBFs)**

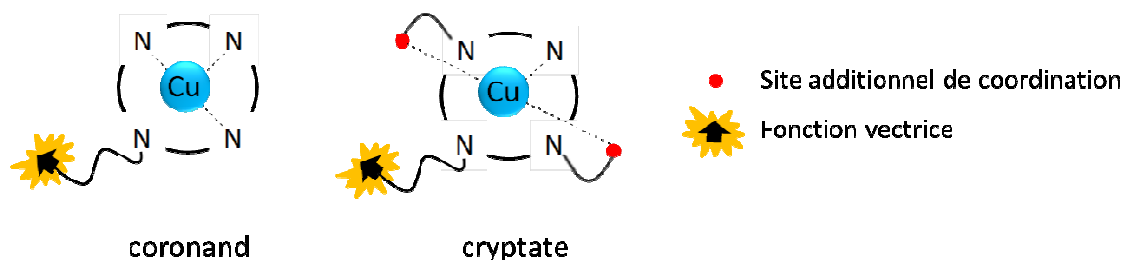




Les stratégies de synthèse présentées ci-après peuvent être divisées, pour la plupart d'entre elles, en deux parties. La première consiste à fonctionnaliser le polyazamacrocycle, renforcé ou non, à l'aide de fonctions capables d'apporter un ou plusieurs sites chélatants supplémentaires pour stabiliser l'ion métallique central. Dans la seconde partie, le motif précédemment formé est couplé avec un « bras » vecteur, porteur d'une fonction ammonium quaternaire, appelé dans la suite de la thèse bras AQ ou NTP. Cette dernière étape conduit généralement à la formation de sous-produits indésirables, en particulier : des polyamines cycliques poly-substituées par la fonction NTP, et des produits résultant de la dégradation du bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium. La purification finale des composés par des méthodes chromatographiques s'est avérée l'étape limitante de ces synthèses.

Dans cette dernière partie, le CBF est obtenu sous la forme d'un sel dont le contre-ion est l'ion bromure. Lors des radiomarquages, présentés dans le chapitre 3, la solution de radionucléide est sous la forme  $^{64}\text{CuCl}_2$ . Afin d'éviter d'avoir deux contre ions différents à l'issue du radiomarquage, la dernière étape de chaque synthèse a consisté à éluer la molécule finale sur une résine échangeuse d'ions saturée en ions chlorure.

Les polyazamacrocycles sont connus comme étant de bons ligands pour complexer l'ion cuivrique, cependant ils peuvent présenter des problèmes de stabilité avec le métal complexé lorsqu'une ou plusieurs des amines secondaires du cycle sont mises à profit pour le couplage avec un vecteur. Greffer des bras pouvant participer à la complexation du métal sur les autres amines disponibles du cycle (*N*-fonctionnalisation) va permettre de passer d'un ligand coronand à un ligand cryptant (Figure 18). Ce renforcement de la sphère de coordination peut permettre d'optimiser la complexation du métal au sein de la cavité macrocyclique, conduisant à l'augmentation de la stabilité du  $^{64}\text{Cu}$  *in vitro* et *in vivo*.



**Figure 18 : Systèmes coronand et cryptand**

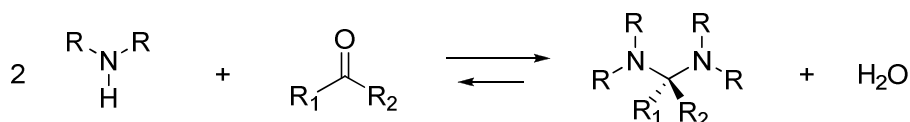
L'introduction de tels groupements permet non seulement de moduler l'affinité du ligand pour le métal chélaté, dans le but de diminuer la démétallation/transmétallation du cuivre *in vivo*, mais elle permet également de modifier le caractère hydrophile ou de moduler la charge globale du complexe.

Lors de ces fonctionnalisations, le chimiste peut appliquer diverses stratégies. Soit il choisit de laisser la fonctionnalisation du cycle s'effectuer statistiquement en utilisant par exemple un large excès de macrocycle, ce qui implique ensuite une purification qui peut être fastidieuse, soit il tente d'effectuer cette fonctionnalisation de façon régiosélective :

- par contrôle externe :
  - *via* des groupements protecteurs (composés **6**, **41**, **52**, **54**),
  - par contrôle du pH,
- par contrôle interne :
  - *via* la formation de groupement aminoré (composés **10**, **13**, **22**, **28**, **45**, **48**).

Cette dernière option, connue et utilisée avec succès depuis quelques années (1) (2) consiste à protéger simultanément deux (ou plus) amines secondaires d'un même cycle polyazoté à l'aide d'un pont intra-cyclique.

La fonction aminoré est obtenue par condensation d'une amine, primaire ou secondaire, sur une fonction carbonyle (Figure 19) (3). Il s'agit d'une réaction d'amination réductrice.



**Figure 19 : Formation d'une fonction aminoré**

Cette réaction est réversible par traitement en milieu hydrate d'hydrazine pour un intermédiaire formé avec le glyoxal, ou par traitement en milieu basique pour un intermédiaire formé à partir du formaldéhyde.

- Nature des bras chélatants

Afin de renforcer la complexation de l'isotope de cuivre au sein de la cage macrocyclique, les bras chélatants introduits sur les amines du cycle seront porteurs d'hétéroatomes tels que l'azote ou l'oxygène. Le choix s'est porté sur des bras picolyles et esters, permettant d'obtenir pour ces derniers après hydrolyse leurs équivalents acides carboxyliques.

➤ *Bras benzyle*

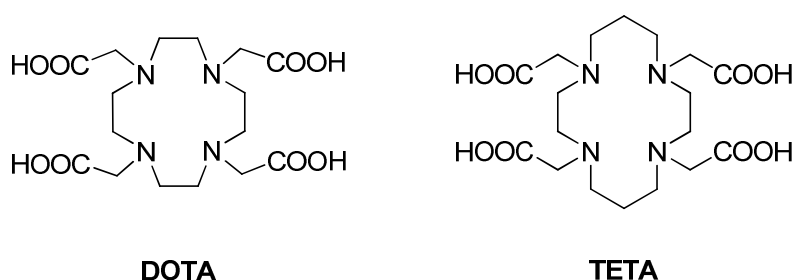
La *N*-fonctionnalisation par des fonctions benzyles va nous servir de contre-exemple. En effet, ces fonctions ne possèdent pas d'hétéroatomes susceptibles d'interagir avec l'ion cuivrique. Elles vont également augmenter fortement le caractère hydrophobe du CBF.

➤ *Bras picolyle*

Nous avons choisis de travailler avec le sel de 2-méthylpyridine, qu'il convient de traiter en milieu basique avant son utilisation. Dans ce dernier, l'azote pyridinique est en position  $\gamma$  par rapport à l'azote du macrocycle, démontrant son intérêt et son rôle dans la complexation du cuivre(II) au sein de cages macrocycliques (4).

➤ *Bras acide carboxylique*

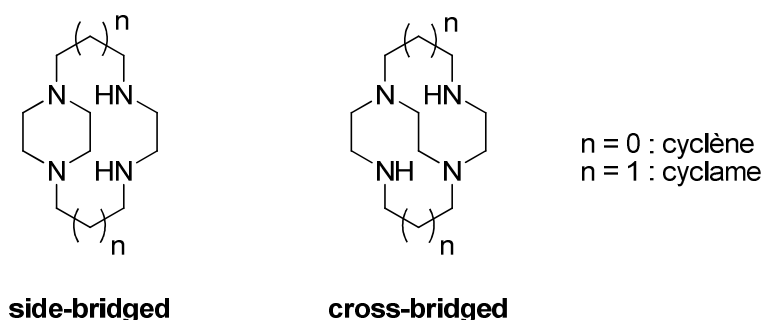
Les chélateurs DOTA et TETA (Figure 20), tétra-fonctionnalisés par des ligands carboxyméthyles, sont très largement exploités pour les études d'imageries cliniques et les thérapies utilisant un radionucléide cuivrique (5). Sur ces modèles, nous avons choisis de fonctionnaliser les amines de nos macrocycliques par des bras acétates et leurs équivalents acides carboxyliques.



**Figure 20 : Structures du DOTA et du TETA**

DOTA et TETA présentent une grande stabilité avec le métal complexé, en grande partie due à la contrainte géométrique du macrocycle ainsi qu'à la présence de bras chélatants. Toutefois, ils ne présentent pas une stabilité maximale et peuvent subir *in vivo* des phénomènes de démétallation (6) ou de transchélatation (7) du  $^{64}\text{Cu}$  ayant pour conséquence son accumulation dans le foie.

Depuis plusieurs années, de nombreux efforts ont été mis en place afin de pallier au manque d'inertie cinétique des chélateurs cycliques en augmentant la rigidité du macrocycle. Par conséquent, des chélateurs renforcés dérivés du cyclame et du cyclène appelés « cross-bridged » (CB) ou « side-bridged » (SB) ont été développés afin de former un complexe plus stable avec le métal. Ces renforcements sont constitués d'un pont éthylénique connectant deux azotes adjacents (side) ou non-adjacents (cross) entre eux (Figure 21).



**Figure 21 : Renforcements « side-bridged » et « cross-bridged » sur le cyclène et le cyclame**

Ces ligands renforcés sont flexibles, mais lorsqu'ils sont coordonnés à des cations métalliques ils adoptent une conformation à faible énergie dans laquelle les quatre paires de doublets non liant des azotes pointent dans la même direction (8). Ainsi, ils exhibent une forte capacité complexante (Figure 22). De plus, ces ligands sont très basiques, et sont souvent qualifiés d'éponges à proton (9) (10).

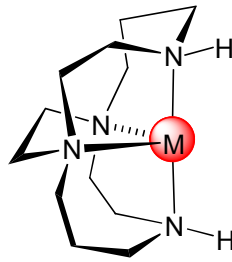


Figure 22 : Conformations du cyclam « cross-bridge » complexé

L'obtention d'un renforcement est obtenue à la suite du clivage du pont glyoxal en milieu réducteur, typiquement  $\text{NaBH}_4$  dans l'éthanol, sur un tétraazamacrocycle substitué, caractéristique déterminante dans la nature finale du renforcement. En effet, le clivage du pont bis-aminal d'un macrocycle-glyoxal mono-substitué conduira à un renforcement side (Figure 23), alors qu'un macrocycle *trans*-di-substitué conduira à un renforcement cross (Figure 24).

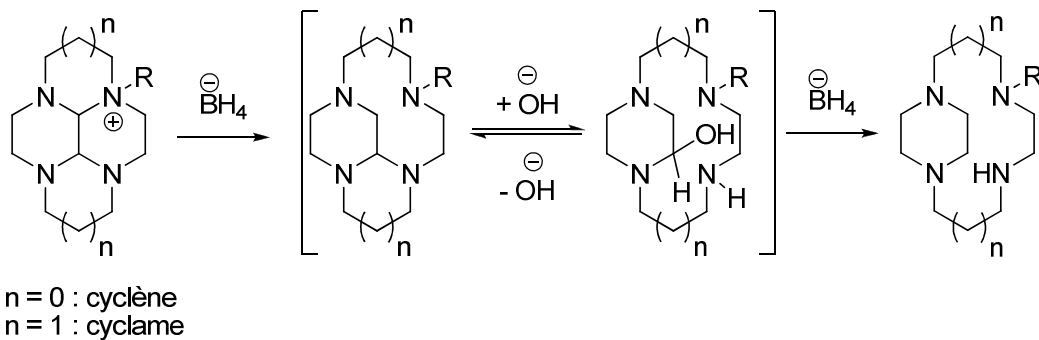


Figure 23 : Mécanisme de clivage du pont glyoxal sur un cycle mono-fonctionnalisé pour l'obtention du renforcement side

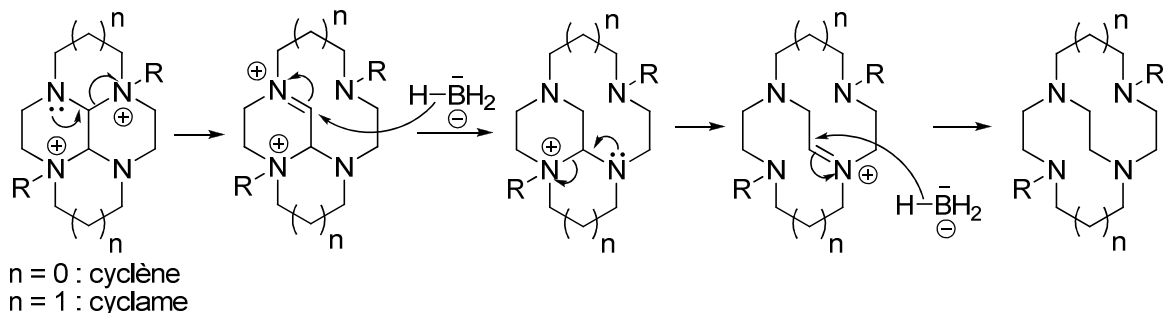
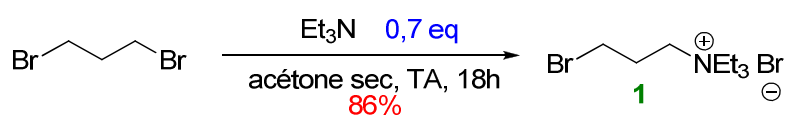


Figure 24 : Mécanisme de clivage du pont glyoxal sur un cycle di-fonctionnalisé pour l'obtention du renforcement cross (8)

Cependant, augmenter la rigidité du macrocycle a pour conséquence de diminuer la cinétique de complexation du radionucléide, ce qui se traduit généralement par une température de chauffage et des temps de réactions plus élevés (8) (11). Ces conditions de marquage peuvent ne pas être compatibles avec l'utilisation de biomolécules ou de peptides thermo-sensibles.

## I. Synthèse du bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (composé 1)



**Schéma 1**

Le groupement fonctionnel porteur de l'ammonium quaternaire sera le même pour tous les CBFs que nous synthétiserons. Ce bras AQ (abrégé NTP) sera introduit sur nos polyazamacrocycles par substitution nucléophile sur le bromure de 3-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium. Ce réactif est obtenu par substitution nucléophile de la triéthylamine sur le 1,3-dibromopropane (Schéma 1).

L'intérêt de l'utilisation de l'acétone anhydre pour cette synthèse réside dans le fait que le composé **1** précipite dans le milieu dès sa formation, permettant de l'isoler par simple filtration. La triéthylamine est utilisée en défaut afin de limiter la formation du produit di-substitué (composé **2**) présent en très faible proportion (de l'ordre de 1 à 3%) (Schéma 2).

Cette réaction de substitution est en compétition avec une réaction d'élimination, dont le produit (composé **3**) a été isolé et caractérisé (Schéma 2).



**Schéma 2**

Des essais de purification ont permis de séparer aisément les composés di-substitué et mono-substitué. A l'inverse, la séparation du produit **1** d'avec le produit de l'élimination **3** est plus délicate. Une fois la séparation effectuée, le composé **1** pur, s'il est chauffé en milieu basique, conduit de nouveau à la formation du composé **3** dans des proportions qui augmentent avec la température. Ce produit d'élimination sera donc généré lors du greffage du NTP sur le polyazamacrocycle, il sera systématiquement éliminé par purification sur colonne après cette étape.

Compte tenu de ces éléments, le produit brut obtenu lors de cette synthèse (Schéma 1) a été utilisé tel quel dans les synthèses qui suivent. Selon les lots synthétisés, le produit d'élimination représente de 5 à 12% maximum du rendement global.

## II. CBFs dérivés du cyclame

### A. Synthèse du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)propan-1-aminium ou 14-4 NTP (composé **6**)

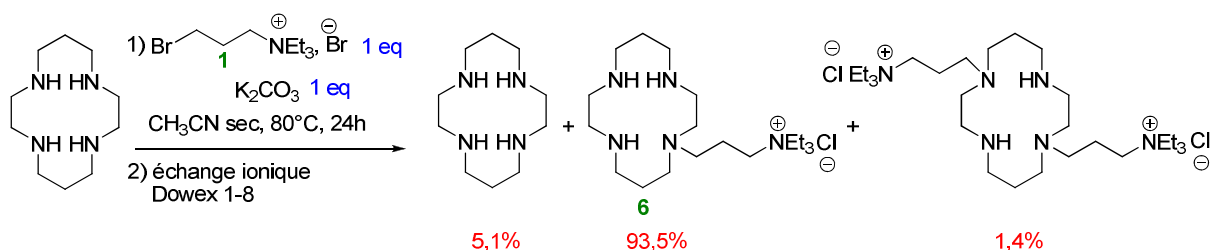


Schéma 3

Dans un premier temps, la 14-4 NTP a été préparée par réaction directe entre le cyclame et le composé **1** dans des proportions stœchiométriques. La purification du brut de réaction s'est faite sur une colonne phase inverse C18, éluée à l'eau distillée. Lors du contrôle des fractions, la révélation des plaques CCM s'est faite à l'aide du réactif de Dragendorff, qui est un révélateur des alcaloïdes et des ammoniums quaternaires. Cette purification s'est avérée délicate puisque le cyclame, le composé **1** ainsi que le brut de réaction ne migraient pas de façon satisfaisante sur les plaques CCM, malgré des essais avec plusieurs éluants. Après révélation, ces produits apparaissaient sous la forme d'une longue flamme qui démarrait au point de dépôt. Toutes les fractions ont été évaporées et

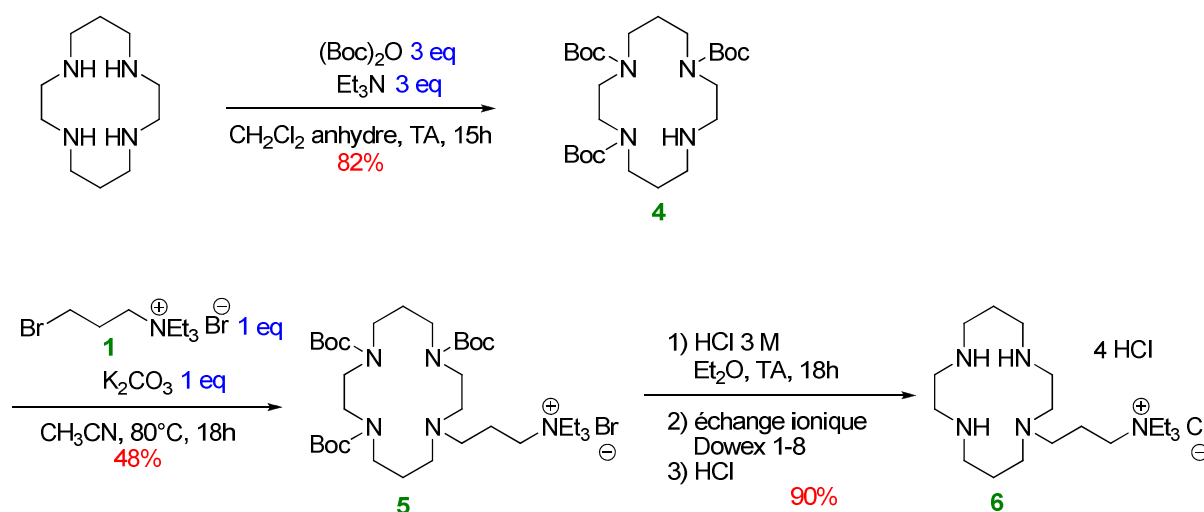


contrôlées. Seules trois fractions, parmi les premières éluées, présentaient une masse non négligeable de produit. Après avoir réalisée la RMN du proton sur ces trois fractions, il s'est avéré que seule la troisième fraction semblait contenir la molécule 14-4 NTP attendue. Après passage de cette fraction sur résine échangeuse d'ions saturée en ions chlorure, l'éluat a été radiomarquée par le cuivre-64. Le contrôle de complexation a révélé la présence d'un mélange de trois produits qui, après caractérisation par spectrométrie de masse, se sont avérés être le cyclame (5,1%), la 14-4 NTP (93,5%) et le cyclame porteur de deux bras AQ (1,4%) (Schéma 3). De plus, la quantité de matière de cette fraction était très faible comparée à celle attendue (rendement de 10%), suggérant une perte de produit importante sur la colonne.

Une deuxième voie de synthèse a donc été entreprise, mettant en jeu successivement :

- i) la protection du cyclame,
- ii) la fonctionnalisation du macrocycle protégé par le bras AQ,
- iii) la déprotection du ligand.

Une telle stratégie évite la formation d'un cyclame porteur de plusieurs fonctions AQ.



La protection de trois des quatre amines secondaires du cyclame par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc), selon la méthode décrite par Fabbrizzi et coll. (12), a été réalisée

afin d'obtenir le ligand macrocyclique tri-substitués **4**. Le couplage avec le bras AQ s'effectue ensuite sur le seul site disponible du polyazamacrocycle. Le composé **5**, obtenu après purification sur colonne chromatographique (silice, acétate d'éthyle/éthanol, 80/20 v/v), est ensuite traité en milieu éther/acide chlorhydrique afin de déprotéger les groupes Boc. Après un passage sur une résine échangeuse d'ion saturée en ions chlorure et un traitement en milieu acide, le composé **6** est obtenu sous sa forme chlorhydrate avec un rendement de 90% (Schéma 4).

Le rendement modéré obtenu lors de la synthèse du composé **5** peut s'expliquer par le fort encombrement stérique des trois groupements protecteurs, rendant l'alkylation de la dernière amine secondaire plus difficile. La méthode de purification peut également en être responsable.

### B. Synthèse du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(8-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)propan-1-aminium ou 1 PYR 14-4 NTP (composé **10**)

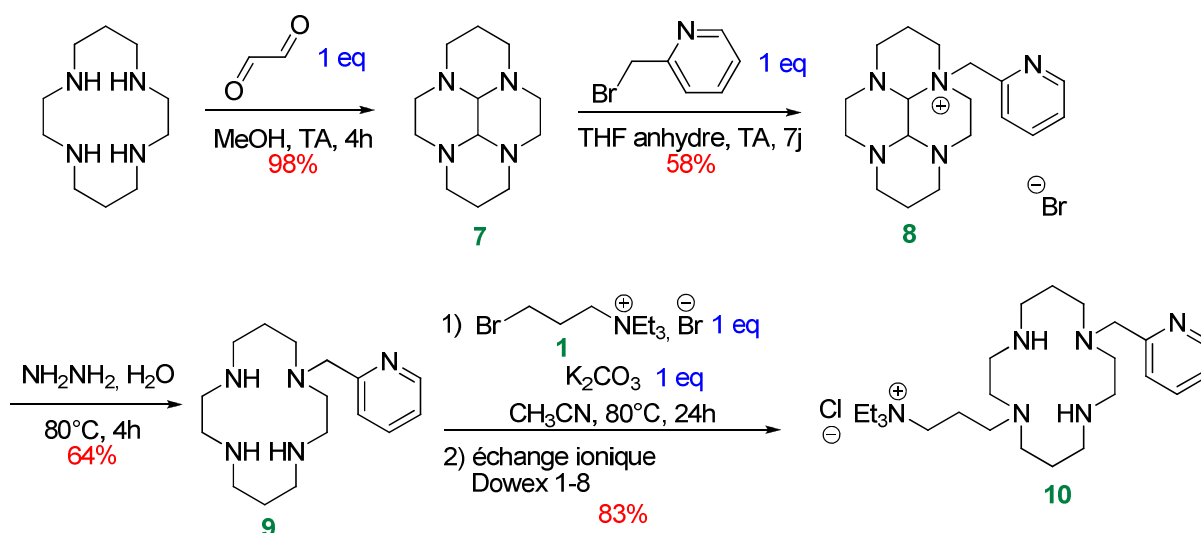


Schéma 5

Deux tests ont été effectués afin de comparer la nature de la protection bisaminale pour la substitution sur la 2-bromométhylpyridine. Les deux essais ont été réalisés dans le THF anhydre, à température ambiante et sous atmosphère inerte. A chaque fois 1 équivalent

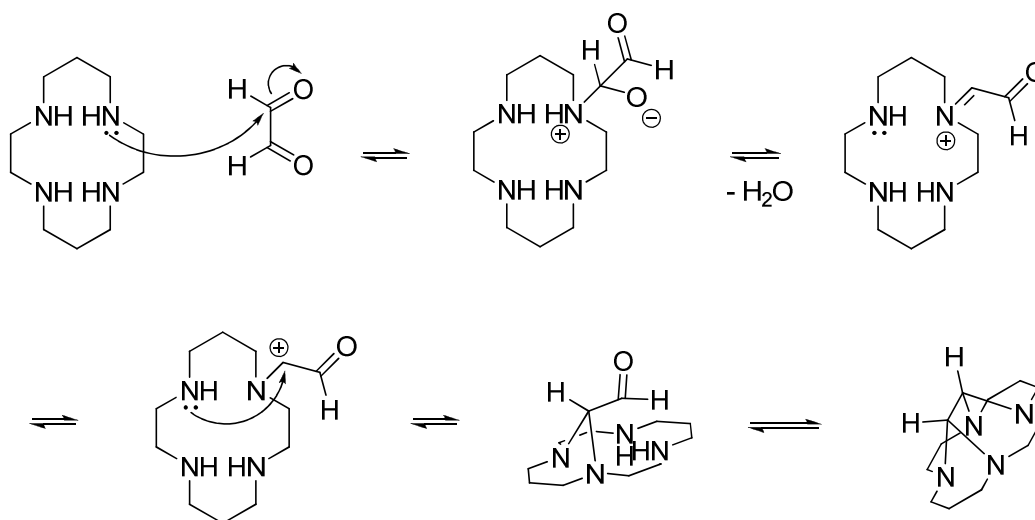
de 2-bromométhylpyridine a été mis en réaction avec le cyclame-bisaminal. Ainsi, alors que la protection par le glyoxal permet l'obtention d'un précipité correspondant au composé **8** avec un rendement de 58% au bout d'une semaine, la réaction de l'intermédiaire cyclame-formaldéhyde avec le bras alkylant ne forme aucun précipité sur la même période. Dans ce dernier cas, l'analyse du brut réactionnel après évaporation du solvant a néanmoins mis en évidence la présence en faible proportion du composé mono-alkylé attendu, le composé de départ étant très majoritaire. La solubilité du sel formé est peut être supérieure à celle du composé **8**, empêchant la réaction de se déplacer dans le sens de la précipitation.

Ainsi, après la condensation du glyoxal sur le cyclame, le composé bis-aminal obtenu (composé **7**) a ensuite été traité par un équivalent de 2-bromométhylpyridine dans le THF anhydre sous atmosphère inerte, selon la méthode mise au point par Le Baccon et coll. (13). Très lacrymogène et instable, l'agent alkylant est commercialisé sous la forme d'un sel, le bromhydrate de 2-bromométhylpyridine. Un traitement en milieu basique est donc nécessaire avant son utilisation.

Le solvant choisi permet d'une part de solubiliser les réactifs et d'autre part de favoriser la précipitation du mono-sel bromé. Le sel est isolé par filtration puis déprotégé par hydrazinolyse. Le composé mono-alkylé est alors mis en réaction avec un équivalent du composé **1** dans l'acétonitrile en présence d'une base minérale à reflux. La base permet de neutraliser les protons libérés lors de l'alkylation du cyclame, afin d'éviter l'acidification du milieu réactionnel et la protonation des azotes secondaires du cycle qui empêcherait la substitution nucléophile. La 1-PYR 14-4 NTP (composé **10**) est obtenue après purification sur colonne chromatographique (alumine, dichlorométhane/méthanol, 90/10 v/v) et passage sur résine échangeuse d'ion saturée en ions chlorure (Schéma 5).

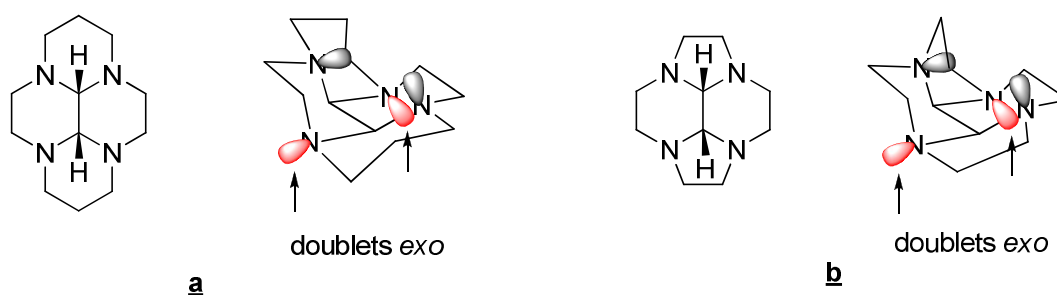
La condensation du glyoxal sur le cyclame (ou le cyclène) est une réaction quantitative et résulte en un composé possédant une configuration *cis* du pont bis-aminal (Figure 25). Une amine secondaire du macrocycle attaque une des fonctions aldéhydes du glyoxal. Après déshydratation, l'iminium formé, en équilibre avec la forme présentant un carbone électrophile, est attaqué par le doublet non liant de l'amine secondaire voisine pour former un cycle à 6 atomes (5 pour le cyclène) au sein du ligand cyclique. Les deux autres atomes d'azotes du macrocycle et la deuxième fonction aldéhyde du glyoxal suivent le

même mécanisme pour former le macrocycle sous protection bisaminal, caractérisé par 4 cycles adjacents à 6 atomes (2 cycles à 6 atomes + 2 cycles à 5 atomes pour le cyclène).



**Figure 25 : Proposition du mécanisme réactionnel de la condensation du glyoxal sur le cyclame**

Cette configuration particulière induit une discrimination entre les deux paires d'atomes d'azote opposées : celles possédant les doublets non liants sur la face convexe de la structure moléculaire (doublets *exo*) présente un caractère nucléophile beaucoup plus marquée que celle dont les doublets non liants sont sur la face concave (doublets *endo*) (Figure 26) (1) (14) (8).



**Figure 26 : Structures moléculaires du cyclame-glyoxal (a) et du cyclène-glyoxal (b) (8)**

Une première *N*-alkylation à lieu *via* le doublet non liant d'un des deux atomes d'azote en *exo*, plus accessibles stériquement que ceux en *endo*. Le produit *exo*-alkylé est alors conformationnellement bloqué par l'ammonium quaternaire. La seconde *N*-alkylation

sera fortement régiosélective et se fera *via* le deuxième doublet non liant en *exo*. Cette *exo*-alkylation est également en faveur d'une minimisation des répulsions coulombiennes (8). Par conséquent, même en présence d'un fort excès d'halogénoalkyle (ou d'halogénoaryle), seule la *trans*-disubstitution sera observée sur le cyclame-glyoxal ou le cyclène-glyoxal.

### C. Synthèse du chlorure de 3-(4,11-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium ou 2 PYR 14-4 NTP (composé 13)

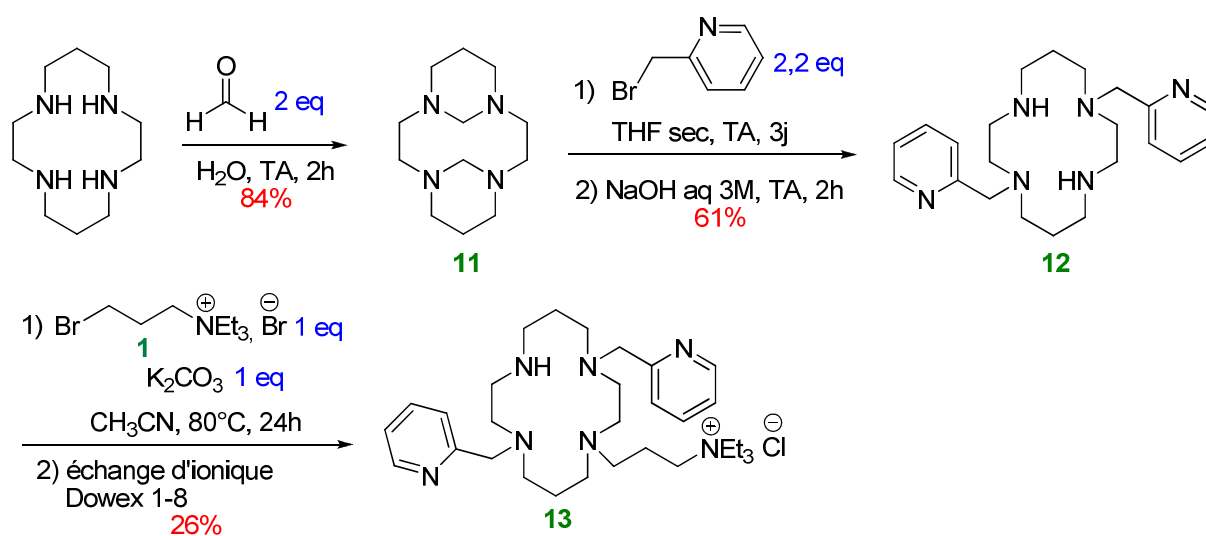


Schéma 6

Cette synthèse a été réalisée selon le même principe que pour la mono-*N*-alkylation du cycle. Cependant, la protection bis-aminal et la nature de l'halogène porté par l'halogénométhylpyridine sont différentes, conséquence de tests effectués pour obtenir le cycle di-substitué avec un rendement intéressant. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-après (Tableau 5).

X	Protection bis-aminale	Stoechiométrie bis-aminale : RX	Solvant	Temps de réaction (jours)	Rendement (%)
Br	glyoxal	1 : 2	THF sec	7	20
Br	glyoxal	1 : 5	THF sec	13	57
Cl	glyoxal	1 : 4	CH <sub>3</sub> CN sec	7	0
Cl	formaldéhyde	1 : 4	CH <sub>3</sub> CN sec	19	71
Br	formaldéhyde	1 : 2,2	THF sec	3	70

**Tableau 5 : Rendement de synthèse en fonction de la nature du nucléofuge de l'alkylant et de la protection bisaminal**

Malgré le changement de nombreux paramètres, il ressort de ces résultats que la protection par le formaldéhyde permet l'obtention d'un rendement plus important de précipité intermédiaire. A l'issue de cette alkylation avec la 2-bromométhylpyridine, l'analyse du précipité obtenu montre un mélange constitué du composé disubstitué protégé et de son homologue non protégé (composé **12**). Ceci peut s'expliquer par le caractère basique du groupement pyridinique. La déprotection totale est obtenue après une hydrolyse en milieu basique (NaOH 3 M) à température ambiante. Cette opération est effectuée directement dans le milieu réactionnel contenant le précipité.

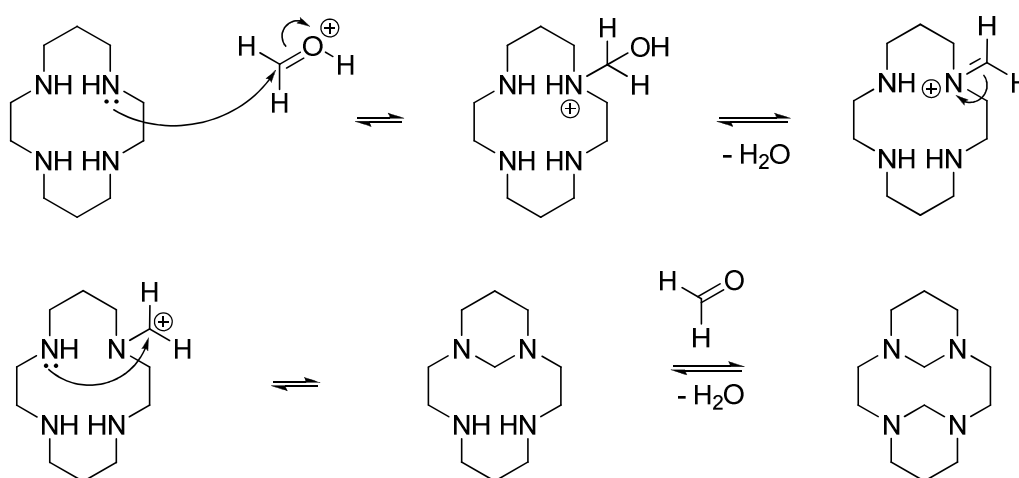
La configuration en *trans* des deux groupements 2-méthylpyridine du composé **12** (forme bromhydrate) a été confirmée par une étude structurale par diffraction des rayons X sur monocristal (voir partie expérimentale). Cette étude confirme la régiosélectivité de la réaction.

Le composé **12** est mis en réaction avec 1 équivalent de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium dans l'acétonitrile à reflux. Après traitement sur colonne chromatographique (alumine, dichlorométhane/méthanol, 90/10 v/v) du brut de réaction et passage sur résine échangeuse d'ions saturée en ions chlorure, la 2-PYR 14-4 NTP est obtenue avec un rendement de 26% (composé **13**) (Schéma 6).

Le faible rendement de synthèse dans la dernière étape s'explique par la formation concomitante du composé tétra-substitué. La fonctionnalisation de la troisième amine secondaire du macrocycle provoque une perte de symétrie. Coûteuse en énergie, cette troisième substitution favorise thermodynamiquement la quatrième substitution qui augmente la stabilité de la molécule. Le composé tétra-substitué est donc toujours observé et ce quelque soit le nombre d'équivalent de composé **1** introduit (8).

De plus, la séparation chromatographique du composé **12** qui n'a pas réagi, et des produits mono- (composé **13**) et di-fonctionnalisés s'est avérée très délicate, affectant la quantité de composé **13** isolé.

Mise au point dans les années 90 (2), l'intermédiaire macrotricyclique (composé **11**) a été décrit comme possédant les mêmes propriétés régiosélectives que le cyclame-glyoxal (Figure 27). La réaction, réalisée en milieu aqueux, présente un mécanisme réactionnel similaire à la réaction de formation du cyclame-glyoxal.



**Figure 27 : Proposition du mécanisme réactionnel de la condensation du formaldéhyde sur le cyclame**

La structure cristallographique de l'intermédiaire bisaminé du cyclame a montré une conformation *trans* des deux ponts méthyléniques (Figure 28) (15).

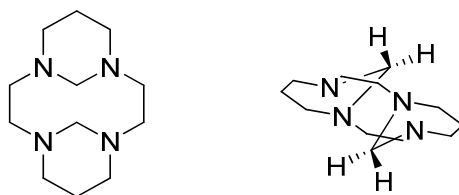


Figure 28 : Structure moléculaire du cyclame-formaldéhyde

A noter que seul le cyclame-formaldéhyde est décrit dans la littérature. Durant cette thèse, nous avons tenté de condenser le formaldéhyde sur le cyclène. Nos essais sont restés infructueux.

#### D. Synthèse du chlorure de 3-(4,11-bis(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium ou TE2A NTP (composé 22)

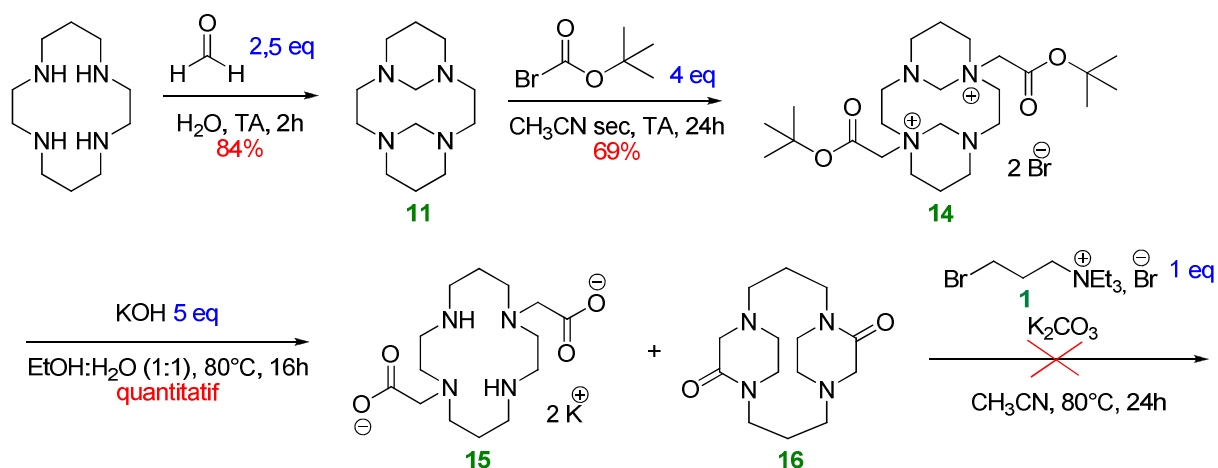


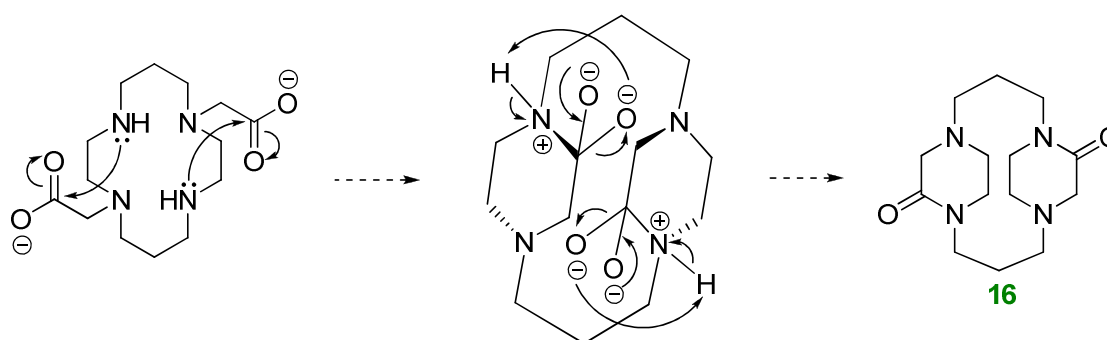
schéma 7

Dans un premier temps, nous avons tenté de condenser le bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium directement sur le TE2A (composé 15). Ainsi, un excès de bromoacétate de *tert*-butyle est mis en réaction pendant 24 heures dans l'acétonitrile anhydre et sous atmosphère inerte sur le cyclame-formaldéhyde. Après isolation par filtration de l'intermédiaire bisaminal di-substitué, celui-ci est traité par hydrolyse basique à chaud pour donner la TE2A sous sa forme carboxylate. La dernière étape de la synthèse



consiste à alkyler une amine secondaire du cyclame par un équivalent de composé **1** (Schéma 7).

Malheureusement, cette dernière étape n'a pas permis de fonctionnaliser la TE2A avec la chaîne porteuse de la fonction « vectrice ». Après filtration, évaporation et traitement sur colonne chromatographique (alumine, dichlorométhane/méthanol, 90/10 v/v) du brut réactionnel, les deux composés **1** et **15** de départ ont été récupérés en plus d'une troisième fraction qui a cristallisé. L'analyse structurale par diffraction des rayons X de ces cristaux a permis de caractériser la structure du composé **16**. La formation de ce produit correspond à la lactamisation du diacide en un lactame tricyclique (**16**) (Figure 29).



**Figure 29 : Schéma réactionnel hypothétique pour l'obtention du composé **16****

Une deuxième voie de synthèse a donc été explorée en prenant en compte deux remarques :

- la déprotection du cyclame bis-aminal s'opérant en milieu basique aqueux, elle entraîne dans le même temps l'hydrolyse des deux bras *tert*-butyl déjà greffés sur le cyclame bis-aminal ;
- la tentative de greffage du bras AQ sur le cyclame porteur de deux bras acide n'a pas conduit à la formation de la molécule espérée. Il faut donc réaliser cette étape quand les groupements sont encore sous forme ester.

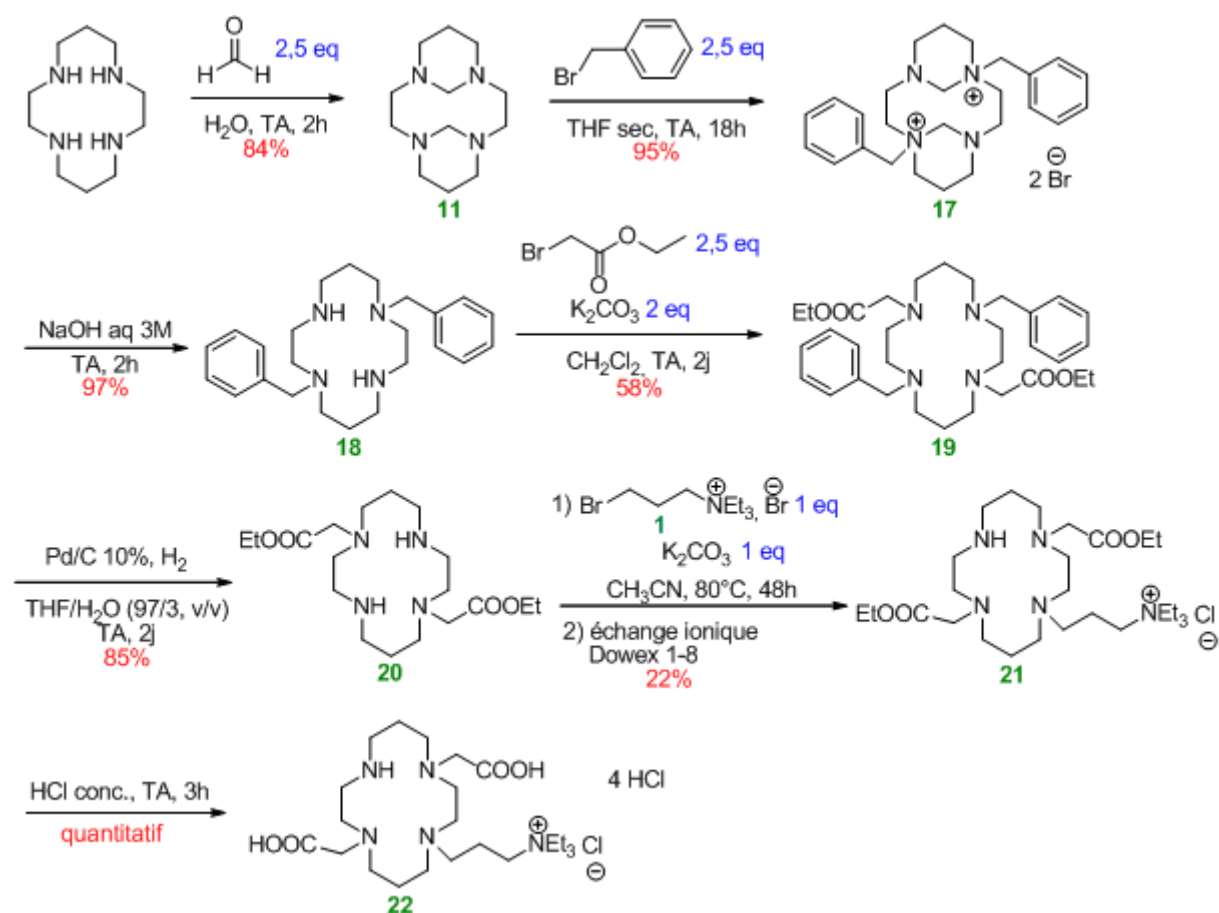


Schéma 8

En conséquence, une nouvelle voie de synthèse décrite ci-dessus a été choisie. Après la protection du cyclame par le formaldéhyde, l'intermédiaire bis-aminal est mis en réaction avec un excès de bromure de benzyle, dans le THF sec, à température ambiante et sous atmosphère inerte pour donner le sel di-alkylé correspondant selon la méthode de Royal et coll. (15). Cette étape peut également s'opérer sur le cyclame-glyoxal mais le rendement de di-alkylation est plus faible (35% contre 95%), et le protocole de déprotection de l'intermédiaire cyclame-glyoxal est plus contraignant que celui de son équivalent cyclame-formaldéhyde.

Le di-sel est ensuite déprotégé en milieu basique, puis le cyclame di-benzylé est mis en réaction avec un excès de bromoacétate d'éthyle pendant 2 jours à température ambiante dans le dichlorométhane en présence d'une base. Le cyclame tétra-substitué est ensuite traité sous courant d'hydrogène, en milieu THF/H<sub>2</sub>O avec comme catalyseur du palladium sur charbon afin de débenzyle (déprotéger) le macrocycle, selon la méthode de Goubert-Renaudin et coll. (17). La molécule de TE2A(Et)<sub>2</sub> ainsi obtenue est enfin alkylée par

un équivalent de bras AQ dans l'acétonitrile à reflux pour donner la TE2A(Et)2 NTP, qui après hydrolyse acide conduit au composé TE2A NTP (Schéma 8).

### E. Synthèse du chlorure de 3-(4,8,11-tris(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminium ou TE3A NTP (composé 28)

La stratégie de synthèse pour cette molécule est basée sur le même raisonnement que celui présenté au paragraphe précédent.

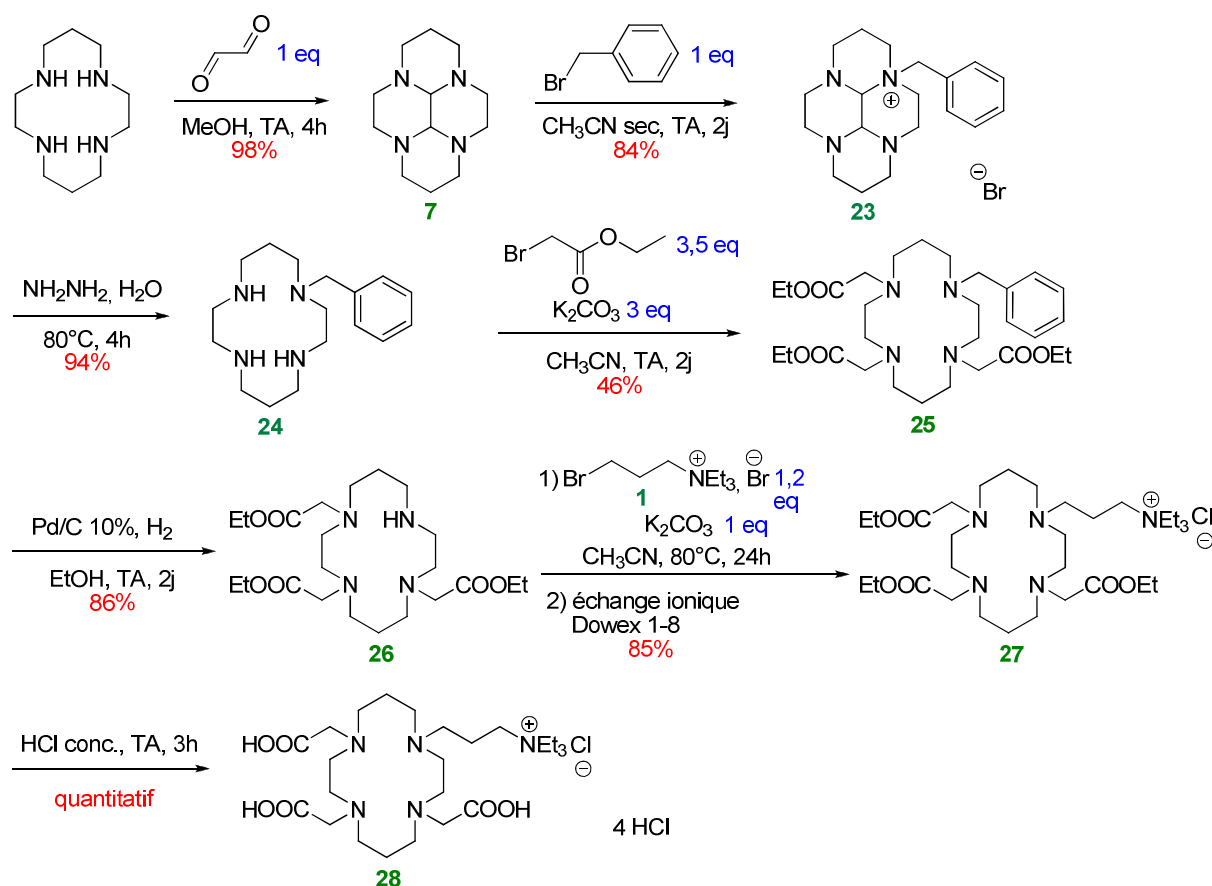


Schéma 9

Le cyclame est initialement protégé par le glyoxal, puis mono-alkylé par un équivalent de bromure de benzyle. Après hydrazinolyse du sel, l'intermédiaire mono-benzylé est mis à réagir avec un excès de bromoacétate d'éthyle en milieu acétonitrile basique pendant 2 jours, à température ambiante. Le groupement benzyle du cyclame tétra-substitué est

ensuite déprotégé par hydrogénolyse en milieu éthanolique catalysé par du palladium sur charbon. La molécule de TE3A(Et)3 ainsi obtenue est ensuite alkylée par un léger excès de composé **1** dans l'acétonitrile à reflux pour donner la TE3A(Et)3 NTP, qui après hydrolyse acide conduit à la TE3A NTP (Schéma 9).

### F. Synthèse du chlorure de 3-(1,5,8,12-tétraazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium ou SB 14-4 NTP (composé **31**)

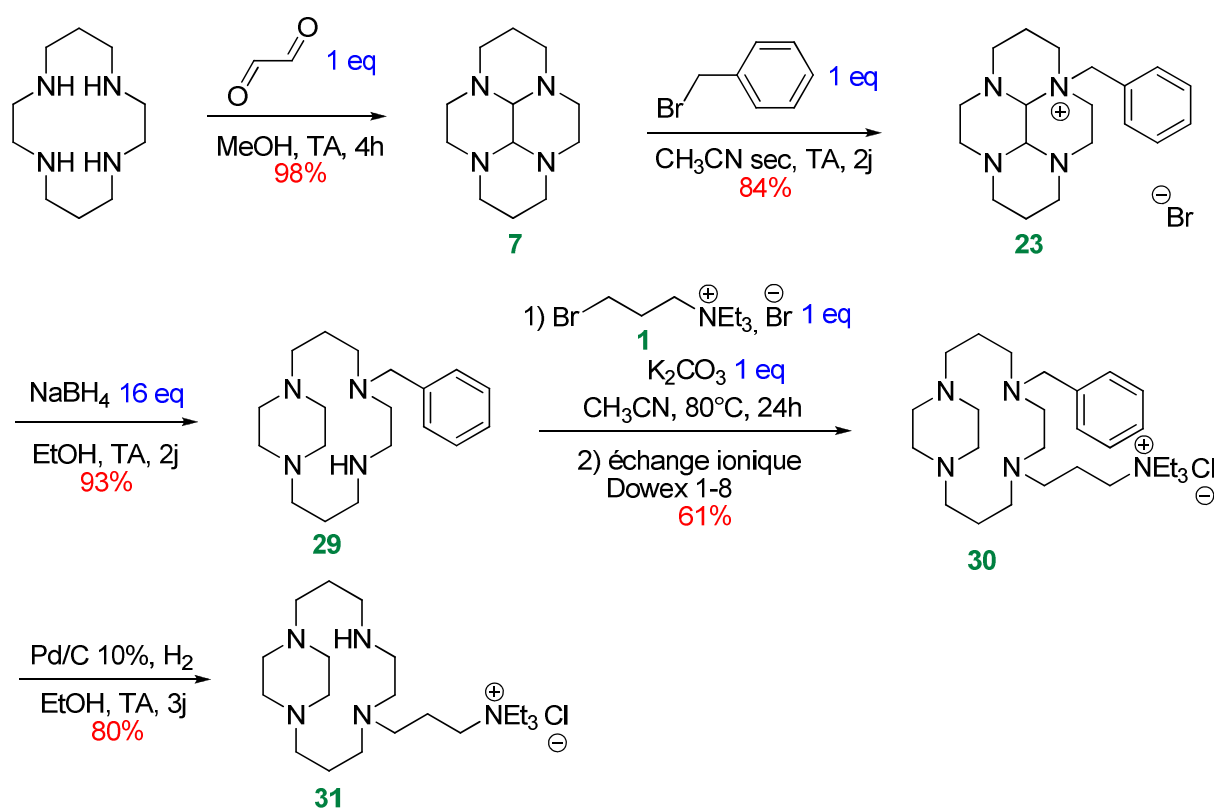


Schéma 10

Après la condensation du glyoxal sur le cyclame, le cycle est mono-alkylé par un équivalent de bromure de benzyle. Le sel intermédiaire **23** est alors traité en milieu réducteur pour cliver le pont glyoxal et obtenir le renforcement side. Un équivalent de composé **1** est alors mis à réagir sur l'intermédiaire **29** en milieu acétonitrile à reflux en présence d'une base minérale. Après traitement sur colonne chromatographique (alumine, dichlorométhane/méthanol, 90/10 v/v) du brut de réaction et passage sur résine échangeuse d'ions saturée en ions chlorure, le composé **30** est obtenue avec un rendement

de 61%. La dernière étape consiste à déprotéger le macrocycle par traitement sous courant d'hydrogène en milieu éthanolique avec comme catalyseur du palladium sur charbon, pour conduire à la SB 14-4 NTP (composé **31**) (Schéma 10).

### G. Synthèse du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(8-pyridin-2-ylméthyl)-1,5,8,12-tétraazabicyclo[10.2.2]hexadécane-5-yl)propan-1-aminium ou 1 PYR SB 14-4 NTP (composé **33**)

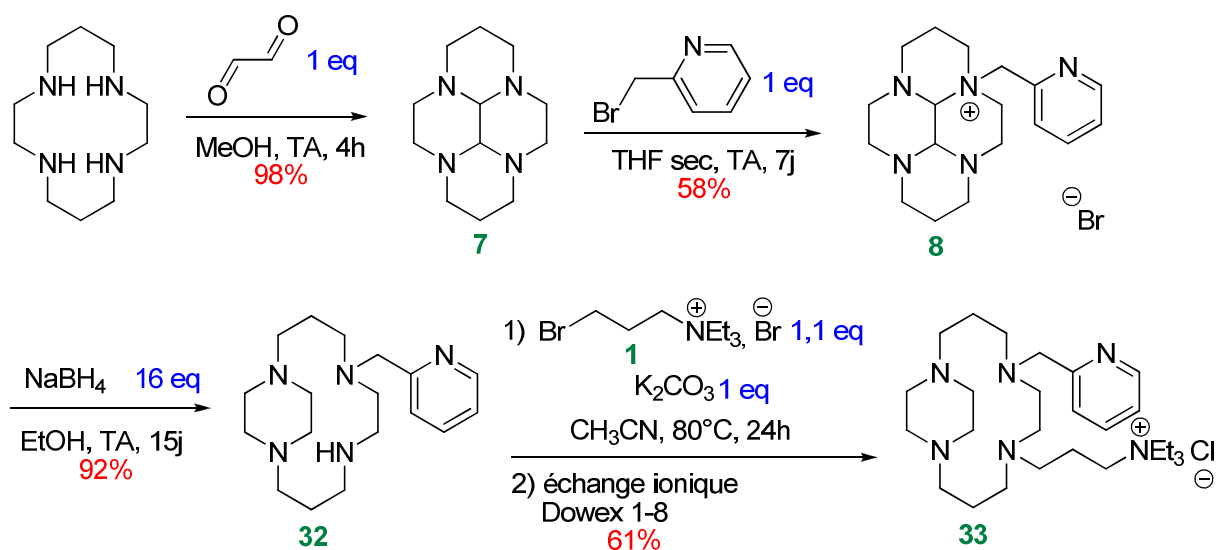


Schéma 11

Comme précédemment, le cyclame-glyoxal a été mono-substitué afin d'obtenir un renforcement side lors du clivage du pont éthylénique en milieu réducteur. Afin de renforcer la complexation du <sup>64</sup>Cu, un groupement 2-méthylpyridine est introduit au sein de la cage macrocyclique.

L'intermédiaire mono-alkylé par un groupement 2-méthylpyridine a été obtenu de la même façon que pour la molécule de 1 PYR 14-4 NTP. Ainsi, la synthèse a consisté en i) condensation du glyoxal sur le cyclame, ii) mono-substitution par le groupement 2-méthylpyridine. Le clivage du pont glyoxal a été réalisé par le NaBH<sub>4</sub> en large excès, en milieu éthanolique. La réaction s'est déroulée à température ambiante pendant 15 jours. L'intermédiaire **32** side substitué est ensuite mis en réaction avec un léger excès du composé **1** en milieu acétonitrile à reflux en présence d'une base minérale. Après purification par

chromatographie du brut de réaction et passage sur résine échangeuse d'ions saturée en ions chlorure, la 1 PYR SB 14-4 NTP est obtenu avec un rendement de 61% (Schéma 11).

## H. Synthèse du chlorure de 3-(8-(carboxyméthyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium ou SB TE1A NTP (composé 37)

La stratégie de synthèse s'est calquée sur celle présentée précédemment, avec l'introduction d'un groupement acétate de *tert*-butyle sur l'intermédiaire bis-aminal pour orienter la formation d'un renforcement side sur la molécule de cyclame.

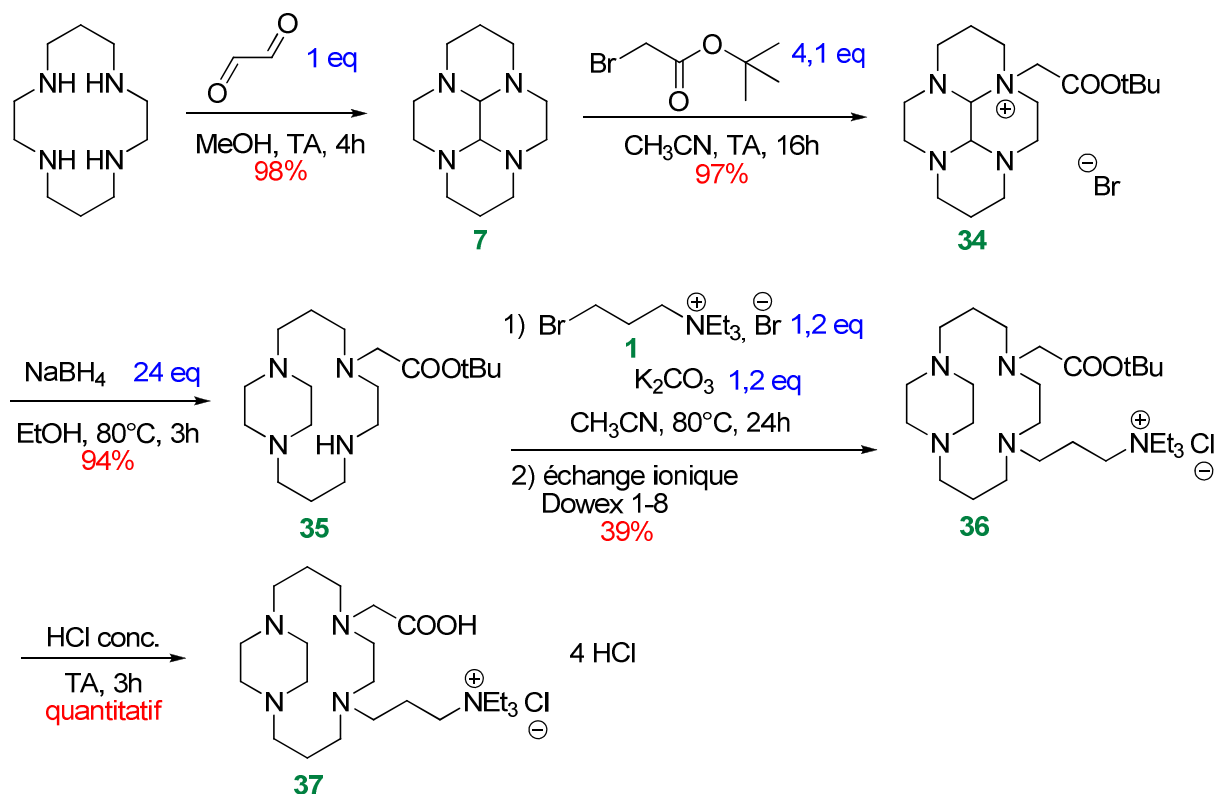


Schéma 12

Après clivage du pont éthylénique en milieu réducteur, le composé 35 possédant un renforcement side est mis à réagir avec un léger excès de bras AQ. Après traitement sur colonne chromatographique et passage sur résine échangeuse d'ions saturée en ions chlorure, le composé 36 est obtenu avec un rendement de 39%. L'hydrolyse en milieu acide du groupement ester de ce composé conduit à son équivalent acide (composé 37) (Schéma 12).

### III. CBFs dérivés du cyclène

#### A. Synthèse du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1-yl)propan-1-aminium ou 12-4 NTP (composé 41)

La 12-4 NTP a été synthétisée en suivant la même voie de protection que lors de la synthèse de la 14-4 NTP (Schéma 4).

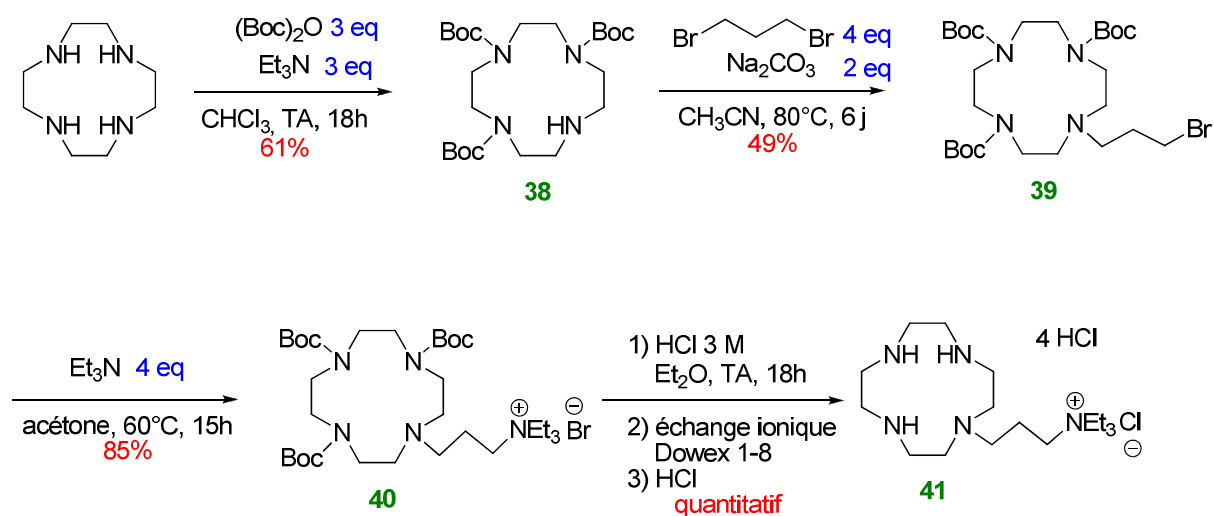


Schéma 13

Ainsi trois des amines secondaires du cyclène de départ ont été protégées par la fonction Boc. Cependant, la fonction AQ n'a pas été directement couplée sur l'amine restante mais générée après greffage d'une fonction bromopropyle sur le composé **38**. En effet, le greffage direct de cette fonction sur le composé **38** présente une cinétique extrêmement lente. Le même protocole de déprotection des groupements Boc que pour la 14-4 NTP a été suivi pour obtenir la 12-4 NTP (composé **41**) sous sa forme chlorhydrate (Schéma 13).

## B. Synthèse du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(7-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1-yl)propan-1-aminium ou 1 PYR 12-4 NTP (composé 45)

La stratégie de synthèse suivie a été la même que pour la 1 PYR 14-4 NTP (composé 10).

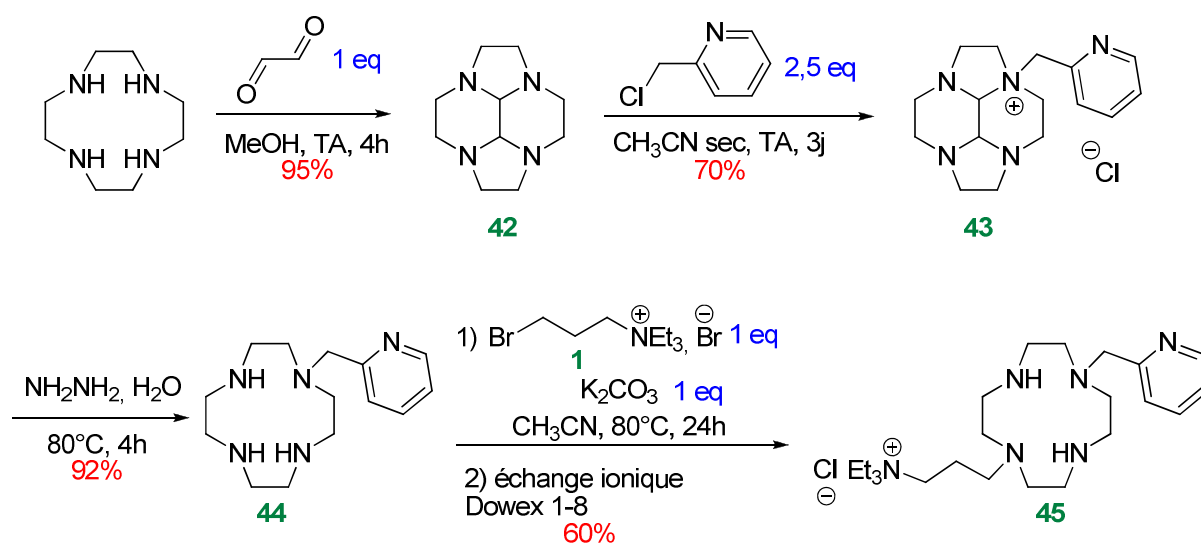


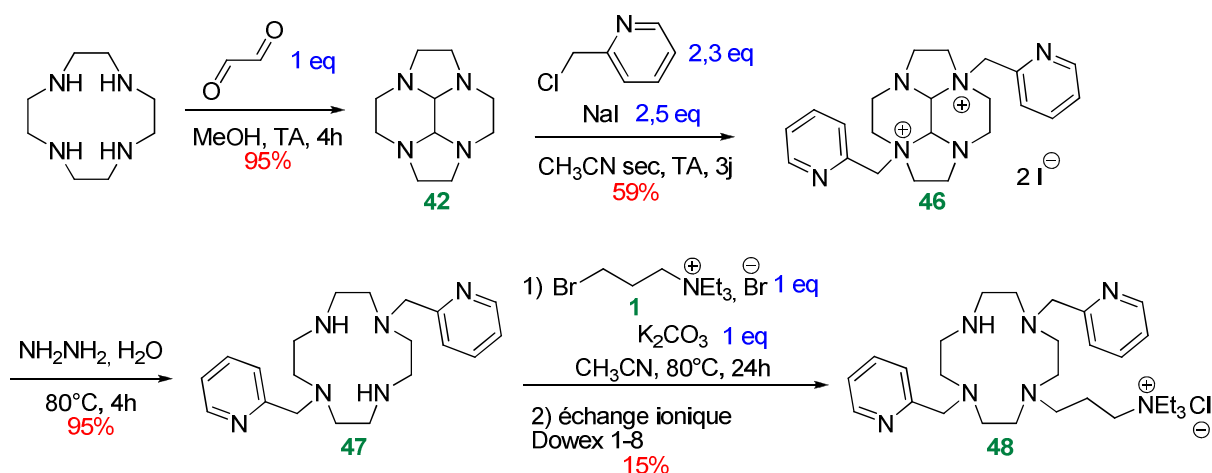
Schéma 14

Un excès d'agent alkylant chloré est mis en réaction avec le cyclène-glyoxal en milieu acétonitrile anhydre et sous atmosphère inerte. Le mono-sel formé est isolé par filtration au bout de 3 jours. La déprotection du pont éthylénique s'est faite par hydrazinolyse, et le composé 44 a ensuite été mis en réaction avec un équivalent de composé 1 dans l'acétonitrile à reflux en présence d'une base minérale. La 1 PYR 12-4 NTP (composé 45) est ensuite obtenue après purification sur colonne chromatographique et passage sur résine échangeuse d'ion saturée en chlorure avec un rendement de 60% (Schéma 14).

Dans un premier temps, la synthèse permettant l'obtention du composé 43 a été réalisée en employant un seul équivalent de 2-chlorométhylpyridine. Après 7 jours de réaction en milieu acétonitrile anhydre, à température ambiante et sous atmosphère inerte, la réaction présentait un rendement de 45%. Pour optimiser ce dernier, nous avons augmenté le nombre d'équivalent, la quantité optimale conduisant à un rendement de 70% semble être proche de 2,5 équivalents de 2-chlorométhylpyridine. Aucune di-substitution n'a été observée dans ces conditions.



**C. Synthèse du chlorure de 3-(4,10-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium ou 2 PYR 12-4 NTP (composé 48)**

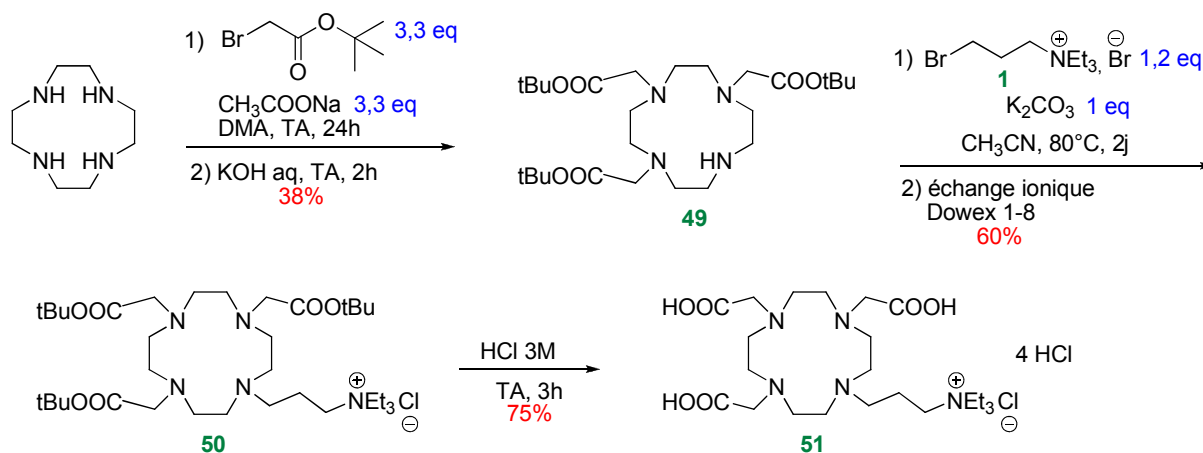


**Schéma 15**

Comme vu dans la synthèse précédente, un large excès de 2-chlorométhylpyridine conduit uniquement à la mono-substitution du cyclène-glyoxal.

Aussi après la protection du cyclène par le glyoxal, l'intermédiaire bis-aminal obtenu est di-*N*-substitué par un faible excès de 2-chlorométhylpyridine, préalablement traité par l'iodure de sodium dans l'acétone anhydre. Cette méthode, décrite par El Hajj et coll. (18), permet de remplacer l'atome de chlore du bras alkylant par un atome d'iode. L'intérêt de cette substitution réside dans le fait que l'atome d'iode est plus polarisable que le chlore, il est donc un meilleur nucléofuge. La 2 PYR 12-4 est obtenue après hydrazinolyse des sels di-substitués, préalablement isolés par filtration du milieu réactionnel. Le composé **47** est ensuite mis en réaction avec un équivalent de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropan-aminium (composé **1**) dans l'acétonitrile à reflux en présence d'une base minérale. Après traitement sur colonne chromatographique et passage sur résine échangeuse d'ions saturée en ions chlorure, la 2 PYR 12-4 NTP (composé **48**) est obtenue avec un rendement de 15% (Schéma 15).

**D. Synthèse du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminium ou DO3A NTP (composé 51)**



**Schéma 16**

La synthèse du composé 49 n'a pas fait l'objet d'une protection préalable d'une des amines secondaires de la cage comme dans la synthèse de la TE3A(Et)3 (composé 26). En effet, celle-ci a été réalisée suivant le protocole décrit par Jagadish et coll. (19), permettant en une seule étape de substituer préférentiellement 3 amines de la cage par un groupement acétate de *tert*-butyle. Dans ces conditions opératoires, le composé tétra-substitué n'est pas observé.

Ainsi, un léger excès de bromoacétate de *tert*-butyle est mis à réagir sur le cyclène à -10°C, dans le DMA en présence d'acétate de sodium. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est agité pendant 24 heures, puis traité en milieu basique pour conduire au composé 49. Ce dernier est ensuite mis en réaction avec un léger excès de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (composé 1), dans l'acétonitrile à reflux et en présence d'une base minérale. Après purification sur colonne chromatographique (RP C18,  $\text{CH}_3\text{CN}$  à 20 mmol HFBA/ $\text{H}_2\text{O}$ , 20/80 puis 50/50, v/v) et passage sur résine échangeuse d'ion saturée en ions chlorure, le composé 50 est obtenu avec un rendement de 60%. Malgré les conditions chromatographiques, l'hydrolyse des fonctions ester n'est pas observée. La dernière étape consiste alors en un traitement en milieu acide du composé 50 pour conduire à la DO3A NTP sous sa forme chlorhydrate avec un rendement de 75% (Schéma 16).

### E. Synthèse du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tribenzyl-1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1-yl)propan-1-aminium ou 3 Bz 12-4 NTP (composé 53)

Les fonctions benzyles ne permettent pas de compléter la sphère de coordination du métal au sein de la cage macrocyclique, celles-ci étant dépourvues d'hétéroatomes mais elles augmentent le caractère hydrophobe du CBF.

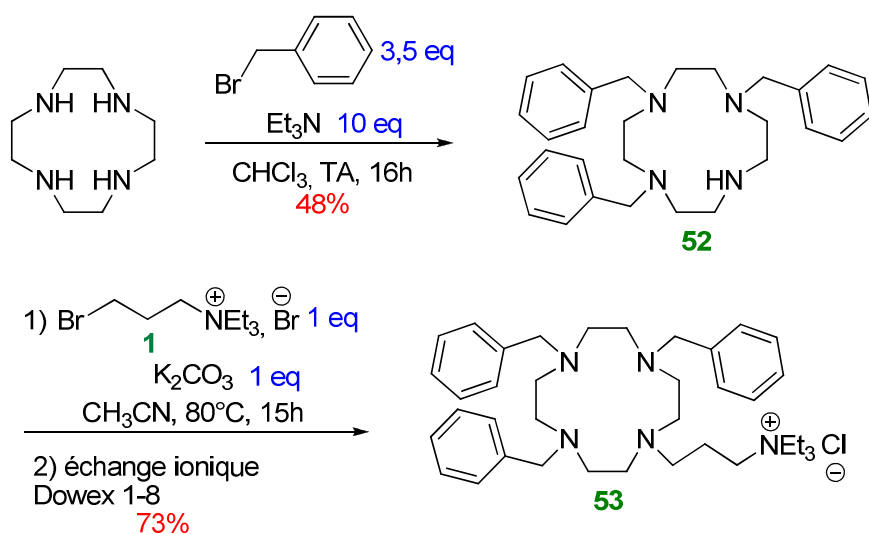


Schéma 17

Un léger excès de bromure de benzyle est mis à réagir sur le cyclène dans le chloroforme, en présence de triéthylamine. La formation du cyclène tétra-benzylé est systématiquement observée même en diminuant la quantité de réactif mis en œuvre, conduisant à un rendement médiocre après purification sur colonne pour le composé tri-benzylé (composé 52). Ce dernier est ensuite mis en réaction avec un équivalent de composé 1 dans l'acétonitrile à reflux et en présence d'une base minérale. Après purification sur colonne chromatographique (alumine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 98/2 puis 95/5, v/v) et passage sur résine échangeuse d'ions saturée en ion chlorure, le composé 53 est obtenu avec un rendement de 73% (Schéma 17).

## IV. CBFs dérivés de la 15-5

### A. Synthèse du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécan-1-yl)propan-1-aminium ou 15-5 NTP (composé 59)

La synthèse de la polyamine cyclique consiste à coupler deux fragments linéaires aminés préalablement protégés par la fonction tosylo selon la méthode de Richman et Atkins (20). Une fois la cage macrocyclique 15-5 formée, les amines sont déprotégées par traitement dans l'acide sulfurique à chaud. La cage est alors couplée au bras AQ (schéma 18).

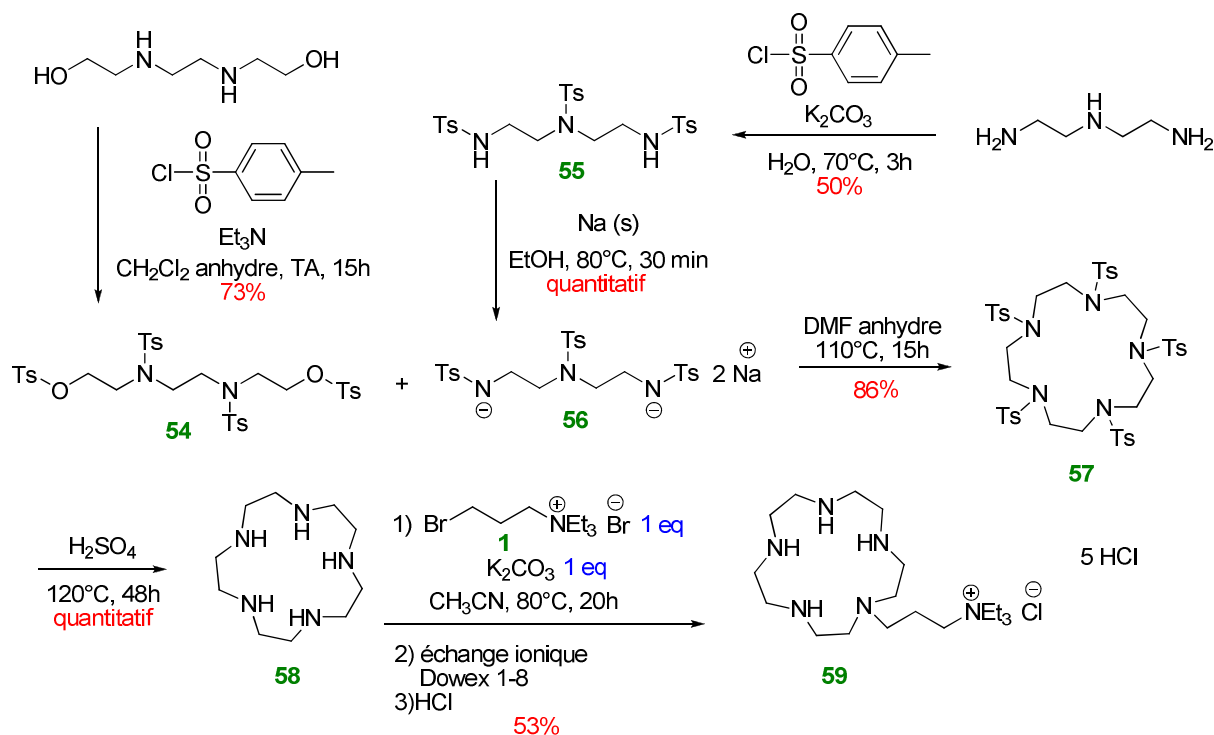


Schéma 18

La structure macrocyclique tosylée 57 obtenue est purifiée par extraction au soxhlet, ce qui permet d'éliminer les polymères linéaires de plus haut poids moléculaires que le composé 57.

La purification du composé 59 a été effectuée sur colonne de phase inverse (silica gel 90 C18) éluée avec un mélange de solvant acétonitrile 20 mM HFBA/eau ultra pure 20 mM

HFBA. Le premier gradient de solvant (20/80, v/v) permet d'éluer le produit d'élimination provenant du bras AQ. Une seconde élution, de gradient 30/70 (v/v) permet d'éluer le composé **59** désiré.

## B. Synthèse du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10,13-tétrakis(carboxyméthyl)-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécan-1-yl)propan-1-aminium ou 4A 15-5 NTP (composé **61**)

Le composé **62** a été obtenu en deux étapes à partir de la 15-5 NTP (composé **60**) présenté ci-dessus (Schéma 19).

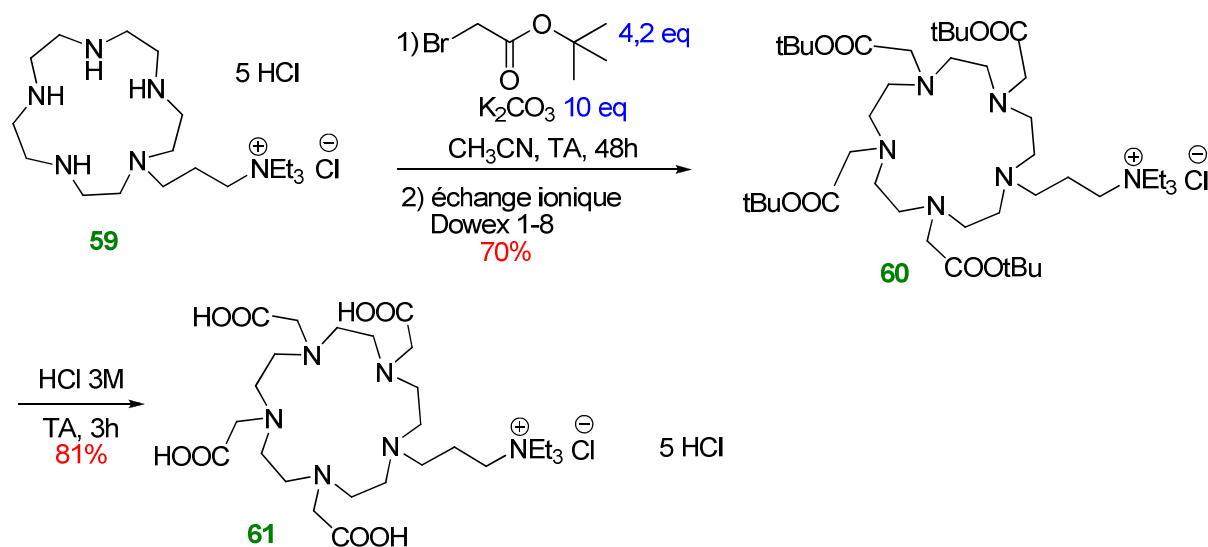


Schéma 19

Une solution d'un léger excès de bromoacétate de *tert*-butyle est mise à réagir sur la 15-5 NTP dans l'acétonitrile anhydre, à température ambiante pendant 2 jours, et en présence d'une base minérale. Après un traitement sur colonne chromatographique (alumine, dichlorométhane/méthanol, 99/1, v/v) du brut réactionnel, ainsi que le passage sur une résine échangeuse d'ions saturée en ions chlorure, le composé **60** est obtenu avec un rendement de 70%. La dernière étape consiste en une hydrolyse acide des groupements ester pour donner la 4A 15-5 NTP sous sa forme chlorhydrate avec un rendement de 81%.

## V. Conclusion

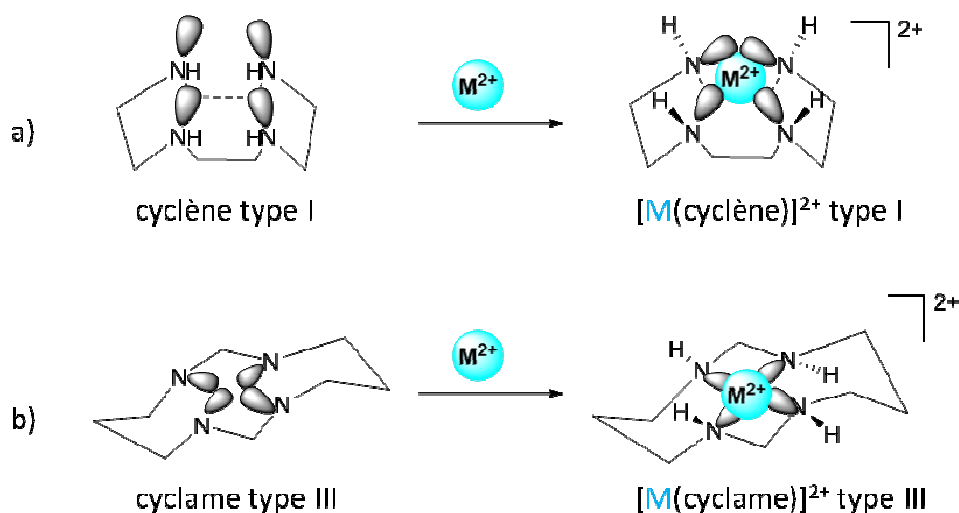
Des difficultés sont apparues lors de la purification des composés dès lors qu'ils étaient fonctionnalisés par le bras « vecteur ». Ce dernier constitué d'une chaîne alkyle porteuse d'une fonction ammonium quaternaire possède un caractère hydrophile marqué. L'introduction de cette fonction « vectrice » sur le macrocycle complique la purification de la molécule obtenue, les phases stationnaires utilisées en routine au laboratoire (i.e. silice ou alumine) étant peu adaptées à ce type de composés. Dans certains cas, les séparations ont été réalisées avec succès sur phases « classiques », dans d'autres nous avons du recourir à une phase inverse greffée C18. Nous avons alors du mettre au point des conditions d'élution qui permettent de purifier efficacement nos produits sur cette phase. Une fois ces conditions optimisées, d'autres problèmes se sont présentés, à savoir :

- une saturation rapide de la colonne C18 qui nous oblige à travailler avec des quantités de produit brut n'excédant pas 500 mg.
- des séparations délicates entre le produit désiré et les produits secondaires porteurs d'une ou plusieurs fonctions AQ (sous-produits obtenus lors de la synthèse du composé **1**, produits secondaires résultants du greffage de plusieurs bras NTP sur le même polyazamacrocycle...).
- le coût élevé de ce type de phase impliquant un reconditionnement de la colonne après utilisation, processus répétitif et chronophage (lavage, rinçage, reconditionnement).

Cette technique a été mise au point après que des études préliminaires de radiomarquage et de biodistribution aient été réalisées. L'utilisation de ces nouvelles conditions de purification permettra d'optimiser les résultats déjà obtenus.

Les tâches révélées après élution de nos composés finaux sur plaque CCM étaient très souvent un chevauchement des tâches des différents composés présents dans le milieu réactionnel. Le suivi cinétique par CCM du milieu réactionnel lors de l'étape de fonctionnalisation par le groupement porteur de la fonction « vectrice » s'est avéré délicat. Nous avons donc choisis des temps de réaction assez longs afin de s'assurer que la réaction soit la plus complète possible et permettre ainsi un rendement optimisé.

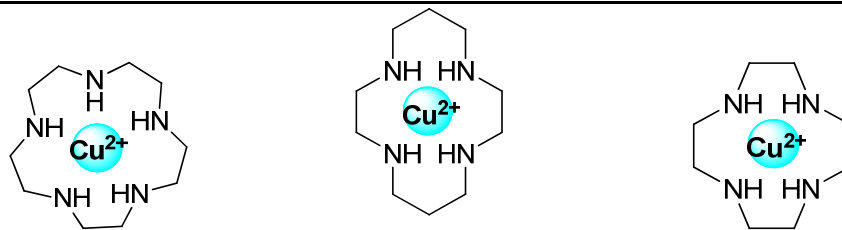
Lors de la complexation par un cation métallique, la cage macrocyclique va adopter une configuration préférentielle pour avoir une stabilité maximum. Pour le cyclène et le cyclame, la nomenclature développée par Bosnich et *coll.* (21) présente ces deux cages dans une configuration de type I et de type III, respectivement (Figure 30).



**Figure 30 : Comparaison des modes de coordinations du a) cyclène type I et b) cyclame type III (22)**

On peut voir ici que dans le cas du cyclène, le cation métallique sera complexé par les doublets non liants des azotes en dehors du plan moyen de la cage macrocyclique. Dans le cas du cyclame, le cation métallique se trouve à l'intérieur du plan moyen de la cage. Ainsi, une plus grande stabilité pour le complexe Cu-cyclame comparativement au complexe Cu-cyclène est attendue (22).

La complexation du cuivre-64 par un macrocycle va être fonction de la taille mais également de la flexibilité de la cavité macrocyclique. La taille de cette cavité augmente selon la séquence : cyclène, cyclame, 15-5. Les constantes de formation des complexes correspondants avec le cation métallique  $\text{Cu}^{2+}$  (23) présentent une préférence pour la couronne 15-5 (Tableau 6).



<b>Couronne</b>	<b>15-5</b>	<b>14-4</b>	<b>12-4</b>
<b>pK<sub>f</sub> (24)</b>	28,3	27,2	24,8

**Tableau 6 : Valeurs des constantes de formation des chélates 15-5, 14-4 et 12-4**

L'introduction sur une des amines secondaires de ces cages de la chaîne alkyle porteuse de la fonction ammonium quaternaire va conduire à une baisse du caractère  $\sigma$ -donneurs de cette amine. En effet, le pouvoir  $\sigma$ -donneurs d'une amine secondaire est supérieur à celui d'une amine tertiaire. Ainsi, afin de palier à cette perte, l'introduction sur les autres amines secondaires de la cage d'un ou plusieurs groupements possédant un atome susceptible de participer à la complexation du cuivre a été réalisé.

Ainsi, une nouvelle gamme de chélatants bi-fonctionnels *N*-fonctionnalisés a été synthétisée pour la complexation du  $^{64}\text{Cu}$  en vue de l'imagerie TEP du cartilage. Ces ligands ont en commun une fonction de type ammonium quaternaire permettant la vectorisation vers les PGs du cartilage, et ils diffèrent par la taille de la cage macrocyclique, par la nature de leur bras coordinants ainsi que par la présence de renforcement. Le radiomarquage au cuivre-64 des CBFs mis au point dans cette partie est présenté dans le chapitre 3.





1. **Weisman, G. R., Ho, S. C. H, Johnson, V.** Tetracyclic tetraamines by glyoxal-macrocyclic tetraamine condensation. *Tetrahedron Letters*. 1980, Vol. 21, 4, pp. 335-338.
2. **Bailly, T. et al.** Synthesis of a new tricyclic ring system : 1,4,8,11-tetraazatricyclo(9.3.1.14,8)hexadecane obtained by the reaction of tetramethyldiaminomethane with 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane (cyclam). *Académie des Sciences. serie IIB*, 1996, Vol. 322, 2, pp. 151-154.
3. **Bernhard, C.** *Synthèse d'agents chélatants bifonctionnels macrocycliques pour le marquage de molécules biologiques par des métaux : application en imagerie médicale.* Université de Bourgogne, ICMUB : s.n., 2011.
4. **El Ghachtouli, S. et al.** (Cyclen- and cyclam-pyridine)copper complexes: the role of the pyridine moiety in CuI and CuI stabilization. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2006, Vol. 17, pp. 3472-3481.
5. **Zeglis, B, Lewis, J. S.** A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography. *Dalton Transactions*. 2011, Vol. 40, 23, pp. 6168-6195.
6. **Guérin, B. et al.** Total solid-phase synthesis of NOTA-functionalized peptides for PET imaging. *Organic Letters*. 2010, Vol. 12, 2, pp. 280-283.
7. **Anderson, C. J, Welch, M. J.** Radiometal-labeled agents (non technetium) for diagnostic imaging. *Chemical Reviews*. 1999, Vol. 99, pp. 2219-2234.
8. **Wong, E. H. et al.** Synthesis and characterization of cross-bridged cyclams and pendant-armed derivatives and structural studies of their copper(II) complexes. *Journal of American Chemistry Society*. 2000, Vol. 122, pp. 10561-10572.
9. **Weisman, G. R. et al.** Cross-bridged cyclam, Protonation and Li<sup>+</sup> complexation in a diamond-lattice cleft. *Journal of the American Chemical Society*. 1990, Vol. 112, 23, pp. 8604-8605.
10. **Weisman, G. R. et al.** Synthesis and transition-metal complexes of new cross-bridged tetraamine ligands. *Chemical Communication*. 1996, Vol. 8, pp. 947-948.
11. **Boswell, C. A. et al.** Comparative in vivo stability of copper-64-labeled cross-bridged and conventional tetraazamacrocyclic complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004, Vol. 47, 6, pp. 1465-1474.
12. **Fabbrizzi, L. et al.** Light-emitting molecular machines : pH-induced intramolecular motions in a fluorescent nickel (II) scorpionate complex. *Chemistry - A European Journal*. 2002, Vol. 8, 21, pp. 4965-4972.
13. **Le Baccon, M. et al.** Bis-aminal : efficient tools for bis-macrocycle synthesis. *New Journal of Chemistry*. 2001, Vol. 25, pp. 1168-1174.
14. **Develay, S. et al.** A new versatile synthesis of macrotricyclic tetraazacycloalkane-based ligands from bis-aminal derivatives. *European Journal of Organic Chemistry*. 2003, Vol. 16, pp. 3047-3050.

15. **Royal, G. et al.** New synthesis of trans-disubstituted cyclam macrocycles - Elucidation of the disubstitution mechanism on the basis of X-ray data and molecular modeling. *European Journal of Organic Chemistry*. 1998, pp. 1971-1975.
16. **Helps, I. M. et al.** General routes for the synthesis of mono, di and tri-N-substituted derivatives of cyclam. *Tetrahedron*. 1989, Vol. 45, 1, pp. 219-226.
17. **Goubert-Renaudin, S. et al.** Voltammetric detection of lead(II) using amide-cyclam-functionalized silica-modified carbon paste electrodes. *Electroanalysis*. 2009, Vol. 21, 15, pp. 1731-1742.
18. **El Hajj, F. et al.** Macrocycle-based spin-crossover materials. *Inorganic Chemistry*. 2009, Vol. 48, pp. 10416-10423.
19. **Jagdish, B. et al.** On the synthesis of 1,4,7-tris(tert-butoxycarbonylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane. *Tetrahedron Letters*. 52, 2011, pp. 2058-2061.
20. **Richman, J. E, Atkins, T. J.** Nitrogen analogs of crown ethers. *Journal of American Chemical Society*. 1974, Vol. 96, 7, p. 2268.
21. **Bosnich, B., Poon, C. K, Tobe, M. L.** Complexes of cobalt(III) with a cyclic tetradentate secondary amine. *Inorganic Chemistry*. 1965, Vol. 4, 8, pp. 1102-1108.
22. **Hancock, R. D. et al.** Ligand design for complexation in aqueous solution. 2. Chelate ring size as a basis for control of size-based selectivity for metal ions. *Inorganic Chemistry*. 1990, Vol. 29, pp. 1968-1974.
23. **El Ghachtouli, S.** *Caractérisation, étude thermodynamique et structurales de complexes tétraazamacrocycliques porteurs de groupements pyridine ou pyrazine.* Université de Reims Champagne-Ardenne : s.n., 2007.

# Chapitre 3

Radiomarquages  $^{64}\text{Cu}$



Les CBFs synthétisés dans le chapitre précédent ont été marqués au  $^{64}\text{Cu}$ . Le mode de production du radionucléide, les conditions de marquage et les rendements radiochimiques associés sont présentés dans ce chapitre.

## I. La production du $^{64}\text{Cu}$

Le  $^{64}\text{Cu}$  est produit grâce à un cyclotron selon la réaction nucléaire suivante :  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ , avec  $^{64}\text{Ni}$  l'élément cible, p (proton) la particule incidente, n (neutron) la particule émise et  $^{64}\text{Cu}$  l'élément produit (1).

Le  $^{64}\text{Ni}$ , enrichi à 99,6%, est électrodéposé sur une plaque en or (2). Après l'irradiation, la couche électrodéposée est dissoute dans une solution d'acide nitrique 2 M chauffée à 90°C. Après évaporation à sec, le résidu est repris dans une solution d'acide chlorhydrique 10 M puis élué sur une colonne échangeuse d'anions. Les contaminants de l'irradiation, isotopes du nickel et du cobalt, ne sont pas retenus sur la colonne. Après plusieurs lavages avec une solution d'acide chlorhydrique 10 M puis un mélange d'acide chlorhydrique 0,3 M/éthanol (28/72, v/v), la colonne est rincée avec de l'eau distillée pour éluer le  $^{64}\text{Cu}$ . Les fractions d'intérêt sont évaporées et le radionucléide est repris dans une solution d'acide chlorhydrique 0,1 M, le radionucléide est alors sous la forme de chlorure de cuivre  $^{64}\text{CuCl}_2$ . La pureté radio-nucléidique, correspondant au pourcentage de  $^{64}\text{Cu}$  dans la solution par rapport à l'ensemble des radionucléides présents dans cette même solution, est mesurée par un détecteur Germanium hyper pur, la pureté atteinte est supérieure à 99% (1).

Le cuivre-64 se désintègre en deux éléments stables, le nickel-64 et le zinc-64 (Figure 30). Ces deux éléments présentent des toxicités différentes pour l'organisme : le nickel est un métal toxique et potentiellement cancérigène (3) alors que le zinc est un oligo-élément indispensable à l'organisme humain à faible dose (4).

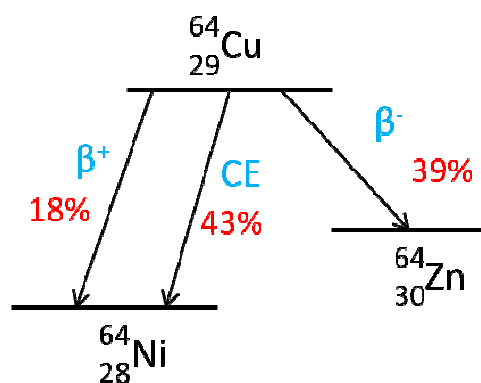


Figure 31 : Schéma de désintégration du cuivre-64 (5)

La solution de cuivre-64 présente également divers contaminants, dont les deux principaux sont le  $^{61}\text{Co}$  ( $T_{1/2} = 1,65$  heures), coproduit lors de l'irradiation *via* la réaction  $^{64}\text{Ni}(p,\alpha)^{61}\text{Co}$ , et le  $^{64}\text{Ni}$  provenant de la cible. Malgré une purification de la solution de cuivre-64, ces deux éléments peuvent être présents à l'état de traces. Bien qu'en très faible concentration dans la solution de  $^{64}\text{Cu}$ , ces éléments peuvent influencer défavorablement lors de la complexation du ligand. La sélectivité pour le cuivre vis-à-vis des autres métaux conditionnera donc le rendement de marquage.

## II. Le radiomarquage des CBFs au $^{64}\text{Cu}$

La solution de cuivre-64 est réceptionnée à l'unité avec une activité commandée d'environ 400 MBq pour un volume total oscillant entre 200 et 350  $\mu\text{L}$ .

Avant d'envisager la préparation des lots de CBFs radiomarqués qui serviront à étudier la biodistribution chez l'animal (rat), il est indispensable de déterminer au préalable les conditions optimales pour effectuer ces radiomarquages. Ces conditions doivent être mises au point pour chacun des CBFs synthétisés. Ces tests sont indispensables, en particulier pour s'assurer de la pureté radiochimique du complexe formé afin que la solution injectée à l'animal ne contienne pas de radioisotope libre (i.e.  $^{64}\text{CuCl}_2$ ).

## A. Méthode

### 1. Radiomarquage

Le protocole suivi pour le radiomarquage des molécules est le suivant :

- une solution de ligand à une concentration de  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  est préparée pour chaque CBFs dans un tampon de citrate de sodium à  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  à  $\text{pH} = 6,0$ . Un volume, déterminé par la suite pour chaque chélateur, est introduit dans un flacon.
- un volume du tampon de citrate de sodium est ajouté, volume qui varie selon la quantité de la solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  HCl ajoutée. Le volume maximum pouvant être injecté à l'animal (environ 0,5 mL pour un rat de 300 g par voie intraveineuse en injection flash) doit également être pris en compte, une évaporation partielle de la solution contenant le radiotraceur est plus délicate à réaliser que sa dilution avec du sérum physiologique.

L'utilisation de cette solution tampon se justifie par la nécessité d'ajuster le pH pour qu'il reste autour d'une valeur de moyenne théorique de 6. En effet, cette précaution permet d'un côté d'assurer une compatibilité biologique concernant le pH de la solution à injecter à l'animal, mais également de se mettre dans les meilleures conditions pour la complexation des CBFs. En effet, Le pH de cette solution tampon permet d'éviter d'une part un environnement trop acide qui résulterait en une protonation des azotes des CBFs, ou à l'inverse la formation d'un précipité d'hydroxyde de cuivre qui apparaîtrait lors de l'augmentation du pH.

- ajout de la solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$ . La mise au point du radiomarquage s'est faite avec 2 ou 5  $\mu\text{L}$ . Le volume pour le lot destiné à la biologie était dépendant de la quantité de radioactivité nécessaire pour chaque expérience (imagerie et/ou étude de biodistribution).
- incubation du flacon : la température et la durée d'incubation ont été ajustées pour chaque ligand.



## 2. Contrôle

Les conditions de contrôle du rendement de complexation du radionucléide par nos chélateurs ont été calquées sur le protocole mis en place et utilisé à l'unité pour le radiomarquage du radiotracer  $^{99m}\text{Tc}$ -15-5 NTP. Celles-ci se sont révélées efficaces pour nos CBFs.

Un suivi de la complexation a été réalisé par chromatographie sur couche mince (CCM). Le support utilisé est de la fibre de verre sur laquelle a été déposée un gel de silice (Instant Thin-Layer Chromatography-silica gel ou ITLC) et l'éluant un mélange méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v). Après élution, les plaques sont ensuite comptées à l'aide d'un radio-imageur Ambis 400. Nous avons ainsi pu apprécier la cinétique et le rendement de nos radiomarquages.

Lors de ces suivis, le volume de solution déposé sur la plaque était de 1  $\mu\text{L}$  ou 2  $\mu\text{L}$ .

La solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$  0,1 mol.L<sup>-1</sup> HCl a été déposée sur un support ITLC et éluee avec le même éluant que précédemment afin de déterminer le rapport frontal (Rf) du radionucléide non complexé par nos CBFs. Dans ces conditions, le Rf observé est proche de 1. La présence d'une tâche de radioactivité au front de solvant nous indiquera, par la suite, la présence ou non du radionucléide seul.

De plus, un résidu de radioactivité a été observé au point de dépôt. L'origine de cette radioactivité n'a pas été déterminée.

Des essais de radiomarquages ont été réalisés sur chaque CBFs afin de déterminer les meilleures conditions pour la complexation du cuivre-64. Ces conditions ont été reconduites pour la préparation de la solution de radiotracer injectée aux animaux. Cependant, les contraintes inhérentes à l'utilisation du cuivre-64 (temps de demi-vie, livraison...) nous ont contraints à restreindre nos essais pour nous focaliser sur la préparation des lots injectables aux animaux afin de respecter le protocole expérimental des biologistes, conjuguant l'injection, l'acquisition des images sur les différents rats aux deux temps d'imagerie choisies ainsi que les études de biodistribution.

## B. $^{64}\text{Cu}$ -CBFs dérivés du cyclame

La concentration de cuivre-64 dans la solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$  ne pouvant pas être déterminée avec précision, la solution de ligand a toujours été introduite en très large excès afin d'optimiser la complexation du cuivre-64 par les CBFs et éviter la présence du radionucléide libre.

### 1. Chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou $^{64}\text{Cu}$ -14-4 NTP (composé 62)

Les résultats du radiomarquage du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)propan-1-aminium (composé 6) sont présentés dans le tableau 7.

	Conditions optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 $\mu\text{L}$ (0,1 $\mu\text{mol}$ )	20 $\mu\text{L}$ (0,1 $\mu\text{mol}$ )
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
<b><math>^{64}\text{CuCl}_2</math></b>	2 $\mu\text{L}$	67 $\mu\text{L}$
<b>Incubation (température/durée)</b>	25°C/15 min	25°C/15 min
<b>Activité</b>	2,5 MBq	57 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé 62</b>	93,5%	92,5%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,32	

**Tableau 7 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 62**

Cette complexation est rapide et efficace puisqu'aucune tâche de radioactivité correspondant au cuivre-64 non complexé n'a été constatée. Cependant des composés radioactifs (1%) ont été visualisés au point de dépôt ainsi qu'une tâche avec un Rf de 0,84 (6,5%) sur chaque CCM.

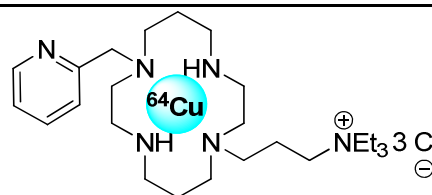
Le marquage du cyclame seul, effectué dans les mêmes conditions, révèle un taux de complexation de 99,9% du chélateur pour le cuivre-64 avec un Rf calculé à 0,82. La pollution présente dans les CCM du composé **62** a donc été identifiée comme étant le cyclame. La présence de ce dernier s'explique par le fait que la 14-4 NTP marquée a été synthétisée en suivant la première voie de synthèse (voir chapitre 2). La quantité de cette pollution ayant été jugée faible, nous avons fait le choix d'injecter cette préparation aux animaux. Ce composé présentant par la suite de bon résultat de biodistribution, la synthèse de la 14-4 NTP suivant la 2<sup>ème</sup> voie de synthèse a été réalisée plus tard dans la thèse. Cependant, le radiomarquage n'a pu être réalisé par manque de temps.

Les résidus de radioactivités au point de dépôt proviennent de la solution de cuivre-64, mais peuvent également être expliqués par la présence de complexes d'hydroxyde de cuivre-64.

Les conditions de radiomarquage peuvent ici être qualifiées de douces, à savoir une température proche de l'ambiante, ce qui évite l'utilisation de températures élevées pouvant résulter en une dégradation du CBF, mais également un temps d'incubation court. Un temps de radiomarquage court va permettre de minimiser la quantité de cuivre-64 utilisée. Ceci a deux avantages, tout d'abord une quantité de cuivre injecté au patient plus faible et ensuite une économie financière sur les commandes de cuivre-64.

## **2. Chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(8-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-1 PYR 14-4 NTP (composé 63)**

Les résultats du radiomarquage du chlorure de 8-*N'*-[(3-triéthylammonium)propyl]-1-*N*-(2-pyridinylméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane (composé **10**) sont présentés dans le tableau 8.



	Conditions optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 $\mu$ L (0,1 $\mu$ mol)	20 $\mu$ L (0,1 $\mu$ mol)
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 $\mu$ L	1600 $\mu$ L
<b><math>^{64}\text{CuCl}_2</math></b>	2 $\mu$ L	60 $\mu$ L
<b>Incubation (température/durée)</b>	30°C/15 min	30°C/15 min
<b>Activité</b>	2,6 MBq	66,7 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé 63</b>	96,6%	94,2%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,17	

**Tableau 8 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 63**

Le premier essai de complexation a été réalisé à 30°C pendant 15 minutes. Le contrôle chromatographique a montré 2 taches de radioactivités :

- la première comptant pour 3,4% de la radioactivité totale située au point de dépôt, pouvant être attribuée à une impureté provenant de la solution de cuivre-64,
- une seconde tache comptant pour 96,6% de la radioactivité totale, attribuée au composé 63. Le Rf calculé est de 0,17.

La cinétique de complexation du composé 63 est donc rapide et totale, aucune tache de radioactivité en CCM correspondant au cuivre-64 non complexé n'ayant été observée.

Lors du contrôle chromatographique de la solution à injecter aux animaux, ces deux mêmes taches de radioactivité ont été observées, avec une présence de pollution au dépôt légèrement supérieure à l'essai.

### 3. Chlorure de chloro-3-(4,11-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou $^{64}\text{Cu}$ -2 PYR 14-4 NTP (composé 64)

Les résultats du radiomarquage du chlorure de 3-(4,11-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminium (composé 13) sont présentés dans le tableau 9.

	Conditions optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 $\mu\text{L}$ (0,1 $\mu\text{mol}$ )	20 $\mu\text{L}$ (0,1 $\mu\text{mol}$ )
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 $\mu\text{L}$	600 $\mu\text{L}$
$^{64}\text{CuCl}_2$	2 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
<b>Incubation (température/durée)</b>	25°C/15 min	50°C/15 min
<b>Activité</b>	4,1 MBq	46 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé 64</b>	82,3%	86%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,19	

**Tableau 9 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 64**

Le contrôle chromatographique de l'essai de complexation laisse apparaître quatre taches :

- une première au point de dépôt, comptant pour environ 2% de la radioactivité totale, provenant de la solution de cuivre-64,
- une tache de radioactivité comptant pour 82,3% de la radioactivité totale attribuée au composé 64,
- une tache de radioactivité comptant pour 8% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé de 0,64. Le radiomarquage du précurseur de la molécule, la 2 PYR 14-4 (composé 12), à 25°C pendant 15 min, a révélé une complexation totale du cuivre-64 ainsi qu'un Rf calculé à 0,64, permettant d'identifier cette tache,

- une dernière tache comptant pour 7,7%, calculé avec un Rf proche de 1. Cette tache a été attribuée au cuivre-64 non complexé.

Afin de tenter de complexer ces 7,7% de cuivre-64 restant, la température du milieu réactionnel a été portée à 50°C. Après 15 minutes d'incubation, tout le cuivre-64 a été complexé, le contrôle chromatographique laissant apparaître 3 taches de radioactivité :

- une tache de radioactivité comptant pour 3,8% au point de dépôt, attribuée à la pollution du cuivre-64,
- une tache de radioactivité comptant pour 86% attribuée au composé **64**,
- une dernière tache de 10,2% attribuée au composé **12**.

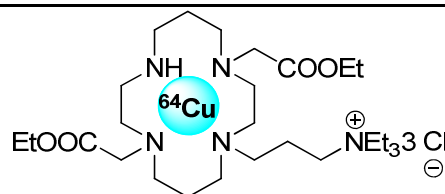
Nous avons choisis d'injecter cette solution de composé **64** malgré la présence du précurseur car cette pollution a été jugée minime.

La présence de la molécule de 2 PYR 14-4 (composé **12**) montre que la méthode employée pour la purification de la 2 PYR 14-4 NTP (composé **13**) est inefficace. Une des perspectives de cette thèse sera la mise au point d'une méthode de purification de ce composé afin de séparer le produit désiré des impuretés qui interfèrent lors de la complexation du cuivre-64.

**4. Chlorure de chloro-3-(4,11-bis(éthylester)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-TE2A(Et)2 NTP (composé 65) et chlorure de chloro-3-(4,11-bis(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-TE2A NTP (composé 66)**

Les résultats du radiomarquage du chlorure de 3-(4,11-bis(éthylester)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminium ou TE2A(Et)2 NTP (composé **21**) et du chlorure de 3-(4,11-bis(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminium ou TE2A NTP (composé **22**) sont présentés dans les tableaux 10 et 11.

➤  $^{64}\text{Cu}$ -TE2A(Et)<sub>2</sub> NTP (composé **65**)



	Conditions optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 $\mu\text{L}$ (0,1 $\mu\text{mol}$ )	400 $\mu\text{L}$ (2 $\mu\text{mol}$ )
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
$^{64}\text{CuCl}_2$	2 $\mu\text{L}$	165 $\mu\text{L}$
<b>Incubation (température/durée)</b>	70°C/15 min	70°C/15 min
<b>Activité</b>	2,5 MBq	90,5 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé <b>65</b></b>	99,9%	89,3%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,39	

**Tableau 10 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé **65****

Le premier essai de complexation a été réalisé à 30°C pendant 15 minutes. Le contrôle chromatographique a montré 3 taches de radioactivités :

- la première comptant pour 5,1% au point de dépôt, pouvant être attribuée à une impureté provenant de la solution de cuivre-64,
- une seconde tache comptant pour 65,7% de la radioactivité totale, attribuée au composé **65**. Le Rf calculé est de 0,39.
- Une dernière tache de radioactivité comptant pour 29,2%, avec un Rf proche de 1, attribuée à du cuivre-64 non complexé.

Afin d'augmenter le rendement de complexation du cuivre-64, la température d'incubation a été portée à 50°C. Après 15 minutes, le contrôle chromatographique a laissé apparaître 2 taches de radioactivité :

- une première tache comptant pour 88,5% de la radioactivité totale, calculé avec un Rf de 0,39, attribuée au composé **65**,
- une tache de radioactivité comptant pour 11,5%, avec un Rf proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Ainsi, l'augmentation de la température a permis d'améliorer le taux de complexation du composé **65**. Afin d'essayer de complexer la totalité du cuivre-64 libre, la température d'incubation a été portée à 70°C. Après 15 minutes, le contrôle chromatographique a montré une seule tache de radioactivité, calculé avec un Rf de 0,39, attribué au composé **65**.

Ces dernières conditions de radiomarquages ont été suivies pour la préparation de la solution de composé **65** à injecter aux animaux. Ce marquage s'est déroulé le lendemain des essais de complexation. Ainsi, l'activité volumique ayant décréue, un volume plus important de solution de cuivre-64 a du être ajouté pour atteindre l'activité souhaitée. La solution de ligand a également été augmentée afin d'être toujours en grand excès de chélatant.

Après l'incubation à 70°C pendant 15 minutes de la préparation, le contrôle chromatographique a montré 2 taches de radioactivité :

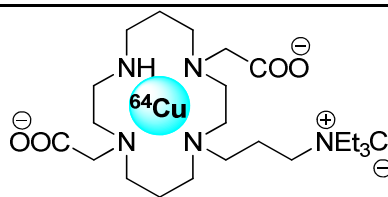
- une première comptant pour 89,3% de la radioactivité totale, calculé avec un Rf de 0,39, attribuée au composé **65**,
- une tache comptant pour 10,7% de la radioactivité, calculé avec un Rf proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Cette complexation non totale du cuivre-64 peut s'expliquer par le fait que le chélatant a complexé d'autres métaux présents dans la solution initiale et également le zinc ou le nickel provenant de la désintégration du cuivre-64. Une augmentation de solution de ligand aurait pu palier à cet inconvénient. De plus, les premiers essais ayant totalisés 45 minutes de réaction, un temps ici plus long aurait éventuellement pu permettre d'atteindre une complexation totale du cuivre-64.

Le timing du protocole expérimental mis en place ne nous a pas permis de tenter de complexer le cuivre-64 restant, la préparation a donc été fournie telle quelle à la biologie.



➤ <sup>64</sup>Cu-TE2A NTP (composé **66**)



	Conditions optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	220 µL (1,1 µmol)	400 µL (2 µmol)
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	380 µL	200 µL
<b><sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub></b>	2 µL	80 µL
<b>Incubation (température/durée)</b>	70°C/15 min	70°C/15 min
<b>Activité</b>	3,6 MBq	127 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé <b>66</b></b>	99,9%	56,4%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,47	

**Tableau 11 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé **66****

Le premier essai de complexation a été réalisé avec la température d'incubation utilisée pour le composé **21** précédent. Ainsi, après l'incubation à 70°C pendant 15 minutes de la préparation, le contrôle chromatographique a montré 2 taches de radioactivité :

- une première tache de radioactivité comptant pour 32% de la radioactivité totale, calculé avec un Rf de 0,47, attribuée au composé **66**,
- une deuxième tache comptant pour 68% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Ainsi, pour tenter d'augmenter le taux de complexation et éviter la présence de cuivre-64 non complexé, nous avons choisis d'augmenter la quantité de ligand plutôt que d'augmenter la température d'incubation, afin d'éviter une éventuelle dégradation de la molécule. Alors que le premier essai avait été réalisé avec 20 µL de solution ligand, 200 µL ont été utilisés lors de ce deuxième essai. Suite à l'incubation à 70°C pendant 15 minutes de la préparation, le contrôle chromatographique a montré 1 unique tache de radioactivité avec un Rf calculé de 0,38, attribuée au composé **66**.

Lors de la préparation de la solution à injecter aux animaux, nous avons travaillé directement avec 200µL de solution ligand. Lors du contrôle chromatographique, nous avons observé 2 taches de radioactivité :

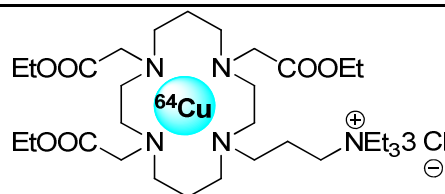
- une première comptant pour 31,9% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé de 0,47, attribuée au composé **66**,
- une deuxième tache comptant pour 68,1% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Afin de tenter d'augmenter le taux de complexation, nous avons ajouté 200µL de solution ligand. Après une incubation à 70°C pendant 15 minutes, nous avons observé deux taches de radioactivités, aux mêmes Rf que pour la CCM précédente, la tache attribuée au composé **66** comptant pour 56% et celle du cuivre-64 non complexé comptant pour 44%. Par manque de temps, nous n'avons pas continué les ajouts de solution ligand pour atteindre une complexation totale du cuivre-64. Face à la trop grande présence de cuivre-64 non complexé dans l'échantillon, la solution de composé **66** n'a pas été injecté sur animaux.

**5. Chlorure de chloro-3-(4,8,11-tris(éthylester)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-TE3A(Et)<sub>3</sub> NTP (composé 67) et du chlorure de chloro-3-(4,8,11-tris(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-TE3A NTP (composé 68)**

Les résultats du radiomarquage du chlorure de 3-(4,8,11-tris(éthylester)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminium (composé **27**) et du chlorure de 3-(4,8,11-tris(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminium (composé **28**) sont présentés dans les tableaux 12 et 13.

➤  $^{64}\text{Cu}$ -TE3A(Et)<sub>3</sub> NTP (composé 67)



	Essai	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 $\mu\text{L}$ (0,1 $\mu\text{mol}$ )	20 $\mu\text{L}$ (0,1 $\mu\text{mol}$ )
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 $\mu\text{L}$	1900 $\mu\text{L}$
$^{64}\text{CuCl}_2$	2 $\mu\text{L}$	70 $\mu\text{L}$
<b>Incubation (température/durée)</b>	30°C/15 min	50°C/15 min
<b>Activité</b>	3,5 MBq	105 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé 67</b>	94,0%	0%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,52	

**Tableau 12 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 67**

Le premier essai de complexation a été réalisé à 30°C pendant 15 minutes. Le contrôle chromatographique a montré 2 taches de radioactivités :

- la première comptant pour 94,0% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé de 0,52, attribuée au composé 67,
- une seconde tache comptant pour 6% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Afin d'augmenter le rendement de complexation du cuivre-64, la température d'incubation a été portée à 50°C. Après 15 minutes d'incubation, aucun changement n'a été observé.

Lors du contrôle chromatographique de la solution préparée pour la biologie, une seule tache de radioactivité a été observée. Celle-ci ayant un Rf calculé proche de 1, a été attribuée au cuivre-64 non complexé. Nous pouvons attribuer cette perte de complexation par le fait que le ligand a complexé d'autres métaux présents dans la solution initiale et également le zinc ou le nickel provenant de la désintégration du cuivre-64, entrant en compétition avec la complexation du composé 27 par le cuivre-64.

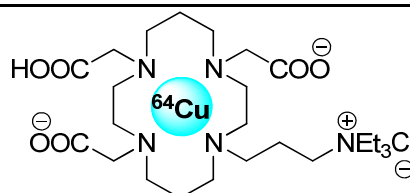
En raison du timing imposé par notre protocole, nous n'avons pas pu ajouter de solution de ligand afin de complexer ce cuivre-64. Ce CBF n'a donc pas été étudié *in vivo*.

Nous avons par la suite ajouté 200µL de solution ligand à cette préparation. Après avoir été incubé pendant 15 minutes à 50°C, le contrôle chromatographique a montré 3 taches de radioactivité :

- une première au point de dépôt comptant pour 10,2%, pouvant être attribuée à la pollution du cuivre-64, ainsi qu'à d'éventuels complexes d'hydroxyde de cuivre-64.
- une seconde comptant pour 67,7%, attribuée au composé **67**,
- une dernière comptant pour 21,7%, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Une augmentation de la quantité de ligand aurait bien permis d'augmenter le taux de complexation.

➤ <sup>64</sup>Cu-TE3A NTP (composé **68**)



	Essai	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 µL (0,1 µmol)	200 µL (1 µmol)
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 µL	1700 µL
<b><sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub></b>	2 µL	201 µL
<b>Incubation (température/durée)</b>	30°C/15 min	70°C/15 min
<b>Activité</b>	3,5 MBq	101 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé <b>68</b></b>	91,9%	86,4%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,65	

**Tableau 13 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé **68****

Le premier essai de complexation a été réalisé à 30°C pendant 15 minutes. Le contrôle chromatographique a montré 2 taches de radioactivités :

- une première comptant pour 91,9% de la radioactivité totale, attribuée au composé **68**,
- une seconde comptant pour 8,1% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Afin d'augmenter le rendement de complexation du cuivre-64, la température d'incubation a été portée à 50°C. Après 15 minutes d'incubation, aucun changement n'a été observé.

Nous avons manqué de temps pour effectuer d'autres essais afin d'augmenter le taux de complexation, par ajout de solution ligand ou par augmentation de la température d'incubation par exemple.

Ainsi, nous avons choisis d'incuber directement la solution pour la biologie à 70°C pendant 15 minutes, tout en portant le volume de la solution ligand à 200µL. Après contrôle chromatographique de cette solution, nous avons observés deux taches de radioactivité :

- une première comptant pour 86,4% de la radioactivité totale, attribuée au composé **68**,
- une seconde comptant pour 10,6% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Pour respecter le timing imposé par notre protocole expérimental, nous n'avons pas ajouté de solution de ligand afin de complexer les 10,6% de cuivre-64 « libre ». La solution a donc été injectée telle quelle aux animaux.

6. Chlorure de chloro-3-(8-(éthanoate de *tert*-butyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -SB TE1A(tBu) NTP (composé 69) et Chlorure de chloro-3-(8-(carboxyméthyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou  $^{64}\text{Cu}$ -SB TE1A NTP (composé 70)

Les résultats du radiomarquage du chlorure de 3-(8-(éthanoate de *tert*-butyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (composé 36) et du chlorure de 3-(8-(carboxyméthyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (composé 37) sont présentés dans les tableaux 14 et 15.

➤  $^{64}\text{Cu}$ -SB TE1A(tBu) NTP (composé 69)

	Conditions Optimales	Biologie
Solution ligand (5mM)	200 $\mu\text{L}$ (0,1 $\mu\text{mol}$ )	1600 $\mu\text{L}$ (8 $\mu\text{mol}$ )
Tampon pH = 6 (0,1 M)	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
$^{64}\text{CuCl}_2$	2 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$
Incubation (température/durée)	70°C/15 min	70°C/30 min
Activité	2,5 MBq	92 MBq
Pureté radiochimique du composé 69	99,9%	99,9%
Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))	0,21	

Tableau 14 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 69

Le premier essai de complexation a été réalisé à 30°C pendant 15 minutes. Le contrôle chromatographique a montré 3 taches de radioactivités :

- une première au point de dépôt comptant pour 2,5% de la radioactivité totale, pouvant être attribuée à la pollution du cuivre-64,
- une seconde comptant pour 20,3%, attribuée au composé 69,

- une dernière comptant pour 77,2%, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Afin d'augmenter le rendement de complexation du cuivre-64, la température d'incubation a été portée à 50°C. Après 15 minutes d'incubation, Le contrôle chromatographique a montré 3 taches de radioactivités :

- une première au point de dépôt comptant pour 1% de la radioactivité totale, pouvant être attribuée à la pollution du cuivre-64,
- une seconde comptant pour 84,2%, attribué au composé **69**,
- une dernière comptant pour 14,8%, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Afin de tenter de complexer totalement le cuivre-64 « libres » restant, la température d'incubation a été portée à 70°C. Le contrôle chromatographique n'a révélé aucune tache de radioactivité correspondant au cuivre-64 non complexé.

Après incubation à 70°C pendant 30 minutes de la solution à injecter aux animaux, le contrôle chromatographique a révélé 2 taches de radioactivité :

- une première comptant pour 11,5 % de la radioactivité totale, attribuée au composé **69**,
- une seconde comptant pour 88,5% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

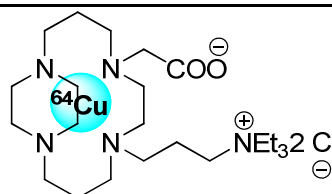
Cette perte de complexation peut être attribuée à la présence de métaux dans la solution de cuivre-64 provenant de la décroissance du radionucléide, entrant en compétition avec la complexation du cuivre-64. Afin de tenter d'augmenter le taux de complexation du radionucléide, nous avons choisis d'accroître la quantité de ligand plutôt que la température pour ne pas risquer de dégrader la molécule. Nous avons donc ajouté 200µL de solution ligand à la préparation, et après incubation à 70°C pendant 30 minutes, le contrôle chromatographique a révélé 2 taches de radioactivité :

- une première comptant pour 24 % de la radioactivité totale, attribuée au composé **69**,

- une seconde comptant pour 76% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

La complexation totale du cuivre-64 a été atteinte après deux ajouts successifs de 600 µL de solution de ligand avec à chaque fois une période d'incubation de 30 minutes à 70°C.

➤ <sup>64</sup>Cu-SB TE1A NTP (composé **70**)



	Conditions Optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	200 µL (1 µmol)	200 µL (1 µmol)
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 µL	200 µL
<b><sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub></b>	2 µL	30 µL
<b>Incubation (température/durée)</b>	70°C/30 min	70°C/30 min
<b>Activité</b>	6,5 MBq	95 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé <b>70</b></b>	99,9%	99,9%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,28	

**Tableau 15 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé **70****

Le premier essai de complexation a été réalisé à 70°C pendant 30 minutes. Le contrôle chromatographique a montré une complexation totale du cuivre-64. Le contrôle chromatographique de la préparation à injecter aux animaux a montré un même taux de complexation du radionucléide.



**7. Chlorure de 3-(1,5,8,12-tétraazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium ou SB 14-4 NTP (composé 31) et chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(8-pyridin-2-ylméthyl)-1,5,8,12-tétraazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)propan-1-aminium ou 1 PYR SB 14-4 NTP (composé 33)**

Les composés **31** et **33** n'ont pas été radiomarqués par manque de matière première. En effet, les contraintes de production du cuivre-64 et son coût ne nous ont pas permis de bénéficier de ce nucléide comme nous le souhaitions. Une des perspectives de cette thèse est de réaliser le radiomarquage de ces deux CBFs afin d'étudier leurs spécificités *in vivo*.

**C. <sup>64</sup>Cu-CBFs dérivés du cyclène**

**1. Chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(1,4,7,10-tétraazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-12-4 NTP (composé 71)**

Les résultats du radiomarquage du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(1,4,7,10-tétraazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminium (composé **41**) sont présentés dans le tableau 16.

	Conditions optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 µL (0,1 µmol)	20 µL (0,1 µmol)
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 µL	600 µL
<b><sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub></b>	2 µL	23 µL
<b>Incubation (température/durée)</b>	25°C/15 min	30°C/15 min
<b>Activité</b>	4,3 MBq	33,4 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé <b>71</b></b>	98,9%	99,0%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,32	

**Tableau 16 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé **71****

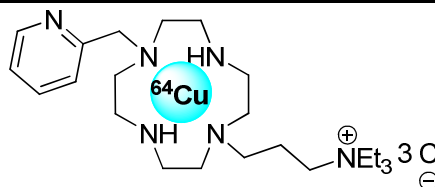
Le premier essai de complexation a été réalisé à 25°C pendant 15 minutes. Le contrôle chromatographique a montré 2 taches de radioactivités :

- une première au point de dépôt comptant pour 1,1% de la radioactivité totale, pouvant être attribuée à la pollution du cuivre-64,
- une seconde comptant pour 98,9%, attribuée au composé **71**.

Aucune tache de radioactivité attribuée au cuivre-64 non complexé a été observée. Le contrôle chromatographique de la solution à injecter aux animaux a révélé les deux mêmes taches de radioactivité dans des proportions équivalentes.

## 2. Chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(7-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-1 PYR 12-4 NTP (composé **72**)

Les résultats du radiomarquage du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(7-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1-yl)propan-1-aminium (composé **45**) sont présentés dans le tableau 17.



	Conditions optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 µL (0,1 µmol)	20 µL (0,1 µmol)
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 µL	800 µL
<b><sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub></b>	2 µL	70 µL
<b>Incubation (température/durée)</b>	25°C/15 min	30°C/15 min
<b>Activité</b>	1,3 MBq	30,5 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé <b>72</b></b>	98,0 %	99,9%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,20	

Tableau 17 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé **72**

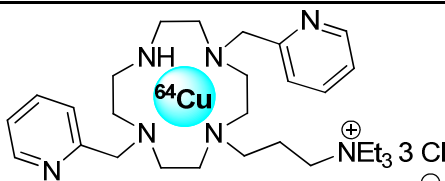
Le premier essai de complexation de la 1 PYR 12-4 NTP a été réalisé à 25°C pendant 15 minutes. Le contrôle chromatographique a montré deux taches de radioactivité :

- une première comptant pour 2% de la radioactivité totale, au point de dépôt de la CCM, pouvant être attribuée à la pollution du cuivre-64,
- une seconde comptant pour 98% de la radioactivité totale, attribuée au composé **72**.

Aucune tache de radioactivité correspondante au cuivre-64 non complexé n'a été observée. Le contrôle chromatographique de la solution à injecter aux animaux a révélé une tache unique de radioactivité, attribuée au composé **72**.

### 3. Chlorure de chloro-3-(4,10-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-2 PYR 12-4 NTP (composé 73)

Les résultats du radiomarquage du chlorure de 3-(4,10-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminium (composé **48**) sont présentés dans le tableau 18.



	Conditions optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 µL (0,1 µmol)	20 µL (0,1 µmol)
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 µL	800 µL
<b><sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub></b>	2 µL	84 µL
<b>Incubation (température/durée)</b>	25°C/15 min	30°C/15 min
<b>Activité</b>	3,6 MBq	38,6 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé 73</b>	86,3%	96,9%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,22	

Tableau 18 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé **73**

Le premier essai de complexation de la 2 PYR 12-4 NTP a été réalisé à 25°C pendant 15 minutes. Le contrôle chromatographique a montré deux taches de radioactivité :

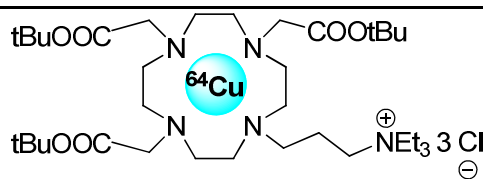
- une première comptant pour 13,7% de la radioactivité totale, au point de dépôt de la CCM, pouvant être attribuée à la pollution du cuivre-64 ainsi qu'à des complexes d'hydroxyde de cuivre-64.
- une seconde comptant pour 86,3% de la radioactivité totale, attribuée au composé **73**.

Aucune tache de radioactivité attribuée au cuivre-64 non complexé a été observée. Le contrôle chromatographique de la solution à injecter aux animaux a révélé les deux mêmes taches de radioactivité, avec celle attribuée au composé **74** comptant pour 96,9%.

**4. Chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tris(éthanoate de *tert*-butyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-DO3A(tBu) NTP (composé 74) et chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-DO3A NTP (composé 75)**

Les résultats du radiomarquage du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tris(éthanoate de *tert*-butyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminium (composé **50**) et du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminium (composé **51**) sont présentés dans les tableaux 19 et 20.

➤  $^{64}\text{Cu}$ -DO3A(tBu)<sub>3</sub> NTP (composé **74**)



	Conditions Optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 $\mu\text{L}$ (0,1 $\mu\text{mol}$ )	20 $\mu\text{L}$ (0,1 $\mu\text{mol}$ )
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 $\mu\text{L}$	1900 $\mu\text{L}$
$^{64}\text{CuCl}_2$	2 $\mu\text{L}$	260 $\mu\text{L}$
<b>Incubation (température/durée)</b>	70°C/30 min	3 x 70°C/30 min
<b>Activité</b>	4 MBq	135 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé <b>74</b></b>	99,9%	44,7%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,46	

**Tableau 19 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé **74****

Le premier essai de complexation a été réalisé à 70°C pendant 30 minutes. Le contrôle chromatographique a montré une complexation totale du cuivre-64.

Lors du contrôle chromatographique de la solution préparée pour la biologie, deux taches de radioactivité ont été observées :

- une première comptant pour 33% de la radioactivité totale, attribuée au composé **74**,
- une seconde comptant pour 67% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Pour tenter d'atteindre une complexation totale du cuivre-64 sans ajouter de solution ligand, nous avons replacé la solution en incubation à 70°C pendant 30 minutes. Le contrôle chromatographique ne montre aucun changement notable par rapport au précédent.

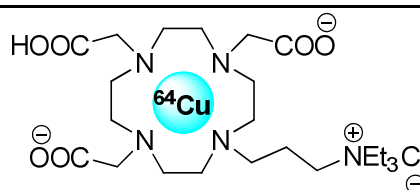
Après une dernière incubation de la solution à 70°C pendant 30 minutes, le contrôle chromatographique a révélé :

- une première comptant pour 44,7% de la radioactivité totale, attribuée au composé **74**,

- une seconde comptant pour 55,3% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Face au manque de temps et afin de respecter le protocole de biologie, nous n'avons pas pu tenter d'augmenter ce taux de complexation. Par conséquent, ce CBF n'a pas été injecté sur animal.

➤ <sup>64</sup>Cu-DO3A NTP (composé **75**)



	Conditions Optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 µL (0,1 µmol)	20 µL (0,1 µmol)
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 µL	1900 µL
<b><sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub></b>	2 µL	70 µL
<b>Incubation (température/durée)</b>	30°C/15 min	30°C/20 min
<b>Activité</b>	4 MBq	101 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé <b>75</b></b>	73,0%	87,0%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,50	

**Tableau 20 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé **75****

Le premier essai de complexation a été réalisé à 30°C pendant 15 minutes. Le contrôle chromatographique a montré deux taches de radioactivité :

- une première comptant pour 73% de la radioactivité totale, attribuée au composé **75**,
- une seconde comptant pour 27% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Une seconde période d'incubation de cette solution à 70°C pendant 20 minutes n'a pas permis d'améliorer le taux de complexation du CBF.

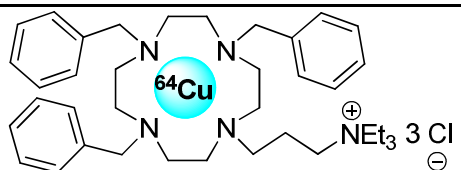
Lors du contrôle chromatographique de la solution préparée pour la biologie, deux taches de radioactivité ont été observées :

- une première comptant pour 87% de la radioactivité totale, attribuée au composé **75**,
- une seconde comptant pour 13% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Malgré la présence de cuivre-64 non complexé, nous avons décidé d'injecter le composé **75** aux animaux.

### 5. Chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tribenzyl-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-3 Bz 12-4 NTP (composé 76)

Les résultats du radiomarquage du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tribenzyl-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1-yl)propan-1-aminium (composé **53**) sont présentés dans le tableau 21.



	Conditions Optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 µL (0,1 µmol)	20 µL (0,1 µmol)
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 µL	380 µL
<b><sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub></b>	2 µL	100 µL
<b>Incubation (température/durée)</b>	25°C/100 min	50°C/30 min
<b>Activité</b>	4 MBq	19 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé <b>76</b></b>	98,2%	99,9%
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (30/70, v/v))</b>	0,62	

**Tableau 21 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé **76****

Le premier essai de complexation a été réalisé à 25°C pendant 15 minutes. Le contrôle chromatographique a montré une complexation incomplète du cuivre-64 par le

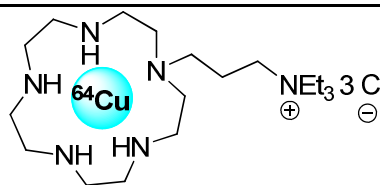
chélatant (10,1% du cuivre restait non chélaté par notre CBF). Un contrôle effectué une heure plus tard a montré que la complexation était alors quasi-totale (98,2%).

Lors de la préparation de la solution destinée aux études biologiques, nous avons choisi d'augmenter la température, nous permettant d'améliorer la cinétique de cette complexation tout en conservant un excellent rendement radiochimique.

#### D. $^{64}\text{Cu}$ -CBFs dérivés de la 15-5 NTP

##### 1. Chlorure de chloro-N,N,N-triéthyl-3-(1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou $^{64}\text{Cu}$ -15-5 NT (composé 77)

Les résultats du radiomarquage du chlorure de N,N,N-triéthyl-3-(1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécan-1-yl)propan-1-aminium (composé 59) sont présentés dans le tableau 22.



	Conditions Optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 $\mu\text{L}$ (0,1 $\mu\text{mol}$ )	20 $\mu\text{L}$ (0,1 $\mu\text{mol}$ )
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
$^{64}\text{CuCl}_2$	2 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$
<b>Incubation (température/durée)</b>	25°C/15 min	25°C/20 min
<b>Activité</b>	3,8 MBq	107 MBq*
<b>Pureté radiochimique du composé 77</b>	96,5%	98,3 %
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,32	

\*Les essais pour la détermination des conditions optimales et la préparation de la solution destinée aux études biologiques ont été réalisées à des dates et lots de cuivre-64 différents.

**Tableau 22 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé 77**

La solution du ligand seul a été préparée dans l'eau désionisée, comme lors du marquage de ce CBF au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .



Le premier essai de complexation a été réalisé à 25°C pendant 15 minutes. Le contrôle chromatographique a montré deux taches de radioactivité :

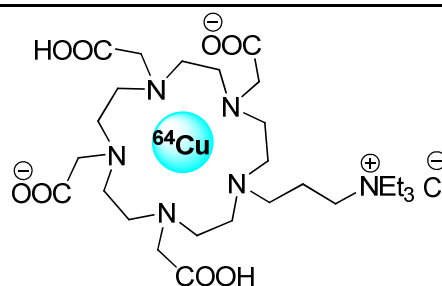
- une première comptant pour 3,6% de la radioactivité totale, au point de dépôt de la CCM, pouvant être attribuée à la pollution du cuivre-64,
- une seconde comptant pour 96,4% de la radioactivité totale, attribuée au composé **77**.

La cinétique de complexation est donc rapide et efficace.

Lors du contrôle chromatographique de la solution à injecter aux animaux, les deux mêmes taches de radioactivité ont été observées, la pollution attribuée au cuivre-64 étant en moindre proportion.

## 2. Chlorure de chloro-*N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10,13-tétrakis(carboxyméthyl)-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécan-1-yl)propan-1-aminiumcuivre(II) ou <sup>64</sup>Cu-4A 15-5 NTP (composé **78**)

Les résultats du radiomarquage du chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10,13-tétrakis(carboxyméthyl)-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécan-1-yl)propan-1-aminium (composé **61**) sont présentés dans le tableau 23.



	Conditions Optimales	Biologie
<b>Solution ligand (5mM)</b>	20 µL (0,1 µmol)	20 µL (0,1 µmol)
<b>Tampon pH = 6 (0,1 M)</b>	200 µL	500 µL
<sup>64</sup> CuCl <sub>2</sub>	2 µL	80 µL
<b>Incubation (température/durée)</b>	30°C/15 min	70°C/15 min
<b>Activité</b>	2,5 MBq	117 MBq
<b>Pureté radiochimique du composé <b>78</b></b>	92,8%	76,1 %
<b>Rf (méthanol/acétate d'ammonium 5M (50/50, v/v))</b>	0,56	

Tableau 23 : Conditions opératoires et résultats du radiomarquage du composé **78**

Le premier essai de complexation a été réalisé à 30°C pendant 15 minutes. Le contrôle chromatographique a montré deux taches de radioactivité :

- une première comptant pour 92,8% de la radioactivité totale, attribuée au composé **78**,
- une seconde comptant pour 5,8% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Cependant, contrairement à tous les autres CBFs où le calcul du Rf de la tache de radioactivité s'est fait sans ambiguïté, le calcul du Rf pour le composé **78** s'est avéré plus délicat puisque la tache de radioactivité s'étale pratiquement jusqu'au front de solvant. Cette particularité nous a gêné dans la différenciation entre la tache de radioactivité du complexe et celle correspondant au cuivre-64 non complexé. Ainsi, la valeur de Rf = 0,56 pour le composé **79** a été calculé en tenant compte de l'endroit présentant le pic de radioactivité maximum.

Lors de la préparation de la solution à injecter aux animaux, le contrôle chromatographique a montré :

- une première tache de radioactivité comptant pour 2,9% de la radioactivité totale, au point de dépôt de la CCM, pouvant être attribuée à la pollution du cuivre-64,
- une seconde tache de radioactivité, comptant pour 76,1%, attribuée au composé **78**,
- une dernière tache de radioactivité comptant pour 21% de la radioactivité totale, avec un Rf calculé proche de 1, attribuée au cuivre-64 non complexé.

Ces deux dernières valeurs sont sujettes à discussion au vu des difficultés rencontrées lors du comptage de la plaque CCM.

## **E. Conclusion**

Les essais de complexation ont permis dans la plupart des cas de déterminer les conditions optimales pour le radiomarquage des CBFs. Cependant, pour certains de ces CBFs l'augmentation des volumes des différentes préparations, telle que la solution de cuivre-64

et de solution tampon, a résulté en une perte du taux de complexation du CBF. Nous pouvons potentiellement attribuer cette baisse de CBF complexé à la présence de métaux parasites dans la solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$ , entrant en compétition avec le cuivre-64 pour la complexation. Pour tenter de retrouver un taux de complexation maximal du CBF avec le radionucléide, nous avons soit procédé à des ajouts de solution ligand, soit multiplié les périodes d'incubation à une température déterminée pour chaque complexe. Dans la plupart des cas, nous avons amélioré le taux de complexation du CBF, permettant d'obtenir une solution à injecter aux animaux possédant un faible taux de cuivre-64 non complexé.

Cependant, ces différentes opérations pour obtenir un taux maximal de complexation ont été coûteuses en temps. Le timing du protocole, comprenant le radiomarquage, la vérification des lots radiomarqués, l'injection aux animaux, les temps d'attente, la prise d'image TEP de chaque rat aux deux temps d'imagerie fixés ainsi que les études de biodistribution, ne permettait pas de délivrer trop tardivement les lots destinés aux études biologiques. Par conséquent, certains CBFs n'ont pas été injectés ou l'ont été mais les résultats collectés ne seront pas présentés dans le chapitre 4 car la présence de cuivre-64 non complexé introduit un biais dans l'interprétation des valeurs.

Le chapitre 4 va présenter les résultats biologiques des CBFs radiomarqués, avec l'objectif de révéler un radiotracer TEP spécifique du cartilage.

1. **Amiot, M. N. et al.** Standardization of  $^{64}\text{Cu}$  using a improved decay scheme. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*. 2012, Vol. 684, pp. 97-104.
2. **Hou, X., Jacobsen, U, Jørgensen, J. C.** Separation of no-carrier-added  $^{64}\text{Cu}$  from a proton irradiated  $^{64}\text{Ni}$  enriched nickel target. *Applied Radiation and Isotopes*. 2002, Vol. 57, 6, pp. 773-777.
3. **Institut National de Recherche et Sécurité.** *Nickel et ses oxydes - Fiche toxicologique*. 2009.
4. **Institut National Recherche et Sécurité.** *Zinc et ses composés minéraux - Fiche toxicologique*. 2009.
5. **Bé, M.-M. et al.** *Table of Radionucléides*. s.l. : Bureau International des Poids et Mesures, 2011. Vol. 6-A = 22 to 242.



# **Chapitre 4**

**Etudes de biodistribution et imagerie**

**TEP des CBFs marqués au cuivre-64**



Les CBFs ont été marqués au cuivre-64 et injectés sur modèle murin. Deux types d'études ont été réalisées :

- une étude de biodistribution, dans laquelle les animaux sont sacrifiés à un temps défini, les organes d'intérêt sont alors prélevés, pesés et leur radioactivité comptée au détecteur  $\gamma$  ;
- une imagerie TEP *in vivo* sur animaux.

L'ensemble de ces études doit nous permettre d'identifier les ligands fonctionnalisés les plus pertinents pour réaliser de l'imagerie fonctionnelle du cartilage.

## I. Biodistribution

La totalité des radiotraceurs **62, 63, 64, 65, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77** et **78** a été étudiée sur des rats Sprague Dawley sains mâles pesant 300 g.

Certains de ces radiotraceurs ont également pu être testés sur des animaux porteurs de chondrosarcome (modèle SWARM) implanté en situation orthotopique au niveau du tibia. Ces études, menées au stade J30 post implantation, ont pour objectif de démontrer que les radiotraceurs sont potentiellement très intéressants pour la détection de tumeurs cartilagineuses à des stades précoces de la maladie.

Certains CBFs (composés **65, 68, 75** et **78**) présentent des traces de cuivre-64 non complexés. Selon sa concentration, ce dernier pourra affecter les résultats des études.

Les radiotraceurs **66, 67** et **74** n'ont pas été injectés du fait de la présence non négligeable de cuivre-64 dans la préparation.

Le cuivre-64 fourni n'est pas de qualité pharmaceutique. Cette particularité a été observée dans le contrôle CCM du radionucléide seul, pour lequel une tâche présente au point de dépôt a été attribuée à la présence d'impuretés dans le lot de cuivre-64. Ces impuretés peuvent potentiellement être dommageables pour nos CBFs ou pour l'organisme de l'animal.



A noter également que les solutions de CBFs sont préparées avec, pour la grande majorité, une solution de ligand à 0,1  $\mu\text{mol}$  (8  $\mu\text{mol}$  au maximum). Le cuivre-64 étant largement introduit en défaut, une quantité de ligand non complexé sera présente dans les solutions injectées aux animaux. Cependant, celle-ci étant en très faible concentration par rapport à la cible d'intérêt, à savoir le cartilage articulaire, le ligand ne pourra pas saturer cette cible et entrer en compétition avec nos CBFs marqués.

Chaque composé est injecté par voie intraveineuse :

- à 2 rats (radioisotope  $^{64}\text{Cu}$  et composés, **62, 63, 64, 71, 72, 73, 76 et 77**) ou 3 rats (composés **65, 68, 69, 70, 75 et 78**) pour une imagerie TEP corps entier réalisée à 1 heure post-injection (p.i.).
- à 2 rats (composés, **62, 63, 64, 71, 72, 73, 76 et 77**) ou 3 rats (composés **65, 68, 69, 70, 75 et 78**) pour une étude de biodistribution à 1 h p.i. et 3 h p.i. L'activité détectée est exprimée en pourcentage de dose injectée par grammes d'organe (% DI/g) (Tableaux 24 et 25).

**Tableau 24 : Biodistributions à 1 h p.i. et 3 h p.i. chez le rat ; résultats exprimés en % DI/g ± déviation standard**

	Os		Foie		Cartilage articulaire		Muscle	
	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h
<sup>64</sup> Cu libre	0,00	0,00	0,8	0,67	0,00	0,00	0,05	0,05
<b>62</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,4 ± 2,7	0,16 ± 0,08	5,9 ± 2,3	0,49 ± 0,26	1,5 ± 1,2	0,05 ± 0,05
<b>63</b>	0,00 ± 0,00	-	1,2 ± 0,4	-	1,5 ± 0,4	-	0,43 ± 0,15	-
<b>64</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,9 ± 2,5	0,26 ± 0,01	2,7 ± 0,4	0,31 ± 0,02	0,80 ± 0,4	0,03 ± 0,01
<b>65</b>	-	-	0,18 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,04	0,02 ± 0,01
<b>68</b>	-	-	0,19 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,09	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01
<b>69</b>	-	-	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,16 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00
<b>70</b>	-	-	0,06 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00
<b>71</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,4 ± 0,3	0,00 ± 0,00
<b>72</b>	0,1 ± 0,1	-	4,3 ± 1,5	-	0,56 ± 0,03	-	0,04 ± 0,05	-
<b>73</b>	0,00 ± 0,00	-	0,66 ± 0,6	-	0,60 ± 0,09	-	0,07 ± 0,03	-
<b>75</b>	-	-	0,22 ± 0,12	0,15 ± 0,10	0,12 ± 0,07	0,06 ± 0,05	0,05 ± 0,03	0,02 ± 0,02
<b>76</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,45 ± 0,05	1,25 ± 0,5	0,25 ± 0,08	0,24 ± 0,21	0,08 ± 0,04	0,07 ± 0,05
<b>77</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,06	2,6 ± 1,1	0,49 ± 0,16	0,4 ± 0,3	0,03 ± 0,03
<b>78</b>	-	-	0,79 ± 0,15	1,27 ± 0,42	0,67 ± 0,46	0,37 ± 0,08	0,07 ± 0,04	0,12 ± 0,02

- : non déterminé

**Tableau 25 : Biodistributions à 1 h p.i. et 3 h p.i. chez le rat ; résultats exprimés en % DI/g ± déviation standard**

	Reins		Sang		Vessie		Tumeur	
	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h
<sup>64</sup> Cu libre	1,07	0,61	0,06	0,05	21,9	6,96	NA	NA
<b>62</b>	27,5 ± 10,1	0,96 ± 0,46	0,8 ± 1,2	0,00 ± 0,00	66,5 ± 14,4	-	5,2 ± 2,1	0,25 ± 0,11
<b>63</b>	7,6 ± 4,6	-	0,4 ± 0,07	-	30,5 ± 10,9	-	1,4 ± 0,07	-
<b>64</b>	9,2 ± 0,9	1,17 ± 0,30	0,7 ± 0,2	0,00 ± 0,00	25,2 ± 10,6	-	4,2 ± 0,6	0,38 ± 0 1
<b>65</b>	2,69 ± 1,38	0,45 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,02 ± 0,00	-	-	NA	NA
<b>68</b>	2,18 ± 1,48	0,58 ± 0,04	0,12 ± 0,06	0,03 ± 0,01	-	-	NA	NA
<b>69</b>	1,06 ± 0,66	0,32 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	11,83 ± 5,57	-	NA	NA
<b>70</b>	0,73 ± 0,22	0,29 ± 0,06	0,09 ± 0,04	0,01 ± 0,00	14,71 ± 7,12	-	NA	NA
<b>71</b>	1,4 ± 1,5	0,43 ± 0,03	0,2 ± 0,9	0,00 ± 0,00	30,6 ± 11,0	-	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,03
<b>72</b>	1,35 ± 2	-	0,04 ± 0,03	-	5,4 ± 2,2	-	0,64 ± 0,03	-
<b>73</b>	2,5 ± 2	-	0,07 ± 0,02	-	33,4 ± 21,2	-	0,60 ± 0,06	-
<b>75</b>	2,20 ± 1,40	0,73 ± 0,55	0,23 ± 0,14	0,22 ± 0,06	-	-	0,18 ± 0,08	0,10 ± 0,08
<b>76</b>	1,35 ± 0,35	1,62 ± 0,76	0,08 ± 0,04	0,00 ± 0,00	3,7 ± 1,5	-	0,25 ± 0,05	0,17 ± 0,00
<b>77</b>	16,4 ± 6,6	0,74 ± 0,66	0,1 ± 0,05	0,03 ± 0,04	62,2 ± 17,6	-	3,5 ± 0,5	0,41 ± 0,1
<b>78</b>	1,82 ± 0,17	2,13 ± 0,77	0,16 ± 0,06	0,33 ± 0,08	-	-	NA	NA

NA : non applicable    - : non déterminé

## II. Imagerie TEP

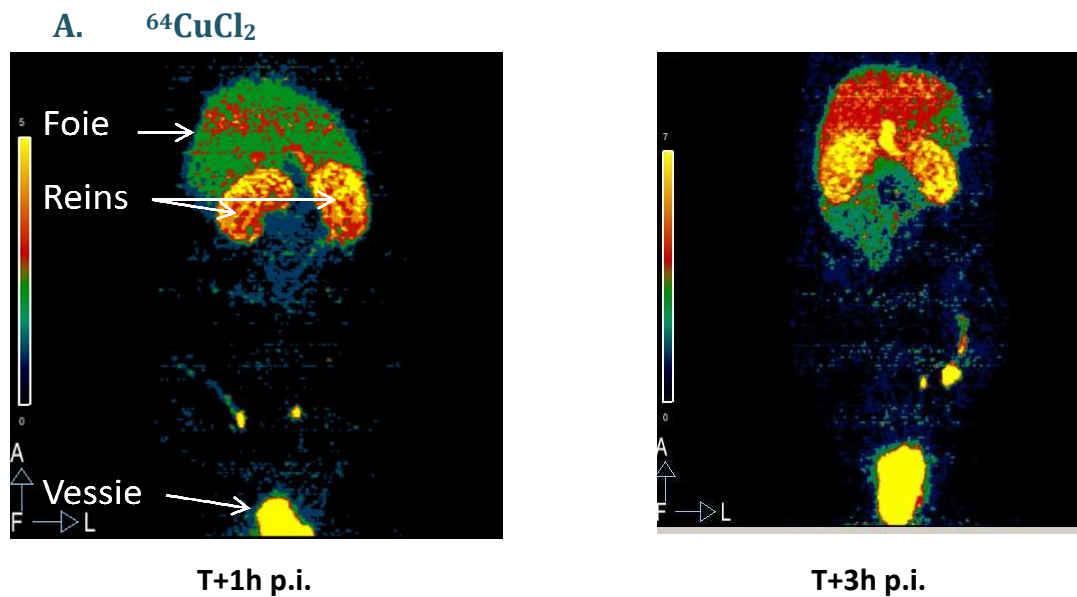
Nos CBFs radiomarqués doivent répondre à deux attentes qui sont :

- être capable de transporter la radioactivité vers le cartilage articulaire. Les données de biodistribution à 1h p.i. et 3h p.i. démontrent en effet d'une affinité nulle du cuivre-64 libre pour ce tissu d'intérêt.
- présenter une stabilité *in vivo* maximale afin d'éviter la décomplexation du cuivre-64 et limiter l'accumulation de radionucléide dans le foie.

La question de la stabilité *in vivo* est en effet essentielle dans toutes les études biologiques de composés radiomarqués. Parmi les phénomènes pouvant affecter cette dernière, nous pouvons citer la présence de molécules dans l'organisme susceptibles d'entrer en compétition avec le CBF. Nos composés radiomarqués circulant par voie sanguine jusque vers le cartilage articulaire, la protéine assimilant le cuivre naturel peut entrer en compétition avec le CBF. Cette transchélation va être responsable de l'accumulation de cuivre-64 dans le foie, pouvant affecter les images TEP par une irradiation importante de cet organe. Nos CBFs doivent donc être particulièrement résistants à la transchélation.

De plus, la présence d'autres cations métalliques dans l'organisme peut entraîner une dissociation du complexe. Pour que nos CBFs soient résistants à cette transmétallation, la sélectivité du ligand pour le cuivre-64 doit être importante.

Ainsi, nos CBFs ont pour rôle majeur le transport de la radioactivité, représentée par le cuivre-64, vers le cartilage articulaire. Le cuivre étant présent à l'état naturel dans l'organisme, nos CBFs doivent permettre de « masquer » les propriétés naturelles du cuivre afin d'en exploiter seulement les propriétés radioactives.



**Figure 32 : Imagerie TEP de la biodistribution du  $^{64}\text{CuCl}_2$  aux temps 1 h et 3 h post-injection (n=2, A = 8,1 MBq) ; coupe coronale corps entier**

Le radionucléide non complexé par nos ligands a été injecté sur rats sains afin de renseigner sa biodistribution (Figure 32). Les images TEP aux deux temps p.i. montrent une forte accumulation de la radioactivité dans le foie, les reins et la vessie.

Les résultats de biodistribution dans la vessie et les reins présentent une élimination rapide du radionucléide. En effet à 3 h p.i. les reins ont éliminé 43% de la radioactivité présente au temps 1 h p.i. et près de 68% pour la vessie.

Le foie stocke le radionucléide plus longtemps puisqu'entre 1 h p.i. et 3 h p.i. seul 16% de la radioactivité a été éliminé. Ces résultats sont en faveur d'une accumulation du cuivre-64 dans le foie, organe qui s'avère être un lieu de stockage naturel pour le cuivre dans l'organisme.

En effet, le cuivre est un oligo-élément indispensable à la vie. Parmi ses nombreuses actions, nous pouvons citer son rôle actif dans la stimulation des défenses naturelles lors des états infectieux et inflammatoires. C'est également un catalyseur nécessaire à la constitution de la molécule d'hémoglobine, en association avec le fer. Le cuivre est transporté par la circulation sanguine au moyen d'une glycoprotéine, la céruloplasmine. Son stockage est

essentiellement dans le foie, d'où il est excrété au sein de la bile. Bien que les besoins journaliers soient de 2 à 5 mg pour un adulte, une accumulation du cuivre peut cependant être néfaste et entraîner des pathologies sévères.

## B. CBFs dérivés du cyclame

### 1. $^{64}\text{Cu}$ -14-4 NTP (composé 62)

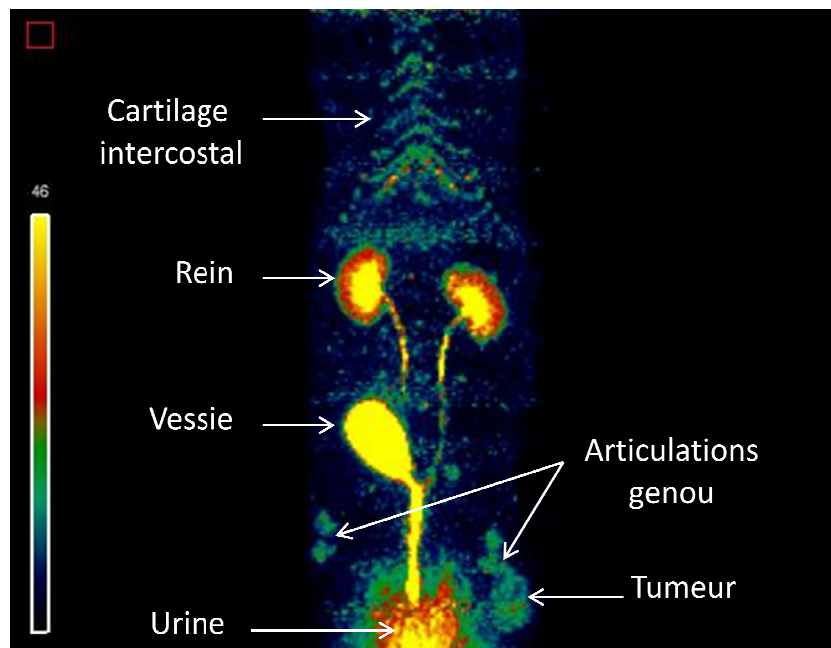


Figure 33 : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 62 (A = 12 MBq) ; coupe coronale corps entier

Le radiotracer 62 a été injecté sur des rats porteurs de chondrosarcome au niveau du tibia (Figure 33). Au temps 1 h p.i., l'image TEP montre une fixation du radiotracer dans le cartilage articulaire ( $5,9\% \text{ DI/g} \pm 2,3$ ) et la tumeur ( $5,2\% \text{ DI/g} \pm 2,1$ ). La concentration de radioactivité dans ces tissus est en faveur de la spécificité du radiotracer pour les protéoglycanes du cartilage.

Toutefois, la présence relativement élevée de radioactivité dans le foie ( $3,4\% \text{ DI/g} \pm 2,7$ ) montre que ce radiotracer subit une démétallation (ou une transmétallation) partielle *in vivo* conduisant à la présence de cuivre-64 libre dans l'organisme. Ce dernier peut alors être métabolisé de façon classique par le foie.

Les rapports de fixation organes cibles / organes non cibles de 1 h et 3 h (tableau 26) mettent en avant la bonne spécificité de ce radiotracer vis-à-vis des organes cibles par rapport aux organes non cibles, permettant ainsi l'obtention d'images avec un bon contraste. Un atout de ce radiotracer est une élimination de la radioactivité plus rapide dans les organes non cibles que dans les organes cibles (rapports plus élevés pour le temps à 3h). A noter que, si la fixation au temps court est du même ordre de grandeur pour les cartilages articulaires et tumoraux, l'élimination semble légèrement plus rapide pour le chondrosarcome.

**Tableau 26 : Rapports de fixation pour le composé 62**

	<b>1 h</b>	<b>3 h</b>
<b>Cartilage articulaire / Foie</b>	1,74	3,06
<b>Tumeur / Foie</b>	1,53	1,56
<b>Cartilage articulaire / Muscle</b>	3,93	9,08
<b>Tumeur / Muscle</b>	3,47	5,00
<b>Tumeur / Cartilage articulaire</b>	0,88	0,51

## 2. <sup>64</sup>Cu-1 PYR 14-4 NTP (composé 63)

Le radiotracer **63** a été injecté sur des rats porteurs de tumeur au niveau du tibia. Au temps 1 h p.i., on constate une fixation de la radioactivité dans le cartilage articulaire (1,5% DI/g ± 0,4) et dans la tumeur (1,4% DI/g ± 0,07).

Comme pour le radiotracer précédent, on constate la présence de radioactivité dans le foie. Cependant, en comparant les rapports de fixation organes cibles / organes non cibles à 1h des deux radiotraceurs, nous pouvons constater que le composé **63** présente une radioactivité légèrement plus importante dans le foie que pour le composé **62** (tableau 27). Ceci peut éventuellement s'expliquer par la présence d'un groupement méthylpyridine dans la structure. En effet, alors que cette fonctionnalisation a été ajoutée sur la cage dans le but de compléter la sphère de coordination du cuivre-64, sa présence peut éventuellement être néfaste *in vivo* et être à l'origine d'une démétallation. Une autre possibilité peut être que la nature de ce groupement peut présenter une affinité pour le foie.

Tableau 27 : Rapports de fixation à 1 h p.i. pour les composés 62 et 63

	Composé 62	Composé 63
Cartilage articulaire / Foie	1,74	1,25
Tumeur / Foie	1,53	1,17
Cartilage articulaire / Muscle	3,93	3,49
Tumeur / Muscle	3,47	3,25
Tumeur / Cartilage articulaire	0,88	0,93

### 3. $^{64}\text{Cu}$ -2 PYR 14-4 NTP (composé 64)

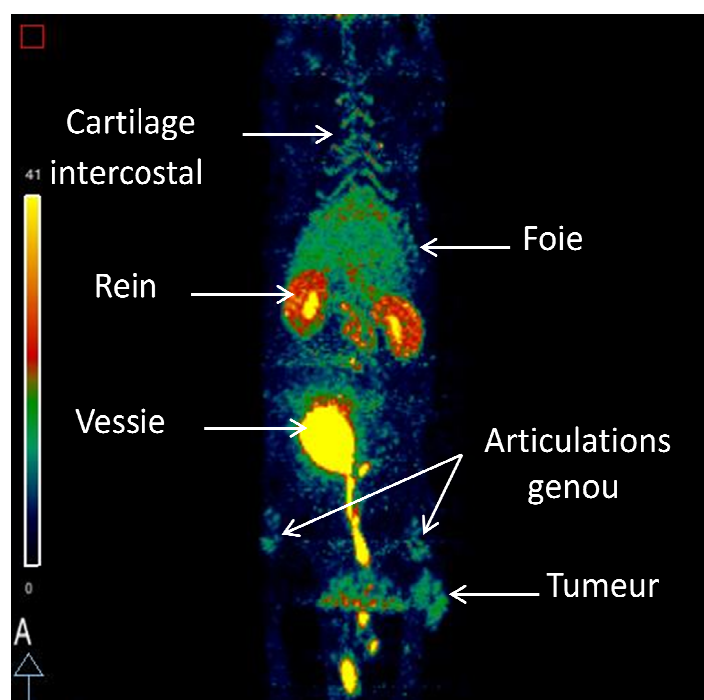


Figure 34 : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 64 (A = 12 MBq) ; coupe coronale corps entier

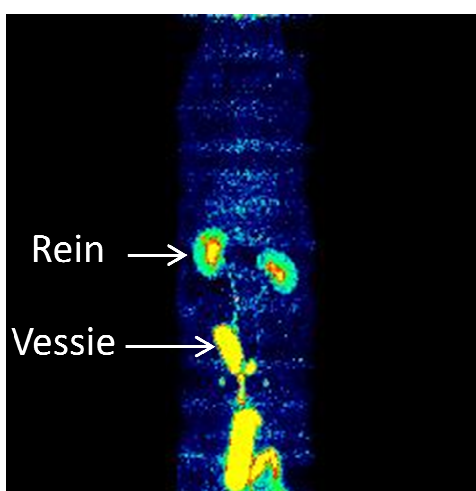
Le radiotracteur 64 a été injecté sur des rats porteurs de tumeur au niveau du tibia (Figure 34). Au temps 1 h p.i., l'image TEP montre une fixation du radiotracteur dans les mêmes zones que celles observées pour le radiotracteur 62. C'est-à-dire une concentration de la radioactivité dans le cartilage articulaire ( $2,7\% \text{ DI/g} \pm 0,4$ ) et dans la tumeur ( $4,2\% \text{ DI/g} \pm 0,6$ ).



Proportionnellement, le foie (3,9% DI/g  $\pm$  2,5) présente une fixation de la radioactivité plus grande que pour le radiotracer précédent. Deux causes peuvent être à l'origine de l'augmentation de cette fixation hépatique :

- présence d'une méthylpyridine supplémentaire qui diminue la stabilité du complexe cuivré ou/et favorise sa métabolisation par le foie,
- $^{64}\text{Cu}$  libre présent à hauteur de 10% dans le lot destiné à cette étude (cf chapitre 3 p109).

#### 4. $^{64}\text{Cu}$ -TE2A(Et)2 NTP (composé 65)



**Figure 35 : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 65 (A = 12 MBq) ; coupe coronale corps entier**

Le radiotracer 65 a été injecté sur des rats sains (Figure 35). L'image TEP à 1 h p.i. montre essentiellement une concentration de la radioactivité dans le système urinaire. Les résultats de biodistribution à 1 h p.i. présentent une faible quantité de radioactivité dans le cartilage articulaire (0,22% DI/g  $\pm$  0,03). Au temps 3h p.i., 77,3% de cette radioactivité a été éliminé de ce tissu.

Le foie concentre une quantité similaire de radioactivité à 1 h p.i. (0,18% DI/g  $\pm$  0,02) avec une fixation pérenne (0,12% DI/g  $\pm$  0,04 à 3h p.i.). La complexation du chélateur n'ayant pas été complète, la présence de radioactivité dans cet organe peut s'expliquer par la présence de cuivre-64 non complexé (10,7% ; cf chapitre 3 p111).

Au regard de ces résultats, le radiotracteur **65** ne semble pas indiqué pour permettre l'imagerie du cartilage articulaire.

### 5. <sup>64</sup>Cu-TE3A NTP (composé 68)

Le radiotracteur **68** a été injecté sur des rats sains. L'image TEP à 1 h p.i. montre une concentration de la radioactivité dans les reins et la vessie. L'élimination du radiotracteur **68** est très rapide puisque qu'entre 1 h et 3 h p.i., 73% de la radioactivité est éliminé des reins.

Ce radiotracteur présente donc une spécificité nulle pour les protéoglycanes du cartilage malgré la présence de l'AQ, fonction « vecteur ». Ceci peut s'expliquer par le fait que dans les conditions physiologiques, les fonctions « acides » des groupements sont sous la forme carboxylate. La charge globale du complexe est donc nulle. Or la charge positive de la fonction AQ est responsable de cette spécificité aux PGs.

Le foie concentre très peu la radioactivité (0,19% DI/g ± 0,01 à 1 h p.i. et 0,14% DI/g ± 0,02 à 3 h p.i.). La présence de cette dernière peut s'expliquer par la présence de cuivre-64 non complexé dans la solution de radiotracteur **68** injecté aux animaux (10,6%, cf chapitre 3 p117). Ainsi, le radiotracteur semble présenter une stabilité *in vivo* assez importante, mais son manque de spécificité pour les PGs fait qu'il est éliminé rapidement de l'organisme par les voies naturelles. Par conséquent, ce radiotracteur n'est pas un bon candidat pour l'imagerie du cartilage.

### 6. <sup>64</sup>Cu-SB TE1A(tBu) NTP (composé 69)

Le radiotracteur **69** a été injecté sur des rats sains. L'image TEP à 1 h p.i. montre une concentration de la radioactivité dans les reins et la vessie. L'élimination du radiotracteur **69** est très rapide puisque qu'entre 1 h et 3 h p.i., environ 70% de la radioactivité est éliminé des reins.

Le foie fixe très peu la radioactivité (0,06% DI/g ± 0,01 à 1 h p.i. et 0,04% DI/g ± 0,00 à 3 h p.i.), en comparaison des données relevées pour les radiotraceurs précédents. La

structure renforcée de la cage est effectivement en faveur d'une augmentation de la stabilité *in vivo* pour ce type de complexe. La radioactivité éliminée de l'organisme est donc toujours sous forme complexée.

Malgré cette faible fixation hépatique de la radioactivité, l'absence de spécificité pour les PGs fait que ce radiotraceur n'est pas un bon candidat pour l'image du cartilage.

## 7. <sup>64</sup>Cu-SB TE1A NTP (composé 70)

Le radiotraceur **70**, équivalent hydrolysé du radiotraceur **69**, a été injecté sur des rats sains. Comme précédemment, l'image TEP à 1 h p.i. montre une concentration de la radioactivité dans les reins et la vessie, et une élimination rapide de l'organisme.

La même conclusion que précédemment peut être donnée pour ce radiotraceur. Ainsi, il ne présente aucun tropisme pour les PGs du cartilage, excluant son intérêt pour l'imagerie du cartilage, et sa stabilité *in vivo* est également mise en avant par la faible concentration de radioactivité dans le foie et s'explique par la présence du renforcement dans la structure macrocyclique.

## C. CBFs dérivés du cyclène

### 1. <sup>64</sup>Cu-12-4 NTP (composé 71)

Le radiotraceur **71** a été injecté sur des rats porteurs de tumeur au niveau du tibia. L'image TEP montre une clairance rapide du radiotraceur par la voie urinaire. Aucune radioactivité n'a été détectée aux niveaux des organes cibles (articulations, tumeur).

L'absence de fixation dans le foie est en faveur d'une bonne stabilité *in vivo* du radiotraceur. Cependant, l'absence totale de spécificité pour les PGs fait que ce radiotraceur n'est pas indiqué pour l'imagerie du cartilage.

## 2. $^{64}\text{Cu}$ -1 PYR 12-4 NTP (composé 72)

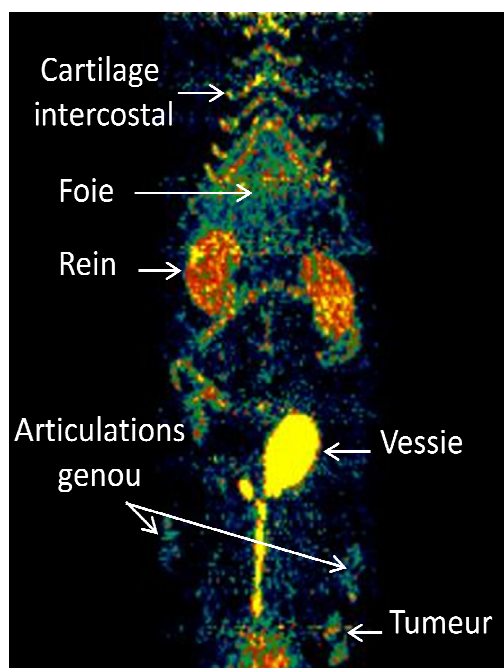


Figure 36 : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 72 (A = 12 MBq) ; coupe coronale corps entier

Le radiotracteur 72 a été injecté sur des rats porteurs de tumeur au niveau du tibia (Figure 36). L'image TEP à 1 h p.i. montre une fixation de la radioactivité au niveau du cartilage articulaire ( $0,56\% \text{ DI/g} \pm 0,03$ ) ainsi que dans la tumeur ( $0,64\% \text{ DI/g} \pm 0,03$ ).

Le foie concentre la radioactivité de façon plus importante ( $4,3\% \text{ DI/g} \pm 1,5$  à 1 h p.i.). Initialement, le lot injecté ne contenait pas de cuivre-64 non complexé. Tout comme pour les composés pyridiniques dérivés du cyclame, cette concentration dans le foie peut s'expliquer par la décomplexation (et/ou transmétallation) du radionucléide *in vivo* ou par la métabolisation du complexe pyridinique.

### 3. $^{64}\text{Cu}$ -2 PYR 12-4 NTP (composé 73)

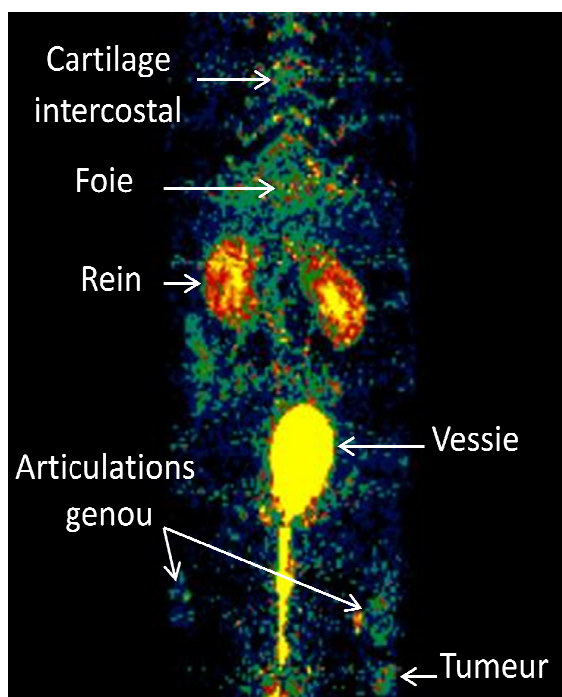


Figure 37 : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé **73** (A = 12 MBq) ; coupe coronale corps entier

Le radiotracteur **73** a été injecté sur des rats porteurs de tumeur au niveau du tibia (Figure 37). L'image TEP à 1 h p.i. peut être rapprochée de celle du radiotracteur précédent. Les valeurs de biodistribution présentent une concentration de la radioactivité similaire au niveau des tissus cartilagineux : cartilage articulaire (0,60% DI/g  $\pm$  0,09) et tumeur (0,60% DI/g  $\pm$  0,06).

Le foie présente néanmoins une fixation moins importante que pour le radiotracteur précédent (0,66% DI/g  $\pm$  0,60), en faveur d'une stabilité plus importante du chélate. La présence d'un hétéroatome supplémentaire pouvant compléter la sphère de coordination du cuivre-64 peut être à l'origine de cette stabilité accrue.

### 4. $^{64}\text{Cu}$ -DO3A NTP (composé 75)

Le radiotracteur **75** a été injecté sur des rats porteurs de tumeur au niveau du tibia. L'image TEP à 1h p.i. permet de distinguer uniquement les reins et la vessie. Les biodistributions présentent des valeurs de concentrations faibles de radioactivité dans les tissus cartilagineux :

- cartilage articulaire : 0,12% DI/g  $\pm$  0,07 à 1 h p.i. et 0,06% DI/g  $\pm$  0,05 à 3 h p.i.
- tumeur : 0,18% DI/g  $\pm$  0,08 à 1 h p.i. et 0,10% DI/g  $\pm$  0,08 à 3 h p.i.

Le foie présente un taux de radioactivité plus important que les tissus cibles (0,22% DI/g  $\pm$  0,12 à 1 h p.i. et 0,15% DI/g  $\pm$  0,10 à 3 h p.i.). En effet, la solution de radiotracer **76** injectée aux animaux présentait un taux non négligeable de cuivre-64 non complexé (13%, cf chapitre 3 p127).

De même que pour le radiotracer **68**, la charge globale du complexe est ici nulle, les trois groupements étant sous la forme carboxylate dans les conditions physiologiques. Cette caractéristique pour expliquer l'absence de tropisme de ce radiotracer pour les GPs.

Ce radiotracer présente également une toxicité non négligeable. En effet plusieurs animaux sont morts suite à l'injection du produit, les autres souffraient de problèmes respiratoires avec présence de sang dans leurs urines. Par conséquent, ce radiotracer n'est pas indiqué pour l'imagerie TEP du cartilage.

### 5. <sup>64</sup>Cu-3 Bz 12-4 NTP (composé 76)

Le radiotracer **76** a été injecté sur des rats porteurs de tumeur au niveau du tibia. L'image TEP à 1 h p.i. ne permet de distinguer que le système urinaire. Au même temps, les tissus cartilagineux présentent des valeurs de fixation faibles de la radioactivité :

- cartilage articulaire : 0,25% DI/g  $\pm$  0,08
- tumeur : 0,25% DI/g  $\pm$  0,05.

Le foie présente un fort taux de radioactivité à 1 h p.i. (1,45% DI/g  $\pm$  0,05). Cette dernière peut être la conséquence d'une instabilité *in vivo* du radiotracer **76**, mais également d'une métabolisation du complexe dans le foie. Ce radiotracer n'est donc pas indiqué pour l'imagerie du cartilage.

## D. CBFs dérivés de la 15-5

### 1. $^{64}\text{Cu}$ -15-5 NTP (composé 77)

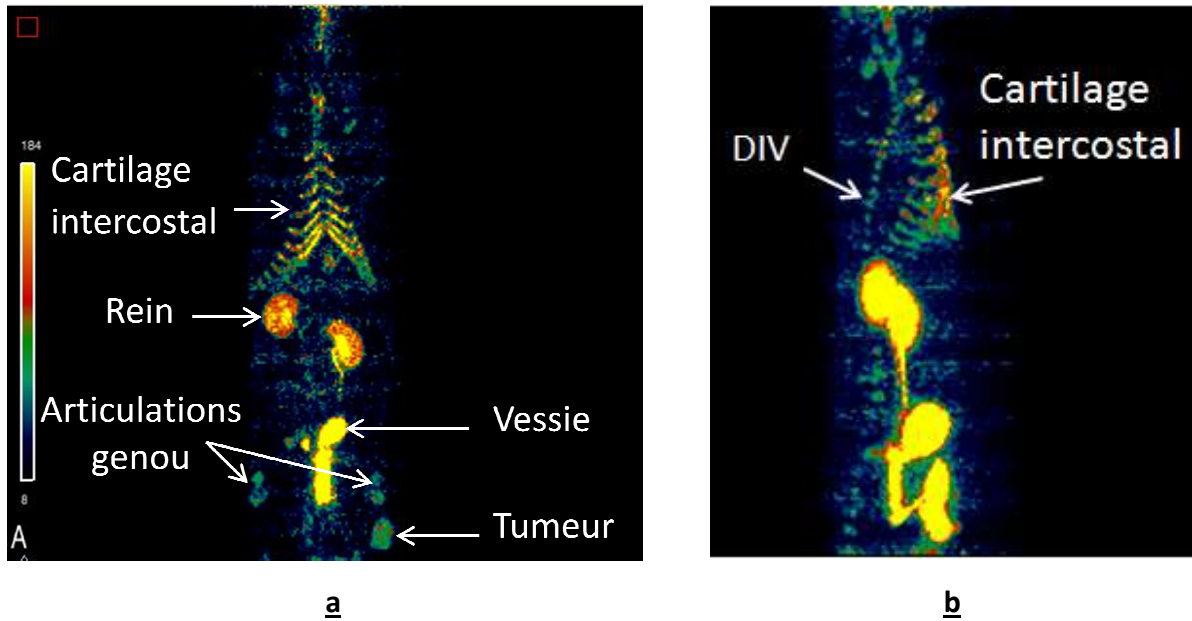


Figure 38 : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 77 (A = 12 MBq) ; coupe coronale corps entier (a), coupe sagittale corps entier (b)

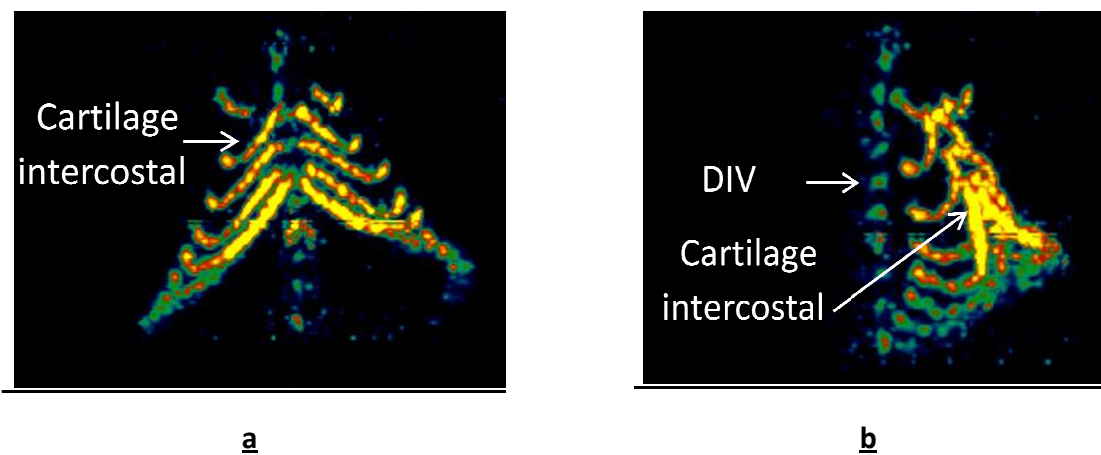
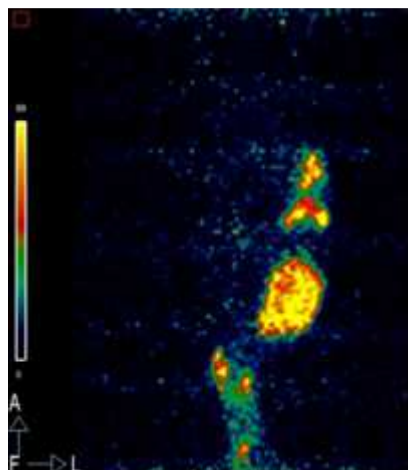


Figure 39 : Imagerie TEP 1 h p.i. du composé 77 (A = 12 MBq) ; coupe coronale cage thoracique (a), coupe sagittale cage thoracique (b)



**Figure 40 : Imagerie TEP 3 h p.i. du composé 77 (A = 12 MBq) ; prélèvement tumeur**

Le radiotracteur **77** a été injecté sur des rats porteurs de tumeur au niveau du genou (Figures 38, 39 et 40). L'image TEP à 1 h p.i. montre une fixation de la radioactivité aux niveaux des tissus cibles. Les valeurs de biodistribution au même temps démontrent une intense concentration de la radioactivité aux niveaux :

- du cartilage articulaire : 2,6% DI/g  $\pm$  1,1
- de la tumeur : 3,5% DI/g  $\pm$  0,5.

L'absence de fixation de la radioactivité dans le foie à 1 h p.i. est en faveur d'une bonne stabilité *in vivo* du chélate.

Les résultats de biodistribution présentent une élimination de la radioactivité dans les reins de près de 95% entre les temps 1h p.i. et 3h p.i.

Ce radiotracteur est un bon candidat pour l'imagerie du cartilage. En effet, on observe une bonne fixation de la radioactivité dans les organes cibles, une très faible fixation dans les organes non cibles, une absence de fixation hépatique et enfin une clairance rapide.

## 2. <sup>64</sup>Cu-4A 15-5 NTP (composé 78)

Le radiotracteur **78** a été injecté sur des rats sains. L'image TEP à 1 h p.i. montre une fixation de la radioactivité dans le système urinaire. Le tissu cible ne concentre pratiquement pas la radioactivité.

Le foie concentre fortement la radioactivité. Nous pouvons remarquer que la concentration est près de deux fois plus importante au temps 3 h p.i. qu'à 1 h p.i. (0,79%



DI/g  $\pm$  0,15 à 1 h p.i. et 1,27% DI/g  $\pm$  0,42 à 3 h p.i.), en faveur d'une instabilité *in vivo* ou d'une métabolisation du complexe dans le foie sur le long terme.

A noter également que dans les conditions physiologiques, les groupements sont sous la forme carboxylate, le complexe a donc une charge globale négative. L'absence de spécificité de ce radiotraceur pour les PGs est certainement la conséquence des forces répulsives entre les groupements négatifs présents dans les PGs et ceux présents sur le radiotraceur.

Ce radiotraceur n'est pas un bon candidat pour l'imagerie du cartilage du fait de sa forte concentration dans le foie et sa faible fixation dans le cartilage articulaire.

### III. Discussion

Le ciblage spécifique du cartilage a fait l'objet de plusieurs travaux. Ce ciblage est obtenu à l'aide d' :

- un anticorps monoclonal radioiodé. Ce dernier a été utilisé pour visualiser les lésions des DIV (1). Cependant les images obtenues montraient un très faible contraste.
- une ou plusieurs fonctions ammoniums quaternaires :
  - L'affinité de la fonction ammonium quaternaire pour le cartilage a été démontrée par Shindo *et al.* (2) (3) (4) lors d'études de biodistribution de composés marqués au carbone-14 possédant deux fonctions ammoniums quaternaires, tels que le diméthonium ou le pancuronin. Ils démontrent alors une accumulation rapide du radiotraceur dans les tissus riches en PGs.
  - A partir des années 78, Korn et Huang (5) (6) ont étudiés l'hexaméthonium marqué au carbone-14, une molécule linéaire possédant deux fonctions ammoniums quaternaires. Leurs études de biodistribution sur des rats sains ont montré une accumulation du radiotraceur à 30 minutes p.i. dans les tissus cartilagineux, tels que la trachée (1,350  $\pm$  0,476 %Di/g) et les DIV (1,094  $\pm$  0,531 %Di/g). Plus tard, les homologues radioiodés à l'iode-125 ont été injectés sur des rats porteurs de chondrosarcome, ils ont mis en évidence une accumulation des radiotraceurs dans

la tumeur de l'ordre de 0,60% DI/g. Cependant, ce type de radionucléide est difficile à utiliser pour l'imagerie *in vivo*.

- Dans la continuité de ce travail, Yu *et al.* (7) ont développé un nouveau radiotraceur basé sur l'introduction du sélénium-75 dans la structure de l'hexaméthonium. Ils observent une accumulation de leur radiotraceur dans le cartilage de 0,34 %DI/g. Cependant, le sélénium-75 présente un temps de demi-vie de 120 jours avec une énergie moyenne d'environ 200 KeV, peu adaptés à l'imagerie scintigraphique.
- En 2010, Gibbs-Strauss *et al.* ont vectorisé des fluorophores à l'aide d'ammoniums quaternaires. Ils ont ainsi pu obtenir des images de fluorescence des DIV. De surcroît, grâce à une injection concomitante d'un traceur osseux, ils ont pu démontrer la spécificité de leurs fluorophores vis-à-vis des PGs.
- En 2011, Janier *et al.* (8) ont développés de nouvelles nanoparticules fonctionnalisées pour le ciblage des PGs pour le diagnostic et la thérapie du cancer. Sur ces nanoparticules ont été greffées d'une part des fonctions ammoniums quaternaires pour le ciblage spécifique des tissus cartilagineux pour le diagnostic du chondrosarcome, d'autre part des DOTA, permettant la complexation de gadolinium pour un usage en IRM ou de l'indium-111 pour la TEMP. Cette étude réalisée par une équipe de Lyon en collaboration avec notre laboratoire, montre des résultats de biodistribution des nanoparticules radiomarquées à l'indium-111 peu convaincants par rapport au radiotraceur  $^{64}\text{Cu}$ -15-5 NTP.

La littérature est assez avare sur les radiotraceurs d'imagerie spécifiques des cartilages. Les exemples les plus probants sont issus de notre équipe de recherche. En particulier, deux radiotraceurs semblaient prometteurs, la  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -14-4 NTP et la  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -15-5 NTP (9).

Le tropisme pour le cartilage du chélatant 15-5 NTP a été prouvé au laboratoire lors d'une étude comparative entre le radiotraceur  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -15-5 NTP et un traceur osseux, le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP (10). Le radiotraceur  $^{64}\text{Cu}$ -15-5 NTP ne différant seulement que par la nature du radionucléide, le même comportement pouvait être logiquement attendu.

Le tableau 28 présente les résultats de biodistribution de la  $^{64}\text{Cu}$ -14-4 NTP et de la  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -14-4 NTP.

**Tableau 28 : Biodistributions à 1 h p.i. chez le rat de la  $^{64}\text{Cu-14-4}$  NTP et de la  $^{99\text{m}}\text{Tc-14-4}$  NTP (9) ; résultats exprimés en % DI/g  $\pm$  déviation standard**

	$^{64}\text{Cu-14-4}$ NTP	$^{99\text{m}}\text{Tc-14-4}$ NTP
<b>Sang</b>	0,80 $\pm$ 1,20	0,22 $\pm$ 0,05
<b>Foie</b>	3,40 $\pm$ 2,70	4,34 $\pm$ 0,47
<b>Reins</b>	27,5 $\pm$ 10,1	2,96 $\pm$ 0,36
<b>Cartilage articulaire</b>	5,90 $\pm$ 2,30	0,52 $\pm$ 0,08
<b>Os</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,03
<b>Muscle</b>	1,50 $\pm$ 1,20	0,05 $\pm$ 0,01

Nous pouvons constater que la concentration de radioactivité dans le cartilage articulaire est beaucoup plus importante pour le radiotracer au cuivre-64 que pour l'équivalent au technétium-99m. En effet, ce dernier présente un tropisme relativement faible pour le cartilage. La concentration hépatique est assez semblable, le radiotracer  $^{99\text{m}}\text{Tc-14-4}$  NTP présentant un résultat de biodistribution légèrement plus important. L'élimination de ces deux radiotraceurs se fait par voie urinaire.

Pour conclure, le radiotracer  $^{64}\text{Cu-14-4}$  NTP présente des résultats de biodistribution supérieurs à son équivalent technétié.

Le composé jusqu'à aujourd'hui le plus prometteur et en cours de développement clinique est la  $^{99\text{m}}\text{Tc-15-5}$  NTP. Nous le comparons avec l'équivalent cuivré. Le tableau 29 présente cette comparaison.

**Tableau 29 : Biodistributions à 1 h p.i. chez le rat de la  $^{64}\text{Cu-15-5}$  NTP et de la  $^{99\text{m}}\text{Tc-15-5}$  NTP (9) ; résultats exprimés en % DI/g  $\pm$  déviation standard**

	$^{64}\text{Cu-15-5}$ NTP	$^{99\text{m}}\text{Tc-15-5}$ NTP
<b>Sang</b>	0,10 $\pm$ 0,05	0,06 $\pm$ 0,01
<b>Foie</b>	0,00 $\pm$ 0,00	2,04 $\pm$ 0,38
<b>Reins</b>	16,4 $\pm$ 6,6	3,51 $\pm$ 0,47
<b>Cartilage articulaire</b>	2,60 $\pm$ 1,10	1,29 $\pm$ 0,22
<b>Os</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,009
<b>Muscle</b>	0,40 $\pm$ 0,30	0,04 $\pm$ 0,006

Ainsi, nous pouvons constater que la concentration de la radioactivité dans le cartilage articulaire est deux fois plus importante pour le radiotracer au cuivre-64 que pour l'équivalent au technétium-99m. De plus, nous observons pour ce dernier la présence d'une concentration de radioactivité hépatique significative pour le radiotracer au technétium-99m et absente pour son homologue cuivré.

L'élimination de l'organisme de ces deux radiotraceurs est effectuée par voie urinaire.

La spécificité du radiotracer  $^{64}\text{Cu}$ -15-5 NTP et son émission permettent d'observer des images contrastées et quantifiables.

#### IV. Conclusion

Les complexes fonctionnalisés avec un ou deux groupements 2-méthylpyridines (radiotraceurs **63**, **64**, **72** et **73**) se fixent sur les tissus cibles mais la forte activité retrouvée dans le foie signe probablement une décomplexation *in vivo* et exclut ces composés d'une utilisation possible en tant que radiotraceurs comme radiopharmaceutiques potentiels.

D'autres molécules présentées ici, comme le  $^{64}\text{Cu}$ -14-4 NTP (complexe **62**) permettent une bonne visualisation du cartilage et de la tumeur. Une légère fixation hépatique est observée, sans aucune comparaison toutefois avec la forte concentration observée lors de l'injection de cuivre-64 non complexé par nos ligands.

Le meilleur candidat à ce jour semble être le  $^{64}\text{Cu}$ -15-5 NTP (complexe **77**) qui permet la visualisation des tissus cartilagineux sains (côtes, genoux, DIV ...) et tumoral (chondrosarcome) en TEP avec un excellent contraste combinée à une élimination rapide par voie urinaire et à une très faible fixation hépatique (Figure 38 et 39).

La facilité de mise en œuvre du marquage, sa stabilité cinétique *in vivo* vis-à-vis de la démétallation, sa fixation spécifique sur les tissus cibles et son élimination rapide de l'organisme font du complexe **77** un radiotracer prometteur pour des applications futures comme radiopharmaceutique en imagerie TEP des pathologies liées à une dérégulation de la concentration en protéoglycanes.



1. **Kairemo, K. J. A. et al.** In vivo detection of intervertebral disk injury using a radiolabeled monoclonal antibody against keratan sulfate. *Journal of Nuclear Medicine*. 2001, Vol. 42, 3, pp. 476-482.
2. **Shindo, H., Nakajima, E, Shigehar, E.** Autoradiographic studies on the distribution of quaternary ammonium compounds. IV Adsorption of bisonium ions to rats tissues as revealed by in vitro whole-body adsorption autoradiography. *Chem Pharm Bull*. 1975, Vol. 24, pp. 2327-2334.
3. **Shindo, H. et al.** Autoradiographic studies on the distribution of quaternary ammonium compounds. III Distribution, excretion and metabolism of <sup>14</sup>C-labeled pancuronium bromide in rats. *Chem Pharm Bull*. 1974, Vol. 22, pp. 2502-2510.
4. **Shindo, H., Takahashi, I, Nakajima, E.** Autoradiographic studies on the distribution of quaternary ammonium compounds. II Distribution of <sup>14</sup>C-labeled decamethonium, hexamethonium and dimethonium in mice. *Chem Pharm Bull*. 1971, Vol. 19, pp. 1876-1885.
5. **Huang, C. C., Korn, N, Counsell, R. E.** Potential organ- or tumor-imaging agents. 18. Radioiodinated diamines and bisquaternaries. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1979, Vol. 22, 4, pp. 449-452.
6. **Korn, N. et al.** Bisquaternary ammonium compounds as potential tumor imaging agents. *International Journal of Nuclear Medicine and Biologu*. 1978, Vol. 6, pp. 153-161.
7. **Sidney Yu, W. K. et al.** The biodistribution of [<sup>75</sup>Se]bis-[beta-(N,N,N-trimethylamino)ethyl]selenide diiodide in adult guinea pigs. *Nuclear Medicine and Biologie*. 1989, Vol. 16, 3, pp. 255-259.
8. **Janier, M. et al.** *Nanoparticules fonctionnalisées pour le ciblage des protéoglycanes et leurs applications*. FR 2 981 849 - A1, 2011.
9. **Maurizis, J.-C. et al.** Disposition in rats of N-pyridinium-propyl-cyclam, N-triethylammonium-propyl-cyclam, and N-[triethylammonium]-3-propyl-[<sup>15</sup>]ane-N5, potential cartilage imaging agents. *Drug metabolism and disposition*. 2000, Vol. 28, 4, pp. 418-422.
10. **Cachin, F. et al.** First ex vivo study demonstrating that <sup>99m</sup>Tc-NTP 15-5 radiotracer binds to human articular cartilage. *European Journal of Medicinal and Molecular Imaging*. 2011, Vol. 38, pp. 2077-2082.

## Conclusions et Perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse portent sur le développement de nouveaux radiotraceurs pour le diagnostic précoce des pathologies dégénératives et tumorales du cartilage en imagerie TEP. La stratégie de synthèse consiste à fonctionnaliser une cage macrocyclique polyazotées avec une chaîne alkyle porteuse d'une fonction « vecteur » vers les protéoglycanes du cartilage. Un isotope radioactif, le cuivre-64, émetteur  $\beta^+$  compatible avec l'imagerie TEP, sera complexé au sein de la cavité macrocyclique. Sa sphère de coordination pourra être complétée par des groupements additionnels substitués sur la cage dans le but d'augmenter la stabilité du radionucléide *in vivo*. Une telle molécule permettrait ainsi la détection précoce de dégénération du cartilage, comme dans le cas de l'arthrose, de l'arthrite ou des pathologies des disques intervertébraux mais également d'une atteinte tumorale comme dans le cas du chondrosarcome. La prise en charge thérapeutique et un suivi longitudinal pourra permettre une amélioration de la qualité de vie des patients.

La structure de ces molécules s'inspire d'un radiotraceur pour l'imagerie TEMP du cartilage développé avec succès au sein de l'unité, la  $^{99m}\text{Tc}$ -15-5 NTP (Figure 41). Ce radiotraceur a démontré son intérêt et son originalité dans le diagnostic des pathologies dégénératives et tumorales du cartilage. Afin de pouvoir le rendre utilisable en TEP, technique d'imagerie permettant la quantification absolue, il faut changer la nature du radionucléide complexé. Les travaux de cette thèse ont eu pour but de déterminer une nouvelle gamme de molécules capables d'une part, de complexer un radionucléide dont les émissions sont adaptées à l'imagerie TEP, et d'autre part d'être vectorisées vers les protéoglycanes du cartilage.

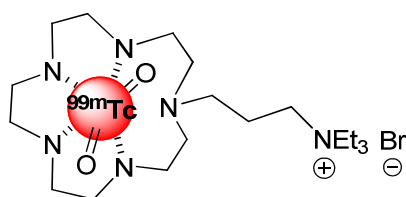
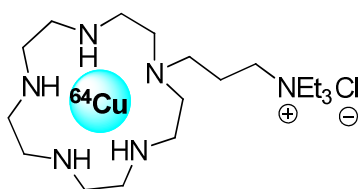


Figure 41 : Le radiotraceur  $^{99m}\text{Tc}$ -15-5 NTP

Pour répondre à ces attentes, dix-huit nouvelles molécules ont été synthétisées. Parmi celles-ci, seize ont été radiomarquées avec un cuivre-64, tout comme la molécule 15-5 NTP. Ces radiotraceurs ont été injectés sur des rats sains ou porteurs de chondrosarcome au niveau du tibia pour une étude de biodistribution et une image TEP.

Six radiotraceurs ont présentés des résultats intéressants, mais un seul a combiné un tropisme pour le cartilage articulaire et tumoral spécifique et élevé, une élimination rapide des tissus non cibles et une clairance rapide. Il s'agit de la  $^{64}\text{Cu}$ -15-5 NTP (radiotraceur **77**) (Figure 42). De plus, ce composé permet d'obtenir des images TEP avec un très bon contraste.



**Figure 42 : Le radiotraceur  $^{64}\text{Cu}$ -15-5 NTP (radiotraceur **77**)**

Des études de pharmacocinétiques sont prévues afin de comprendre son devenir dans l'organisme. La synthèse et le radiomarquage de cette molécule ont présentés des conditions opératoires et des rendements compatibles avec l'utilisation de ce radiotraceur dans les examens cliniques routiniers pour l'imagerie du cartilage.

Cette molécule n'était pas forcément celle attendue en tant que complexant du cuivre et traceur des protéoglycanes. Il reste à caractériser sa structure et à étudier sa stabilité. Une fois ces travaux réalisés, le macrocycle 15-5 pourrait après une fonctionnalisation adaptée être utilisé pour marquer d'autres molécules d'intérêt telles que des peptides ou des protéines ayant des cibles biologiques pertinentes pour l'imagerie et/ou la thérapie. On ouvrirait ainsi la voie à une nouvelle classe de radiotraceurs, radiopharmaceutiques potentiels, utilisant le  $^{64}\text{Cu}$  comme radioisotope.



Les résultats présentés dans cette thèse ont été valorisés par le dépôt d'un brevet sur les radiotraceurs **62, 63, 64, 69, 70, 71, 72, 73, 76** et **77** :

PCT/EP2015/067318, 2015 (EP14306211.5). Denis C., Gaumet V., Vidal A., Auzeloux P., Madelmont J.-C., Miot-Noirault E., Chezal J.-M. *New macrocyclic complexes, their process of preparation.*



# Partie expérimentale



## I. Matériels et méthodes

### A. Chimie

Le cyclame et le cyclène ont été commandés chez CheMatech (Dijon, France).

Les réactifs et solvants commerciaux utilisés pour les synthèses ont été fournis par Sigma-Aldrich, Acros Organics et Carlo Erba.

Les solvants et les réactifs sont utilisés sans autre purification sauf spécifiés. Quand cela était nécessaire, les solvants ont été séchés selon les techniques usuelles.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur les appareils suivants : BRUKER AVANCE 200 ( $^1\text{H}$  : 200 MHz,  $^{13}\text{C}$  : 50 MHz), BRUKER AVANCE 400 ( $^1\text{H}$  : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$  : 100 MHz) ou BRUKER AVANCE 500 ( $^1\text{H}$  : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$  : 125 MHz). Le solvant deutéré utilisé est indiqué pour chaque produit. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en partie par million (ppm) et sont calibrés par rapport au pic résiduel du solvant utilisé ou, dans le cas des spectres  $^{13}\text{C}$  effectués dans l'eau deutéré ( $\text{D}_2\text{O}$ ), par rapport à un étalon interne qui peut être de l'acétone deutéré ou du (2,2,3,3-d4)-3-triméthylsilylpropionate de sodium (TMSP-*d*4). Les constantes de couplage ( $J$ ) sont exprimées en hertz (Hz). Les multiplicités sont notées : s (singulet), d (doublet), dd (doublet dédoublé), dt (doublet de triplet), t (triplet), td (triplet dédoublé), q (quadruplet), quint (quintuplet), m (multiplet). Tous les spectres ont été enregistrés à 298 K.

Les spectres infrarouges (IR) ont été enregistrés sur spectromètre Nicolet IS10, par la technique d'échantillonnage de réflexion totale atténuée (ATR).

Les spectres de masse (MS) ont été enregistrés sur spectromètre Esquire-LC (Bruker Daltonics) en mode ionisation par électrospray (ESI-MS). Les échantillons analysés ont été analysés dans le solvant adéquat (acétonitrile, méthanol, eau) à une concentration avoisinant  $1 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil electrothermal IA9300 (capillaire).

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur du gel de silice flash F60 (40-63  $\mu\text{m}$ ) ou sur gel d'oxyde d'aluminium neutre 90 standardisée (63-200  $\mu\text{m}$ ) fournis par Merck, ou sur phase inverse (silicagel 90 C18) fournit par Fluka. Les chromatographies flash ont été réalisées à l'aide d'air comprimé ou d'une pompe péristaltique, avec un mélange d'élution renseignée dans les modes opératoires et exprimés en ratio volume/volume.

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de gel de silice 60F<sub>254</sub> (Merck) ou sur des plaques d'alumine neutre 60F<sub>254</sub> (Fluka), et révélées par UV (254 nm), vapeurs d'iode, ou par le réactif de Dragendorff.

Les échanges d'ions ont été réalisés sur une résine échangeuse d'anions (DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures. La colonne est conditionnée avec par ordre d'élution : NaCl (aq) 1M, d'eau désionisée, méthanol. La colonne est rincée avec de l'eau désionisée avant d'être reconditionnée.

Les données cristallographiques pour les composés **12** et **16** ont été collectées avec un diffractomètre Bruker à quatre cercles (géométrie Kappa) à détecteur bidimensionnel de type CCD (APEX 2) et muni d'un tube à rayons X à anticathode de molybdène. La radiation Mo K $\alpha$  ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ) est sélectionnée au moyen d'un monochromateur graphite.

Un monocristal de bonne qualité et de dimensions adaptées au faisceau de rayons X incident est fixé à l'aide de colle époxy sur une fibre de verre puis transféré sur le goniomètre. L'ensemble des données a été collecté à 293 K à l'aide du logiciel APEX2 (1).

L'affinement des paramètres de la maille et l'intégration des données ont été réalisées avec le programme SAINT (1). Les positions des atomes autres que l'hydrogène ont été déterminées par des méthodes directes à l'aide du programme SHELXS97 (2) puis affinées par une méthode des moindres carrés sur  $F^2$  avec l'aide du programme SHELXS97 (2) selon un modèle anisotrope. Pour le composé **12**, les atomes d'hydrogène portés par les atomes de carbone ont été localisés géométriquement et affinés en association avec l'atome porteur. Tous les autres atomes d'hydrogène ont été localisés par différence de Fourier avant d'être affinés sans contrainte.

Les représentations moléculaires sont réalisées à l'aide du programme ORTEP-3 pour Windows (3).

## **B. Radiochimie**

Le cuivre-64 (en solution aqueuse d'acide chlorhydrique 0,1N) est fourni par le laboratoire « Conditions Extrêmes et Matériaux : Haute Température et Irradiation » CNRS-CEMHTI UPR3079 basé sur le site du cyclotron à Orléans (France).

La pureté radiochimique est contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM) sur papier ITLC (Instant Thin Layer Chromatography), avec un mélange d'élution renseigné dans le chapitre 3 et exprimé en ratio volume/volume. Les CCM sont analysées par autoradiographie quantitative sur AMBIS 400 (Scanalytics, CSPI, San Diego, CA, USA).

## **C. Biologie**

L'élaboration et la réalisation des protocoles expérimentaux se sont déroulées dans le respect du bien-être animal en prenant en compte les composantes éthiques et réglementaires de l'expérimentation animale.

### **1. Biodistribution**

La distribution tissulaire quantitative des composés radiomarqués est évaluée sur rats sains ou porteurs de chondrosarcome (modèle SWARM) implanté en situation orthotopique au niveau du tibia au stade J30 post implantation. Les études de distribution sont réalisées à 1 h (n = 3 rats) après l'administration intraveineuse, sous anesthésie générale, au niveau de la veine caudale des molécules radiomarquées (5 à 10 MBq / animal). L'anesthésie est réalisée par injection intrapéritonéale d'une combinaison de kétamine à 58 mg / kg (Imalgene 1000 ; Merial, Lyon, France) et de xylazine à 6 mg / kg (Rompun 2% ; Bayer, Leverkusen, Germany).

Au temps défini (1 h), les animaux anesthésiés sont sacrifiés et les organes d'intérêt sont prélevés (os, muscle, cartilage articulaire, reins, foie, sang...), pesés et l'activité est comptée pendant une minute au moyen d'un compteur gamma (Wizard automatic gamma counter, Perkin Elmer, USA).

Après correction de la décroissance radioactive, les résultats sont exprimés en % de dose injectée par gramme d'organe pour chaque animal puis moyennés.

## 2. Imagerie TEP

Pour chaque composé (n = 2 ou 3 rats), une imagerie TEP corps entier d'une durée de 50 min (5 positions de lit) est effectuée à 1 h ou 3 h, après administration des composés radiomarqués (12 MBq / animal ; voie intraveineuse), à l'aide d'une caméra TEP dédiée au petit animal (Explore Vista®, GE Healthcare) avec une fenêtre en énergie réglée sur [250-700 keV].

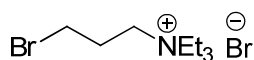
Après acquisition, les images sont obtenues par reconstruction itérative FORE/2DOSEM.

## II. Synthèses

### Réactif de Dragendorff

Une solution de nitrate de bismuth (0,17 g, 0,43 mmol) dans un mélange d'eau désionisée (8 mL) et d'acide acétique (2 mL) est additionnée à une solution d'iodure de potassium (4 g, 24 mmol) dans un mélange d'eau désionisée (20 mL) et d'acide acétique (10 mL). Après agitation du milieu réactionnel pendant quelques minutes, le volume est ajusté à 100 mL avec de l'eau désionisée.

### Bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (composé **1**)



Une solution de triéthylamine (9,8 mL, 69 mmol) dans l'acétone anhydre est ajoutée goutte à goutte à une solution de 1,3-dibromopropane (10 mL, 98,5 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 18 heures à température ambiante. Le précipité blanc qui se forme est filtré, lavé à l'acétone anhydre (2 x 10 mL) puis séché au dessiccateur pour conduire au composé **1** (18 g, 59,3 mmol) sous la forme d'un solide blanc.



Tf : 152°C

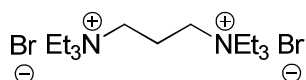
**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ = 1,29 (t, 9H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7,3 Hz), 2,21-2,35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-β-N), 3,27-3,41 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,56 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Br, J=6,4 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, D<sub>2</sub>O+acétone-d<sub>6</sub>) :** δ = 8,0 (3C, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-), 25,6 (1C, CH<sub>2</sub>-β-N), 30,6 (1C, CH<sub>2</sub>-Br), 54,1 (3C, CH<sub>2</sub>-α-N), 56,6 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N)

**ESI-MS m/z :** 222,06 ; valeurs théoriques pour C<sub>9</sub>H<sub>21</sub>Br<sub>2</sub>N – Br<sup>-</sup> [M-Br]<sup>+</sup> : 222,09

**IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>) :** 3462, 2977, 1478, 1461, 1040, 1226, 1173, 799

### Bromure de *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>3</sup>-hexaéthylpropane-1,3-diaminium (composé 2)

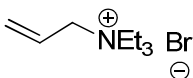


Produit secondaire obtenu lors de la synthèse du composé 1 (voir chapitre 2). Ce produit a été isolé après purification du brut réactionnel sur colonne d'alumine éluée avec un mélange dichlorométhane/méthane, 90/10, v/v (Rf ≈ 0).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O+TMSP-d<sub>4</sub>) :** δ = 1,29 (t, 18H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7,2 Hz), 2,10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-β-N), 3,26-3,31 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,35 (q, 12H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7,4 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O+TMSP-d<sub>4</sub>) :** δ = 7,6 (6C, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-), 15,7 (1C, CH<sub>2</sub>-β-N), 53,6 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 54,0 (6C, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-)

### Bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropylaminium (composé 3)



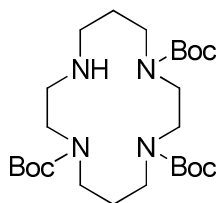
Produit secondaire obtenu lors de la synthèse du composé 1 (voir chapitre 2). Ce produit a été isolé après purification du brut réactionnel sur colonne d'alumine éluée avec un mélange dichlorométhane/méthane, 90/10, v/v (Rf = 0,05).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O+TMSP-d<sub>4</sub>)** : δ = 1,30 (t, 9H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7,2 Hz), 3,28 (q, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7,2 Hz), 3,83 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-α-N, J=7,6 Hz), 5,68-5,71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 5,92-6,02 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-)

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O+ TMSP-d<sub>4</sub>)** : δ = 6,63 (3C, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-), 52,4 (3C, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-), 58,9 (1C, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 124,0 (1C, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-), 127,9 (1C, CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-)

**HRMS (TOF MS ES+)** : 142,1601; valeur théorique pour C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>BrN – Br<sup>-</sup> [M-Br]<sup>+</sup> : 142,1596

#### 1,4,8-Tris-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane (composé 4)



Le composé **4** a été synthétisé selon la méthode décrite par Fabbrizzi et coll. (4).

Une solution de dicarbonate de di-*tert*-butyl (3,21 mL, 15 mmol) dans le dichlorométhane (20 mL) est ajoutée goutte à goutte à un mélange de cyclame (1g, 5 mmol) et de triéthylamine (3,51 mL, 25 mmol) dans le dichlorométhane (40 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 18 heures, puis la phase organique est lavée avec une solution aqueuse de carbonate de potassium 0,5 M (3 x 50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le solide blanc obtenu est ensuite purifié sur colonne de silice (dichlorométhane/méthanol, 90/10, v/v) pour conduire au composé **4** (R<sub>f</sub> = 0,54, dichlorométhane/méthanol, 90/10) sous la forme d'une mousse blanche (2,05 g, 4,1 mmol).

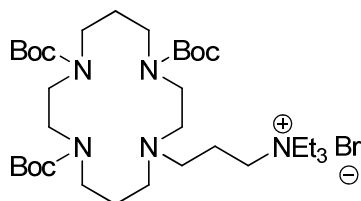
Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 1,41 (s, 27H, CH<sub>3</sub>), 1,67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-β-N), 1,88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-β-N), 2,58 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-α-N, J=6 Hz), 2,75 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-α-N, J=6 Hz), 3,31 (m, 12H, CH<sub>2</sub>-α-N)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 28,4 (11C, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-β-N), 44,0 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 45,8 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 46,6 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 47,6 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 49,9 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 50,5 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 79,3 (2C, C-CH<sub>3</sub>), 79,4 (1C, C-CH<sub>3</sub>), 155,4 (2C, CO), 156,3 (1C, CO)

**ESI-MS m/z** : 501,34 ; valeur théorique pour C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 501,37

**IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>)** : 2975, 2932, 1699, 1480, 1417, 1172

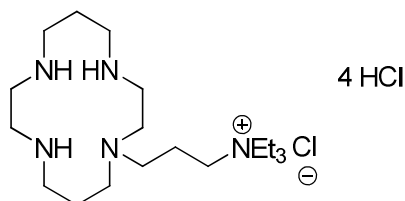
**Bromure*****N,N,N*-triéthyl-3-(1,4,8-tris-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)propan-1-aminium (composé 5)**

Une solution de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (254 mg, 0,84 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (15 mL) est ajoutée goutte à goutte à une suspension de composé **4** (420 mg, 0,84 mmol) et de carbonate de potassium (116 mg, 0,84 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (30 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à 80°C pendant 18 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré, et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (acétate d'éthyle/éthanol, 100/0 puis 80/20, v/v) pour conduire au composé **5** ( $R_f = 0,34$ , acétate d'éthyle/éthanol, 80/20) sous la forme d'une huile (288 mg, 0,40 mmol).

**RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :**  $\delta = 1,24\text{-}1,27$  (m, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1,44 (s, 27H,  $\text{CH}_3$ ), 1,71-1,83 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-N}$ ), 2,54-2,72 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 3,28-3,41 (m, 20H,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ +acétone- $d_6$ ) :**  $\delta = 7,10$  (3C,  $\text{CH}_3$ ), 18,8 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-N}$ ), 25,9 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-N}$ ), 28,2 (9C,  $\text{CH}_3$ ), 46,7 (2C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 47,2 (2C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 48,0 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 51,0 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 51,8 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 53,1 (4C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 55,0 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 55,2 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 62,7 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 81,6 (3C, C- $\text{CH}_3$ ), 157,4 (3C, CO)

**ESI-MS  $m/z$  :** 642,61 ; valeur théorique pour  $\text{C}_{34}\text{H}_{68}\text{BrN}_5\text{O}_6 - \text{Br}^-$   $[\text{M}-\text{Br}]^+$  : 642,52

**Chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)propan-1-aminium (composé 6)**

Le composé **5** (0,87 g, 1,20 mmol) est mis en suspension dans une solution d'acide chlorhydrique 2 M dans l'éther éthylique anhydre (10 mL). Le milieu réactionnel est agité à

température ambiante pendant 18 heures. Après évaporation sous pression réduite, le composé obtenu est repris par de l'eau désionisée (5 mL) puis déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluée par de l'eau désionisée. Après évaporation des fractions d'intérêt, le produit obtenu est repris dans une solution HCl 2M (5mL). Après évaporation du milieu réactionnel, le solide obtenu est séché au dessiccateur sous vide pour conduire au composé **6** sous forme d'un solide blanc (0,57 g, 1,08 mmol).

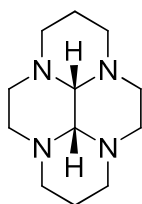
**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 1,18 (m, 9H, CH<sub>3</sub>), 2,12 (m, 6H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,23-3,70 (m, 26H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, D<sub>2</sub>O+acétone-*d*<sub>6</sub>) :**  $\delta$  = 7,0 (3C, CH<sub>3</sub>), 17,7 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 18,2 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 18,7 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 37,0 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 37,5 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 41,0 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 41,5 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 45,2 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 48,3 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 52,3 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 53,0 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 53,3 (3C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N)

**ESI-MS *m/z* :** 342,33, 171,63 ; valeurs théoriques pour C<sub>19</sub>H<sub>44</sub>ClN<sub>5</sub> - Cl<sup>-</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> : 342,36, C<sub>19</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub> [M+H]<sup>2+</sup> : 171,69

**IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) :** 3396, 2924, 1549, 1471, 1102

#### ***cis*-Décahydro-1*H*,6*H*-3*a*,5*a*,8*a*,10*a*-tétraazapyrène (composé **7**)**



Le composé **7** a été synthétisé selon la méthode décrite par Weisman et coll. (5).

Une solution de cyclame (1 g, 5 mmol) et de glyoxal (40% dans l'eau, m/m) (573  $\mu$ L, 5 mmol) dans le méthanol (20 mL) est agitée pendant 4 heures à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et le produit obtenu est mis en suspension dans l'éther éthylique (20 mL) pendant 12 heures. Les polymères sont éliminés par filtration et le filtrat est évaporé pour donner le composé **7** sous la forme d'une huile jaune (1,08 g, 4,9 mmol).

Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 1,12 (dd, 2H, CH<sub>2eq</sub>-β-N, J=13, 3,3 Hz), 2,20 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-α-N), 2,64 (d, 2H, CH<sub>2ax</sub>-β-N, J=10 Hz), 2,82 (s, 6H, CH<sub>2</sub>-α-N), 2,99 (s, 2H, N-CH), 3,43 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-α-N, J=10 Hz)

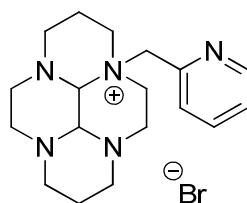
**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 19,9 (2C, CH<sub>2</sub>-β-N), 45,1 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 52,8 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 54,7 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 56,4 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 77,4 (2C, CH)

**R<sub>f</sub>** : ( Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5, I<sub>2</sub>) 0,74

**ESI-MS m/z** : 223,14 ; valeur théorique pour C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 223,19

**IR (ATR) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>** : 2934, 2855, 2805, 1438

**Bromure de 3a-(pyridin-2-ylméthyl)-cis-décahydro-1H,6H-5a,8a,10a-triaza-3a-azoniapyrène (composé 8)**



Le composé **8** a été synthétisé selon la méthode décrite par Le Baccon et coll. (6).

Du bromohydrate de 2-bromométhylpyridine (1,14 g, 4,5 mmol) est ajouté à une solution aqueuse de soude (3 M) (20 mL). A la fin de l'effervescence, la 2-bromométhylpyridine est extraite avec de l'éther éthylique (3 x 20 mL). Les fractions organiques sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées sous pression réduite. La 2-bromométhylpyridine est solubilisée dans du tétrahydrofurane anhydre (20 mL) et ajoutée à une solution de **7** (1,00 g, 4,5 mmol) dans du tétrahydrofurane anhydre (20 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 7 jours à température ambiante. Le précipité rouge formé est filtré, lavé au tétrahydrofurane anhydre (20 mL), et séché sous pression réduite pour donner le composé **8** sous forme d'un solide rose (1,0 g, 2,6 mmol).

Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

**Tf** : 148°C

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O)** : δ = 1,42 (d, 1H, CH<sub>2eq</sub>-β-N, J=15 Hz), 1,74 (d, 1H, CH<sub>2ax</sub>-β-N, J=15 Hz), 2,26 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-α-N, CH<sub>2eq</sub>-β-N, CH<sub>2ax</sub>-β-N), 2,50 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,08 (m, 5H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,48 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,88 (s, 1H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,74 (d, 1H, CH, J=3 Hz), 4,24 (td, 1H, CH<sub>2</sub>-α-

N,  $J=12$ , 3 Hz), 4,33 (d, 1H, CH,  $J=3$  Hz), 4,89 (système AB, 2H,  $CH_2-C_{Ar}$ ,  $J=36$  Hz), 7,57 (td, 1H,  $CH_{Ar}$ ,  $J=6$ , 2 Hz), 7,67 (d, 1H,  $CH_{Ar}$ ,  $J=9$  Hz), 7,96 (td, 1H,  $CH_{Ar}$ ,  $J=9$ , 3 Hz), 8,65 (d, 1H,  $CH_{Ar}$ ,  $J=6$  Hz)

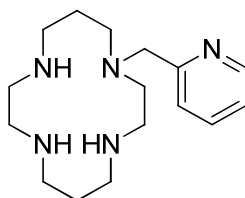
**RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $D_2O+acetone-d_6$ )** :  $\delta$  = 20,6 (1C,  $CH_2-\beta-N$ ), 21,0 (1C,  $CH_2-\beta-N$ ), 44,5 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 49,2 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 52,0 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 53,9 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 54,5 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 55,9 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 56,6 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 63,1 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 65,5 (1C,  $CH_2-C_{Ar}$ ), 72,1 (1C, CH), 84,8 (1C, CH), 128,4 (1C,  $CH_{Ar}$ ), 131,6 (1C,  $CH_{Ar}$ ), 141,2 (1C,  $CH_{Ar}$ ), 149,2 (1C,  $CH_{Ar}$ ), 152,9 (1C,  $C_{Ar}$ )

**R<sub>f</sub>** : ( $Al_2O_3$ ,  $CH_2Cl_2/MeOH$ , 90/10,  $I_2$ ) 0,72

**ESI-MS  $m/z$**  : 314,25 ; valeur théorique pour  $C_{18}H_{28}BrN_5 - Br^- [M-Br]^+$  : 314,23

**IR (ATR)  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ )** : 3033, 2955, 2896, 2837, 1444, 1152, 758

### 1-N-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécane (composé 9)



Le composé **9** a été synthétisé selon la méthode décrite par Le Baccon et coll. (6).

Une solution du composé **8** (383 mg, 0,96 mmol) dans de l'hydrate d'hydrazine (15 mL) est chauffée à reflux pendant 4 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est placé 12 heures à 0 °C et le précipité formé est filtré puis séché au dessiccateur sous vide pour conduire au composé **9** sous forme d'un solide blanc (180 mg, 0,62 mmol).

Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

**T<sub>f</sub>** : 67°C

**RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ )** :  $\delta$  = 1,70 (m, 2H,  $CH_2-\beta-N$ ), 1,87 (m, 2H,  $CH_2-\beta-N$ ), 2,56-2,74 (m, 19H,  $CH_2-\alpha-N$ , NH), 3,71 (s, 2H,  $CH_2-C_{Ar}$ ), 7,13 (t, 1H,  $CH_{Ar}$ ,  $J=4$  Hz), 7,58 (d, 1H,  $CH_{Ar}$ ,  $J=4$  Hz), 7,65 (t, 1H,  $CH_{Ar}$ ,  $J=4$  Hz), 8,50 (d, 1H,  $CH_{Ar}$ ,  $J=4$  Hz)

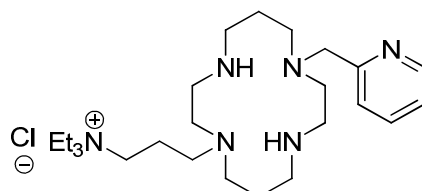
**RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ )** :  $\delta$  = 26,4 (1C,  $CH_2-\beta-N$ ), 28,7 (1C,  $CH_2-\beta-N$ ), 47,6 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 48,0 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 49,0 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 49,3 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 49,6 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 51,0 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 54,1 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 55,6 (1C,  $CH_2-\alpha-N$ ), 59,9 (1C,  $CH_2-C_{Ar}$ ), 122,3 (1C,  $CH_{Ar}$ ), 123,4 (1C,  $CH_{Ar}$ ), 136,6 (1C,  $CH_{Ar}$ ), 149,2 (1C,  $CH_{Ar}$ ), 159,8 (1C,  $C_{Ar}$ )

**R<sub>f</sub>** : (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10, réactif de Dragendorff) 0,25

**ESI-MS m/z** : 292,23 ; valeur théorique pour C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 292,25

**IR (ATR) v<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>)** 3263, 3049, 2928, 2864, 2809, 1462, 1139, 791

**Chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(8-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)propan-1-aminium (composé 10)**



Un mélange constitué du composé **9** (0,18 g, 0,62 mmol), bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (0,19 g, 0,63 mmol), de carbonate de potassium (0,09 g, 0,62 mmol) et d'acétonitrile anhydre (30 mL) est chauffé à reflux pendant 24 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré, et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (dichlorométhane/méthanol, 90/10, v/v) pour conduire à l'analogue bromé du composé **10** sous forme d'une huile orangée (0,26 g, 0,51 mmol). Ce dernier est repris dans le méthanol et déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluee par du méthanol. Les fractions d'intérêt sont évaporées sous pression réduite et le solide obtenu est séché au dessiccateur sous vide pour conduire au composé **10** sous forme d'une huile orangée (0,24 g, 0,49 mmol).

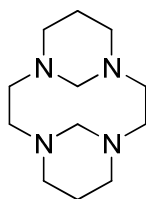
**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O)** : δ = 1,19 (t, 9H, CH<sub>3</sub>, J=8 Hz), 1,61 (m, 2H, CH<sub>2</sub>eq-β-N), 1,84 (m, 4H, CH<sub>2</sub>ax-β-N, CH<sub>2</sub>-β-N), 2,61 (m, 12H, CH<sub>2</sub>-α-N, NH), 2,77 (s, 6H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,17-3,29 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,64 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 7,31 (t, 1H, CH<sub>Ar</sub>, J=6 Hz), 7,42 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,82 (t, 1H, CH<sub>Ar</sub>, J=6Hz), 8,42 (t, 1H, CH<sub>Ar</sub>, J=6Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, D<sub>2</sub>O+acétone-d<sub>6</sub>)** : δ = 7,3 (3C, CH<sub>3</sub>), 16,4 (1C, CH<sub>2</sub>-β-N), 24,3 (2C, CH<sub>2</sub>-β-N), 46,2 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 49,3 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 50,6 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 52,1 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 53,2 (4C, CH<sub>2</sub>-α-N), 53,9 (4C, CH<sub>2</sub>-α-N), 55,3 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 59,3 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 123,7 (1C, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 125,3 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 138,6 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 149,2 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 158,1 (1C, C<sub>Ar</sub>)

**R<sub>f</sub>** : (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10, réactif de Dragendorff) 0,33

**ESI-MS m/z** : 433,40 ; valeur théorique pour C<sub>25</sub>H<sub>49</sub>ClN<sub>6</sub> - Cl<sup>-</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> : 433,40

### 1,4,8,11-tétraazatricyclo[9.3.1.1]hexadécane (composé 11)



Le composé 11 a été synthétisé selon la méthode décrite par Bailly et coll. (7).

Du formaldéhyde (37% dans l'eau, m/m) (0,51 mL, 5,0 mmol) est ajouté rapidement à une solution de cyclame (0,50 g, 2,50 mmol) dans l'eau désionisée (20 mL). Le milieu réactionnel est agité 2 heures à température ambiante. Le précipité blanc formé est filtré, lavé avec de l'eau désionisée (20 mL), puis séché au dessiccateur sous vide pour conduire au composé 11 sous forme d'un solide blanc (0,47 g, 2,10 mmol).

Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

Tf : 105°C

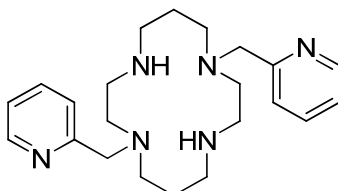
**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  = 1,17 (dq, 2H, CH<sub>2eq</sub>- $\beta$ -N,  $J$ =15, 2 Hz), 2,21-2,28 (m, 2H, CH<sub>2ax</sub>- $\beta$ -N), 2,37 (d, 4H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N,  $J$ =10 Hz), 2,61 (td, 4H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N,  $J$ =12,5, 4 Hz), 2,79-2,87 (m, 4H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 2,84 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-N), 3,14 (d, 4H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N,  $J$ =8 Hz), 5,44 (dt, 2H, N-CH<sub>2</sub>-N,  $J$ =10, 1 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  = 20,2 (2C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 49,3 (4C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 53,6 (4C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 68,9 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N)

**ESI-MS  $m/z$**  : 225,20 ; valeur théorique pour C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 225,21

**IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>)** : 2934, 2855, 2778, 1134

### 1,8-*N,N'*-bis-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane (composé 12)



Le composé 12 a été synthétisé selon la méthode de Royal et coll. (8).

Du bromohydrate de 2-bromométhylpyridine (2,78 g, 11 mmol) est ajouté à d'une solution aqueuse de soude (3 M) (20 mL). A la fin de l'effervescence, la 2-



bromométhylpyridine est extraite avec de l'éther éthylique (3 x 20 mL). Les fractions organiques sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées sous pression réduite. La 2-bromométhylpyridine est solubilisée dans du tétrahydrofurane anhydre (20 mL) et ajoutée à une solution de **11** (1,2 g, 5 mmol) dans du tétrahydrofurane anhydre (20 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 jours à température ambiante. Une solution aqueuse de soude 3 M (30 mL) est ensuite ajoutée et l'agitation est maintenue pendant 2 heures supplémentaires. Le milieu réactionnel est extrait avec du dichlorométhane (3 x 50 mL). Les fractions organiques sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées sous pression réduite pour conduire au composé **12** sous forme d'une huile rouge (1,17 g, 3,1 mmol).

Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 1,88 (quint, 4H, CH<sub>2</sub>-β-N, J=3 Hz), 2,58 (t, 8H, CH<sub>2</sub>-α-N, J=7 Hz), 2,75 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,30 (m, 2H, NH), 3,79 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>) 7,10 (td, 2H, CH<sub>Ar</sub>, J=7, 0,1 Hz), 7,34 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>, J=7 Hz), 7,56 (td, 2H, CH<sub>Ar</sub>, J=7, 0,1 Hz), 8,64 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>, J=7 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 25,4 (2C, CH<sub>2</sub>-β-N), 47,0 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 49,3 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 52,1 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 53,6 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 59,1 (2C, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 121,6 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 123,0 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 135,9 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 148,6 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 158,0 (2C, C<sub>Ar</sub>)

**R<sub>f</sub>** (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10, I<sub>2</sub>) 0,49

**ESI-MS m/z** : 383,25, 192,08 ; valeurs théoriques pour C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 383,29, C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub> + 2H<sup>+</sup> [M+2H]<sup>2+</sup> : 192,14

**IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>)** : 3060, 2944, 2818, 1447, 1127, 762

### Données cristallographiques pour le composé **12**, forme bromhydrate monohydraté.

Des monocristaux de tailles suffisantes pour une étude cristallographique ont été isolés du milieu réactionnel avant l'étape de déprotection par la solution de soude 3 M. Le milieu réactionnel est alors un mélange de composé **12** et de cyclam protégé di-alkylé.

Formule	$C_{22}H_{35}N_6^+, Br^-, H_2O$	$\mu$ ( $mm^{-1}$ )	1,736
Formule empirique	$C_{22}H_{37}BrN_6O$	Température (K)	293
Masse molaire	481,48	F(000)	1016
Système cristallin	monoclinique	$\lambda$ (Mo $K\alpha$ ) (Å)	0,71073
Groupe d'espace	$P 2_1/n$	Indices de Miller	$-10 \leq h \leq 9$
Couleur	incolore		$-27 \leq k \leq 33$
a (Å)	7,8960(5)		$-14 \leq l \leq 14$
b (Å)	26,394(2)	$\theta_{min} ; \theta_{max}$ (°)	1,928 ; 27,070
c (Å)	11,5775(8)	Nb de réflexions uniques	5099
$\beta$ (°)	95,395(4)	Nb de réflexions avec $[I > 2\sigma(I)]$	3053
Volume (Å <sup>3</sup> )	2402,2(3)	Qualité d'affinement, S	1,088
Z	4	$wR_2$ (3053 réfl)	0,1752
$d_{calc}$ (g.cm <sup>-3</sup> )	1,331	$R_1$ (3053 réfl)	0,0614

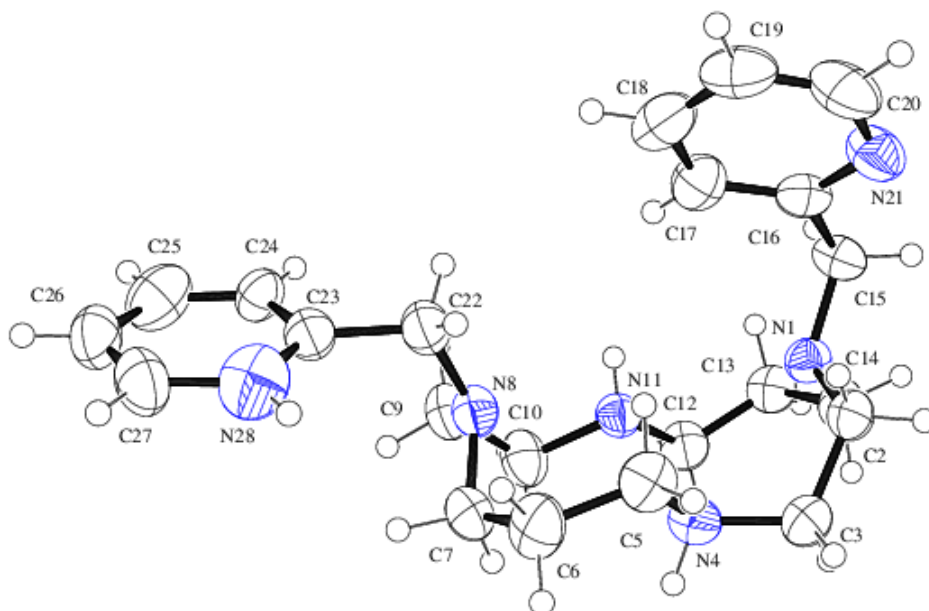


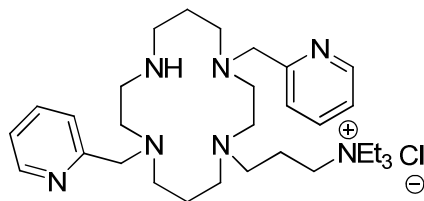
Figure ORTEP du composé **12** (la molécule d'eau et l'ion bromure sont omis pour plus de clarté). Les ellipsoïdes sont représentés au seuil de probabilité de 50%.

**Longueurs de liaisons et angles (Å, °) pour le composé 12, forme bromhydrate monohydratée.**

N1—C15	1,459 (6)	N8—C22	1,472 (7)	C18—C19	1,379 (10)
N1—C14	1,481 (6)	C9—C10	1,530 (8)	C19—C20	1,358 (9)
N1—C2	1,485 (6)	C10—N11	1,483 (7)	C20—N21	1,339 (8)
C2—C3	1,501 (7)	N11—C12	1,501 (6)	C22—C23	1,501 (7)
C3—N4	1,455 (7)	C12—C13	1,512 (7)	C23—C24	1,323 (7)
N4—C5	1,454 (7)	C13—C14	1,500 (8)	C23—N28	1,392 (8)
C5—C6	1,513 (8)	C15—C16	1,514 (7)	C24—C25	1,321 (8)
C6—C7	1,523 (8)	C16—N21	1,318 (7)	C25—C26	1,361 (9)
C7—N8	1,470 (7)	C16—C17	1,395 (8)	C26—C27	1,356 (9)
N8—C9	1,450 (7)	C17—C18	1,371 (8)	C27—N28	1,377 (8)

C15—N1—C14	108,6 (4)	N1—C15—C16	113,5 (4)
C15—N1—C2	109,8 (4)	N21—C16—C17	121,6 (5)
C14—N1—C2	111,0 (4)	N21—C16—C15	117,3 (5)
N1—C2—C3	113,2 (4)	C17—C16—C15	121,1 (5)
N4—C3—C2	112,9 (4)	C18—C17—C16	119,1 (6)
C5—N4—C3	113,3 (5)	C17—C18—C19	119,0 (6)
N4—C5—C6	112,5 (5)	C20—C19—C18	118,2 (6)
C5—C6—C7	114,6 (4)	N21—C20—C19	123,6 (6)
N8—C7—C6	112,8 (5)	C16—N21—C20	118,4 (5)
C9—N8—C7	112,9 (5)	N8—C22—C23	115,9 (4)
C9—N8—C22	113,1 (4)	C24—C23—N28	120,3 (5)
C7—N8—C22	115,2 (4)	C24—C23—C22	117,0 (5)
N8—C9—C10	111,4 (4)	N28—C23—C22	122,7 (5)
N11—C10—C9	110,7 (4)	C25—C24—C23	119,2 (5)
C10—N11—C12	111,7 (4)	C24—C25—C26	123,3 (6)
N11—C12—C13	113,3 (4)	C27—C26—C25	119,0 (6)
C14—C13—C12	114,0 (5)	C26—C27—N28	118,4 (6)
N1—C14—C13	111,7 (4)	C27—N28—C23	119,8 (6)

**Chlorure de 3-(4,11-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (composé 13)**



Un mélange constitué du composé **12** (0,31 g, 0,81 mmol), de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (0,25 g, 0,81 mmol), de carbonate de potassium (0,11 g, 0,81 mmol) et d'acétonitrile anhydre (30 mL) est chauffé à reflux pendant 24 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré, et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (dichlorométhane/méthanol, 90/10, v/v) pour conduire à l'analogue bromé du composé **13** sous forme d'une huile jaune (0,13 g, 0,22 mmol). Ce sel bromé est ensuite repris dans le méthanol et déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluée avec du méthanol. Après évaporation des fractions d'intérêt, le solide obtenu est séché au dessiccateur sous vide pour conduire au composé **13** sous forme d'une huile jaune (84 mg, 0,15 mmol).

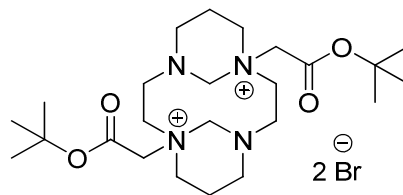
**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 1,28 (m, 9H, CH<sub>3</sub>), 1,82 (t, 2H, CH<sub>2eq</sub>- $\beta$ -N,  $J=3$  Hz), 1,91 (t, 2H, CH<sub>2ax</sub>- $\beta$ -N,  $J=3$  Hz), 2,80 (m, 18H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,07 (dt, 2H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N,  $J=15, 3$  Hz), 3,35 (m, 8H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,83 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 7,31 (dt, 2H, CH<sub>Ar</sub>,  $J=23, 6$  Hz), 7,41 (dd, 2H, CH<sub>Ar</sub>,  $J=29, 6$  Hz), 7,80 (dt, 2H, CH<sub>Ar</sub>,  $J=52, 6$  Hz), 8,48 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>,  $J=3$  Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, D<sub>2</sub>O+acétone-*d*<sub>6</sub>) :**  $\delta$  = 6,6 (3C, CH<sub>3</sub>), 24,2 (2C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 28,2 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 45,7 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 48,2 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 51,9 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 52,4 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 52,7 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 53,2 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 54,3 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 54,6 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 58,7 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 122,8 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 123,8 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 137,6 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 148,3 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 157,5 (2C, C<sub>Ar</sub>)

**R<sub>f</sub> :** (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10, réactif de Dragendorff) 0,41

**ESI-MS *m/z* :** 262,72 ; valeur théorique pour C<sub>31</sub>H<sub>54</sub>ClN<sub>7</sub> + H<sup>+</sup> - Cl<sup>-</sup> [M+H-Cl]<sup>2+</sup> : 262,73

**Bibromure de 1,8-*N,N'*-bis-[2-(1,1-diméthyléthoxy)-2-oxoéthyl]-4,11-diaza-1,8-diazoniatricyclo[9.3.1.1]hexadécane (composé 14)**

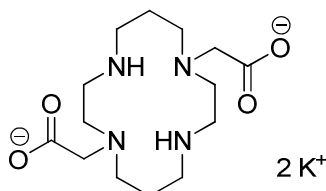


Une solution de bromoacétate de *tert*-butyl (6,40 mL, 43,6 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (100 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution de composé **11** (2,46 g, 10,9 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (100 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures. Après évaporation à sec sous pression réduite du milieu réactionnel, l'huile jaune obtenue est reprise dans l'éther éthylique (60 mL). Après une agitation vive pendant 15 minutes, le précipité obtenu est filtré, rincé à l'éther éthylique puis séché sous pression réduite pour donner le composé **14** sous la forme d'une poudre blanche (4,6 g, 7,5 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 1,51 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 1,87 (m, 4H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 2,76 (m, 4H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 2,91 (m, 6H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,11 (m, 12H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N, N-CH<sub>2</sub><sub>eq</sub>-N, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3,60 (m, 2H, N-CH<sub>2ax</sub>-N)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, D<sub>2</sub>O+acetone-d<sub>6</sub>) :**  $\delta$  = 23,9 (2C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 28,9 (6C, CH<sub>3</sub>), 46,8 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 50,8 (4C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N, N-CH<sub>2</sub>-CO), 57,5 (4C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 83,1 (2C, C), 85,4 (2C, N-CH<sub>2</sub>-N), 175,3 (2C, CO)

**1,8-*N,N''*-Bis-(carboxylatéméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane (composé 15)**



Le composé **14** (0,14 g, 0,23 mmol) et de la potasse (65 mg, 1,2 mmol) sont dissous dans une solution d'éthanol/eau désionisée (1/1, v/v) (20 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à 80°C pendant 16 heures, puis les solvants sont évaporés à sec. Le solide obtenu est ensuite repris dans du méthanol et déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions hydroxydes éluée avec du méthanol. Après

évaporation des fractions d'intérêt, le solide obtenu est séché au dessiccateur sous vide pour conduire au composé **15** sous forme d'un solide blanc (90 mg, 0,23 mmol).

Tf : 219°C

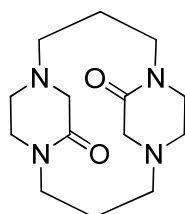
RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ = 1,68 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-β-N), 2,62-2,71 (m, 12H, CH<sub>2</sub>-α-N), 2,82 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,07 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-β-N)

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, D<sub>2</sub>O+acetone-d<sub>6</sub>) : δ = 22,7 (2C, CH<sub>2</sub>-β-N), 44,9 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 49,5 (4C, CH<sub>2</sub>-α-N), 54,4 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 58,9 (2C, N-CH<sub>2</sub>-CO), 176,1 (2C, CO)

ESI-MS m/z : 317,21 ; valeur théorique pour C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>K<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> – 2 K<sup>+</sup> + 3 H<sup>+</sup> [M-2K+3H]<sup>+</sup> : 317,22

IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>) : 3419, 2963, 2793, 1747, 1594, 1428, 1222,7

### 15,18-Dioxo-1,5,8,12-tétrazatricyclo[10.2.2.2<sup>5,8</sup>]tétradécane (composé **16**)



Produit secondaire obtenu lors de la synthèse du composé **22** (voir schéma7).

### Données cristallographiques pour le composé **16**, forme monohydratée.

Formule	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	μ (mm <sup>-1</sup> )	0,094
Formule empirique	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	Température (K)	293
Masse molaire	298,38	F(000)	648
Système cristallin	monoclinique	λ (Mo Kα) (Å)	0,71073
Groupe d'espace	C 2/c	Indices de Miller	-16 ≤ h ≤ 15
Couleur	incolore		-11 ≤ k ≤ 11
a (Å)	12,7869(6)		-18 ≤ l ≤ 16
b (Å)	9,0062(5)	θ <sub>min</sub> ; θ <sub>max</sub> (°)	2,845 ; 27,080
c (Å)	14,1460(9)	Nb de réflexions uniques	1637
β (°)	112,674(2)	Nb de réflexions avec [I > 2σ(I)]	1213
Volume (Å <sup>3</sup> )	1503,2(2)	Qualité d'affinement, S	1,143
Z	4 (= 8 / 2)	wR <sub>2</sub> (1213 réfl)	0,1099
d <sub>calc</sub> (g·cm <sup>-3</sup> )	1,319	R <sub>1</sub> (1213 réfl)	0,0404

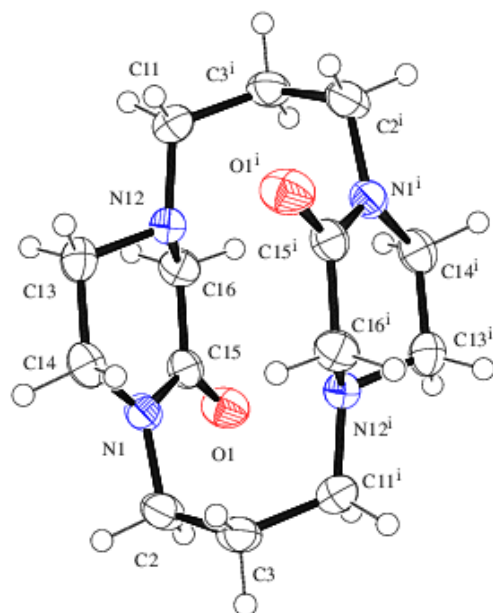


Figure ORTEP du composé **16** (la molécule d'eau est omise pour plus de clarté). Les ellipsoïdes sont représentés au seuil de probabilité de 50%.

Code de symétrie : (i)  $-x+1/2, -y+1/2, -z+2$ .

**Longueurs de liaisons et angles (Å, °) pour le composé 16, forme monohydratée.**

N1—C15	1,338 (2)	C3—C11 <sup>i</sup>	1,521 (2)	N12—C13	1,451 (2)
N1—C2	1,464 (2)	C11—N12	1,463 (2)	C13—C14	1,509 (2)
N1—C14	1,464 (2)	C11—C3 <sup>i</sup>	1,521 (2)	C15—O1	1,232 (2)
C2—C3	1,525 (2)	N12—C16	1,442 (2)	C15—C16	1,507 (2)

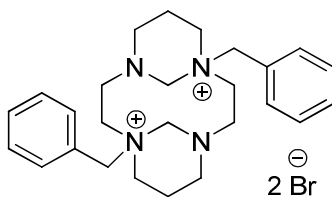
C15—N1—C2	119,20 (14)	C13—N12—C11	113,04 (13)
C15—N1—C14	123,68 (13)	N12—C13—C14	109,53 (13)
C2—N1—C14	116,42 (13)	N1—C14—C13	113,50 (13)
N1—C2—C3	114,47 (13)	O1—C15—N1	122,95 (14)
C11i—C3—C2	115,88 (14)	O1—C15—C16	120,11 (14)
N12—C11—C3i	113,64 (14)	N1—C15—C16	116,94 (14)
C16—N12—C13	106,78 (13)	N12—C16—C15	112,17 (12)
C16—N12—C11	113,18 (12)		

C15—N1—C2—C3	95,92 (18)	N12—C13—C14—N1	-38,13 (19)
C14—N1—C2—C3	-74,87 (19)	C2—N1—C15—O1	12,9 (2)
N1—C2—C3—C11i	-62,0 (2)	C14—N1—C15—O1	-177,06 (15)
C3i—C11—N12—C16	-68,34 (18)	C2—N1—C15—C16	-167,31 (14)
C3i—C11—N12—C13	170,10 (14)	C14—N1—C15—C16	2,8 (2)
C16—N12—C13—C14	67,36 (16)	C13—N12—C16—C15	-62,05 (17)
C11—N12—C13—C14	-167,53 (13)	C11—N12—C16—C15	172,93 (13)
C15—N1—C14—C13	3,1 (2)	O1—C15—C16—N12	-153,02 (15)
C2—N1—C14—C13	173,39 (14)	N1—C15—C16—N12	27,1 (2)

Code de symétrie : (i)  $-x+1/2, -y+1/2, -z+2$ .



**Dibromure de 1,8-*N,N'*-bis-(phénylméthyl)-4,11-diaza-1,8-diazoniatricyclo[9.3.1.1]hexadécane (composé 17)**



Le composé **17** a été synthétisé selon la méthode de Royal et coll. (8).

Une solution de bromure de benzyle (1,10 mL, 9,3 mmol) dans le tétrahydrofurane anhydre (20 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution de composé **11** (0,82 g, 3,7 mmol) dans du tétrahydrofurane anhydre (100 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 18 heures à température ambiante. Le précipité blanc formé est filtré, lavé au tétrahydrofurane anhydre (100 mL), et séché sous pression réduite pour donner le composé **17** sous forme d'un solide blanc (2 g, 3,5 mmol).

Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

**Tf** : 176°C

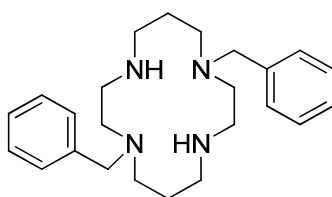
**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O)** :  $\delta$  = 1,87 (d, 2H,  $CH_{2eq-\beta-N}$ ,  $J=17$  Hz), 2,35 (m, 2H,  $CH_{2ax-\beta-N}$ ), 2,51 (m, 2H,  $CH_{2-\alpha-N}$ ), 2,94 (d, 4H,  $CH_{2-\alpha-N}$ ,  $J=17$  Hz), 3,29-3,96 (m, 10H,  $CH_{2-\alpha-N}$ ), 4,40 (d, 2H,  $N-CH_{2-N}$ ,  $J=14$  Hz), 4,64 (AB system, 4H,  $CH_{2-C_{Ar}}$ ,  $J=14$  Hz), 5,50 (d, 2H,  $N-CH_{2-N}$ ,  $J=11$  Hz), 7,55 (m, 10H,  $CH_{Ar}$ )

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, D<sub>2</sub>O+acetone-*d*<sub>6</sub>)** :  $\delta$  = 20,0 (2C,  $CH_{2-\beta-N}$ ), 48,0 (2C,  $CH_{2-\alpha-N}$ ), 48,2 (2C,  $CH_{2-\alpha-N}$ ), 51,8 (2C,  $CH_{2-\alpha-N}$ ), 60,2 (2C,  $CH_{2-\alpha-N}$ ), 63,4 (2C,  $CH_{2-C_{Ar}}$ ), 77,3 (2C,  $N-CH_{2-N}$ ), 126,5 (2C,  $CH_{Ar}$ ), 129,9 (4C,  $CH_{Ar}$ ), 131,4 (2C,  $C_{Ar}$ ), 133,5 (4C,  $CH_{Ar}$ )

**ESI-MS *m/z*** : 203,16 ; valeur théorique pour  $C_{26}H_{38}Br_2N_4 - 2 Br^- [M-2Br]^{2+}$  : 203,16

**IR (ATR)  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>)** : 3027, 2962, 2897, 2810, 1488, 716

**1,8-*N,N'*-Bis-(phénylméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane (composé 18)**



Le composé **18** a été synthétisé selon la méthode de Royal et coll. (8).

Une solution du composé **17** (2 g, 3,5 mmol) dans une solution de soude aqueuse 3 M (200 mL) est agitée pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est extrait avec du dichlorométhane (3 x 50 mL). Les fractions organiques sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées sous pression réduite pour conduire au composé **18** sous forme d'une huile incolore (1,3 g, 3,4 mmol).

Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  = 1,80 (m, 4H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 2,51 (m, 8H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 2,69 (m, 8H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,15 (s, 2H, NH), 3,69 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 7,26 (m, 10H, CH<sub>Ar</sub>)

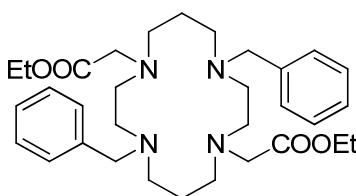
**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  = 25,7 (2C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 47,5 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 50,2 (4C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 51,8 (4C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 53,9 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 57,7 (2C, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 126,9 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 128,0 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 129,5 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 137,1 (2C, C<sub>Ar</sub>)

**Rf** = (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10, I<sub>2</sub>) 0,70

**ESI-MS m/z** : 381,28, 191,14 ; valeurs théoriques pour C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 381,30, C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub> + 2 H<sup>+</sup> [M+2H]<sup>2+</sup> : 191,15

**IR (ATR) v<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>)** : 2942, 2800, 1453, 1366, 1130, 731, 699

**1,8-N,N''-bis-(éthoxycarbonylméthyl)-4,11-N',N'''-bis-(phénylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécane (composé **19**)**



Une solution de bromoacétate d'éthyle (1,1 mL, 9,5 mmol) dans le dichlorométhane (50 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution de composé **18** (1,5 g, 3,8 mmol) et de carbonate de potassium (1 g, 7,6 mmol) dans le dichlorométhane (100 mL). La solution est agitée pendant 48 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite filtré, et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (dichlorométhane/méthanol, 95/5, v/v), les fractions d'intérêts sont évaporées sous pression réduite et le résidu huileux jaune obtenu est recristallisé dans le méthanol (60 mL) pour conduire au composé **19** sous forme d'une poudre blanche (1,2 g, 2,2 mmol).

Tf : 94°C

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 1,22 (t, 6H, CH<sub>3</sub>, J=6 Hz), 1,68 (quint, 4H, CH<sub>2</sub>-β-N, J=6 Hz), 2,61 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-α-N), 2,75 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,27 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-CO), 3,55 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 4,10 (q, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, J=6 Hz), 7,30 (m, 10H, CH<sub>Ar</sub>)

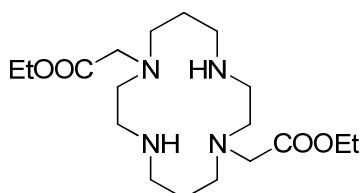
**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 14,3 (2C, CH<sub>3</sub>), 24,4 (2C, CH<sub>2</sub>-β-N), 50,8 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 51,0 (4C, CH<sub>2</sub>-α-N), 51,6 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 55,5 (2C, CH<sub>2</sub>-CO), 59,4 (2C, CH<sub>2</sub>), 60,1 (2C, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 126,7 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 128,1 (4C, CH<sub>Ar</sub>), 128,9 (4C, CH<sub>Ar</sub>), 139,8 (2C, C<sub>Ar</sub>), 171,7 (2C, CO)

Rf = (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5, I<sub>2</sub>) 0,84

**ESI-MS m/z** : 553,36 ; valeur théorique pour C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 553,76

**IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>)** : 3428, 2939, 2836, 1725, 1456, 1195, 1029, 738

### 1,8-*N,N''*-bis-(éthoxycarbonylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécane (composé 20)



Le composé **20** a été synthétisé selon la méthode de Goubert-Renaudin et coll. (9).

Le composé **19** (0,68 mg, 1,2 mmol) en solution dans le tétrahydrofurane/eau désionisée (97/3, v/v) est déprotégé par hydrogénation catalytique à pression atmosphérique en présence de palladium sur charbon actif à 10% (200 mg). Le milieu réactionnel est filtré sur célite et évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est purifiée sur colonne d'alumine (dichlorométhane/méthanol, 100/0 puis 95/5, v/v) pour conduire au composé **20** sous forme d'une huile jaune pâle (0,37 g, 1 mmol).

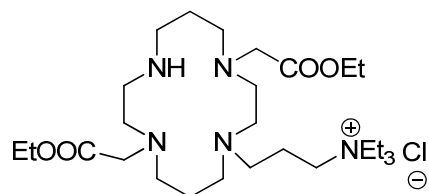
Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 1,21 (t, 6H, CH<sub>3</sub>, J=6 Hz), 1,72 (quint, 4H, CH<sub>2</sub>-β-N, J=3 Hz), 2,66 (m, 18H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,35 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-CO), 4,10 (q, 4H, CH<sub>2</sub>, J=6 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 14,4 (2C, CH<sub>3</sub>), 26,1 (2C, CH<sub>2</sub>-β-N), 47,6 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 50,3 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 53,3 (2C, CH<sub>2</sub>-CO), 54,2 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 54,5 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 60,2 (2C, CH<sub>2</sub>), 171,3 (2C, CO)

**ESI-MS m/z** : 373,17 ; valeur théorique pour C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 373,50

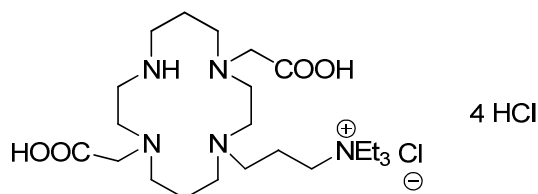
**Chlorure de 3-(4,11-bis(éthoxycarbonylméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (composé 21)**



Un mélange constitué du composé **20** (0,64 g, 1,7 mmol), de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (0,52 g, 1,7 mmol), de carbonate de potassium (0,24 g, 1,7 mmol) et d'acétonitrile anhydre (30 mL) est chauffé à reflux pendant 48 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré, et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne phase élué avec un mélange acétonitrile 20 mM HFBA / eau ultrapure 20 mM HFBA (20/80 puis 30/70, v/v). Les fractions d'intérêt sont regroupées et évaporées sous vide. Le résidu obtenu est ensuite repris dans le méthanol et déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluee avec du méthanol. Après évaporation des fractions d'intérêt, le composé **21** se présente sous la forme d'une huile jaune (0,22 g, 0,38 mmol).

**ESI-MS  $m/z$**  : 514,45, 257,61 ; valeurs théoriques pour  $C_{27}H_{56}ClN_5O_4 - Cl^- [M-Cl]^+$  : 514,43,  $C_{27}H_{56}ClN_5O_4 - Cl^- + H^+ [M-Cl+H]^{2+}$  : 257,72

**Chlorure de 3-(4,11-bis(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (composé 22)**



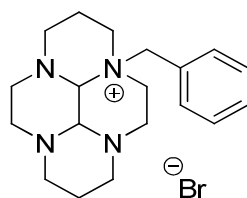
Le composé **21** (0,22 g, 0,38 mmol) est repris dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique fumant (37% dans l'eau, m/m) et agité pendant 3 heures à température ambiante, avant d'être évaporée à sec sous pression réduite. Le composé **22** (0,24 g, 0,38 mmol) est alors obtenu quantitativement sous forme d'un solide marron clair.

**RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :**  $\delta = 1,29$  (m, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 2,23 (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-N}$ ,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 3,28-3,50 (m, 24H,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 3,68 (s, 4H,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ +acétone- $d_6$ ) :**  $\delta = 7,1$  (3C,  $\text{CH}_3$ ), 17,8 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-N}$ ), 19,0 (2C,  $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-N}$ ), 37,6 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 37,8 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 38,2 (3C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 41,2 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 41,6 (3C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 45,4 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 48,5 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 52,2 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 53,1(1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 53,4 (2C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 171,5 (2C, CO)

**ESI-MS  $m/z$  :** 458,54 ; valeur théorique pour  $\text{C}_{23}\text{H}_{48}\text{ClN}_5\text{O}_4 - \text{Cl}^- [\text{M-Cl}]^+$  : 458,37

### Bromure de décahydro-3a-(2-phénylméthyl)-cis-décahydro-1H,6H-5a,8a,10a-triaza-3a-azoniapyrène (composé **23**)



Une solution de bromure de benzyle (1,8 mL, 14,8 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (20 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution de composé **7** (3,3 g, 14,8 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (40 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 2 jours à température ambiante. Le précipité blanc formé est filtré, lavé au l'acétonitrile anhydre (20 mL), et séché sous pression réduite pour donner le composé **23** sous forme d'un solide blanc (4,9 g, 12,4 mmol).

**Tf :** 124°C

**RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :**  $\delta = 1,68$  (d, 1H,  $\text{CH}_{2\text{eq}}\text{-}\beta\text{-N}$ ,  $J=15$  Hz), 1,75 (d, 1H,  $\text{CH}_{2\text{ax}}\text{-}\beta\text{-N}$ ,  $J=15$  Hz), 2,07-2,57 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ,  $\text{CH}_{2\text{eq}}\text{-}\beta\text{-N}$ ,  $\text{CH}_{2\text{ax}}\text{-}\beta\text{-N}$ ), 2,58-3,64 (m, 12H,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 3,63 (s, 1H, CH), 4,31 (s, 1H, CH), 4,86 (2H,  $\text{CH}_2\text{-C}_{\text{Ar}}$ ,  $J=36$  Hz), 7,50 (m, 5H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ )

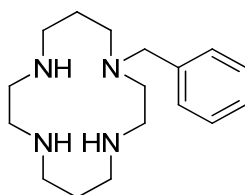
**RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ +acétone- $d_6$ ) :**  $\delta = 18,6$  (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-N}$ ), 18,9 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-N}$ ), 42,5 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 47,2 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 49,0 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 51,9 (2C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 52,5 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 53,8 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 54,5 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 60,4 (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ), 63,1 (1C,  $\text{CH}_2\text{-C}_{\text{Ar}}$ ), 70,2 (1C, CH), 82,6 (1C, CH), 126,2 (1C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 129,9 (1C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 130,1 (1C,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 131,6 (1C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 133,8 (1C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ )

**R<sub>f</sub> :** ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 90/10,  $I_2$ ) 0,62

**ESI-MS  $m/z$  :** 313,22 ; valeur théorique pour  $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{BrN}_4 - \text{Br}^- [\text{M-Br}]^+$  : 313,24

**IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) :** 3409, 2935, 2856, 2814, 1355, 888, 706

### 1-*N*-(2-Phénylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécane (composé 24)



Une solution du composé **23** (0,83 g, 0,96 mmol) dans de l'hydrate d'hydrazine (15 mL) est chauffée à reflux pendant 4 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est placé 12 heures à 0 °C et le précipité formé est filtré, lavé avec de l'hydrate d'hydrazine (5 mL), puis repris dans l'éthanol (20 mL) et le solvant est évaporé sous pression réduite pour conduire au composé **24** sous forme d'une huile blanche (0,26 g, 0,90 mmol).

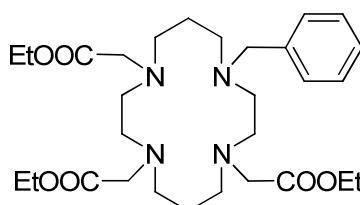
**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  = 1,67 (quint, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N,  $J=3$  Hz), 1,83 (quint, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N,  $J=3$  Hz), 2,44-2,82 (m, 19H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N, NH), 3,54 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 7,22 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  = 26,2 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 28,5 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 47,4 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 48,0 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 49,1 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 49,3 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 49,5 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 50,8 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 53,6 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 54,6 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 57,9 (1C, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 127,0 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 128,2 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 129,4 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 138,9 (1C, C<sub>Ar</sub>)

**R<sub>f</sub>** : (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10, I<sub>2</sub>) 0,30

**IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>)** : 3027, 2936, 2808, 1724, 1455, 1193, 1129, 737

### 1,4,8-*N,N',N''*-Tris-(éthoxycarbonylméthyl)-11-*N'''*-(2-phénylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécane (composé 25)



Une solution de bromoacétate d'éthyle (1,45 mL, 13 mmol) dans l'acétonitrile (50 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution de composé **24** (1,1 g, 3,7 mmol) et de carbonate de potassium (1,53 g, 11,1 mmol) dans l'acétonitrile (100 mL). La solution est agitée pendant 2 jours à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite filtré, et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (dichlorométhane/méthanol, 95/5, v/v), les fractions d'intérêts sont

é vaporées sous pression réduite pour conduire au composé **25** sous forme d'une huile jaune pâle (0,93 g, 1,7 mmol).

Tf : 60°C

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 1,24 (m, 9H, CH<sub>3</sub>), 1,62 (quint, 4H, CH<sub>2</sub>-β-N, J=3 Hz), 2,49 (q, 4H, CH<sub>2</sub>-α-N, J=3 Hz), 2,71 (m, 12H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,24 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3,34 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3,37 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3,49 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 4,11 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 7,26 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>)

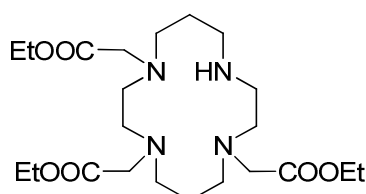
**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 14,2 (3C, CH<sub>3</sub>), 24,8 (1C, CH<sub>2</sub>-β-N), 25,2 (1C, CH<sub>2</sub>-β-N), 51,0 (3C, CH<sub>2</sub>-α-N), 51,3 (4C, CH<sub>2</sub>-α-N), 55,3 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 55,4 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 59,3 (1C, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 60,0 (3C, CH<sub>2</sub>), 126,6 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 127,9 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 128,8 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 139,8 (1C, C<sub>Ar</sub>), 171,6 (3C, CO)

R<sub>f</sub> : (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5, I<sub>2</sub>) 0,58

**ESI-MS m/z** : 549,38 ; valeur théorique pour C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 549,36

**IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>)** : 2980, 2830, 1739, 1463, 1373, 1201, 1096, 1030

### 1,4,8-N,N',N''-Tris-(éthoxycarbonylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécane (composé **26**)



Le composé **25** (1,71 g, 3,1 mmol) en solution dans l'éthanol est déprotégé par hydrogénation catalytique à pression atmosphérique en présence de palladium sur charbon actif à 10% (800 mg). Le milieu réactionnel est filtré sur célite et évaporé sous pression réduite pour conduire au composé **26** sous forme d'une huile jaune pâle (1,24 g, 2,7 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 1,15 (t, 9H, CH<sub>3</sub>, J=7,8 Hz), 1,52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-β-N), 1,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-β-N), 2,65 (m, 17H, CH<sub>2</sub>-α-N, NH), 3,25 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3,28 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3,33 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 4,03 (q, 6H, CH<sub>2</sub>, J=7,8 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 14,1 (2C, CH<sub>3</sub>), 14,2 (1C, CH<sub>3</sub>), 24,5 (1C, CH<sub>2</sub>-β-N), 24,7 (1C, CH<sub>2</sub>-β-N), 46,7 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 47,9 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 49,2 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 50,5 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 52,0

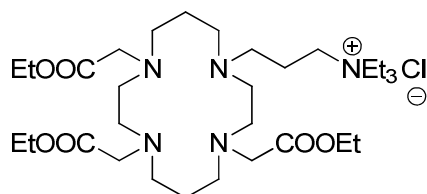
(1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 52,6 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 53,7 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 53,8 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 54,7 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 59,9 (1C, CH<sub>2</sub>), 60,0 (1C, CH<sub>2</sub>), 60,1 (1C, CH<sub>2</sub>), 171,0 (1C, CO), 171,3 (2C, CO)

R<sub>f</sub> : (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10, I<sub>2</sub>) 0,70

ESI-MS *m/z* : 459,27 ; valeur théorique pour C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 459,31

IR (ATR) *v*<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>) : 3407, 2954, 2837, 1739, 1645, 1463, 1375, 1205, 1029

**Chlorure de 3-(4,8,11-tris(éthoxycarbonylméthyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradécan-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (composé 27)**

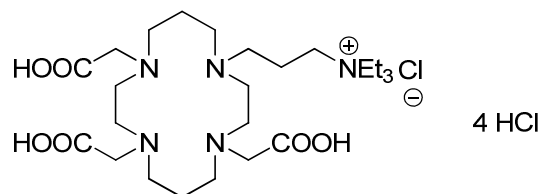


Un mélange constitué du composé **26** (0,67 g, 1,5 mmol), de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropylammonium (0,53 g, 1,8 mmol), de carbonate de potassium (0,20 g, 1,5 mmol) et d'acétonitrile anhydre (30 mL) est chauffé à reflux pendant 24 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré, et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne phase inverse (Fluka, silicagel 90 C18) élué avec un mélange acétonitrile 20 mM HFBA / eau ultrapure 20 mM HFBA (20/80 puis 30/70, v/v). Les fractions d'intérêt sont regroupées et évaporées sous vide. Le résidu obtenu est ensuite repris dans le méthanol et déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluée avec du méthanol. Après évaporation des fractions d'intérêt, le composé **27** se présente sous la forme d'une huile jaune (0,83 g, 1,3 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ = 1,24 (m, 9H, CH<sub>3</sub>), 1,41 (m, 9H, CH<sub>3</sub>), 2,05 (m, 10H, CH<sub>2</sub>-β-N, CH<sub>2</sub>-α-N), 2,78 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,55-3,72 (m, 24H, CH<sub>2</sub>-α-N), 4,13-4,32 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-α-N)



**Chlorure de 3-(4,8,11-tris(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminium (composé 28)**



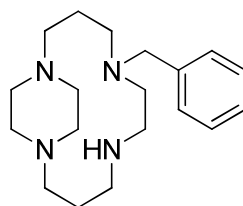
Le composé **27** (0,51 g, 0,8 mmol) est repris dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique fumant (37% dans l'eau, m/m) et agité pendant 3 heures à température ambiante, avant d'être évaporée à sec sous pression réduite. Le composé **28** (0,44 g, 0,8 mmol) est alors obtenu quantitativement sous forme d'un solide marron clair.

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 1,20 (m, 9H, CH<sub>3</sub>), 2,09 (m, 4H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 3,02-3,70 (m, 26H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 4,07-4,20 (m, 6H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, D<sub>2</sub>O+acétone-*d*<sub>6</sub>) :**  $\delta$  = 7,3 (3C, CH<sub>3</sub>), 13,8 (2C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 17,6 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 46,7 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 48,2 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 49,4 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 51,5 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 51,7 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 53,3 (3C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 55,6 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 63,6 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 64,0 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 64,2 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 168,2 (1C, CO), 170,4(1C, CO), 170,5 (1C, CO)

**ESI-MS *m/z* :** 516,25 ; valeur théorique pour C<sub>25</sub>H<sub>50</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>6</sub> – Cl<sup>-</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> : 516,38

**5-N-(phénylméthyl)-1,5,8,12-tétraazabicyclo[10.2.2]hexadécane (composé 29)**



A une solution du composé **23** (0,61 g, 1,54 mmol) dans l'éthanol anhydre (50 mL) est ajouté lentement du borohydrure de sodium (0,93 g, 24,6 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 jours. Après évaporation sous pression réduite du milieu réactionnel, le résidu est repris dans l'eau désionisée (20 mL) et le produit est extrait avec du dichlorométhane (3 x 20 mL). Les fractions organiques sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées sous pression réduite pour conduire au composé **29** (0,45 g, 1,43 mmol) sous la forme d'une huile incolore.

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 1,72 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-β-N), 2,22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-α-N), 2,50-2,61 (m, 14H, CH<sub>2</sub>-α-N), 2,90 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,61 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 4,57 (s, 1H, NH), 7,24 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub> x 5)

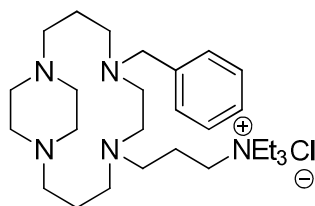
**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 23,2 (1C, CH<sub>2</sub>-β-N), 25,6 (1C, CH<sub>2</sub>-β-N), 47,8 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 48,0 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 50,4 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 50,8 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 54,8 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 55,0 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 55,3 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 56,7 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 56,8 (1C, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 126,8 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 127,9 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 129,4 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 137,7 (1C, C<sub>Ar</sub>)

**R<sub>f</sub>** : (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5, I<sub>2</sub>) 0,40

**ESI-MS m/z** : 317,24 ; valeur théorique pour C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 317,26

**IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>)** : 3286, 2935, 2803, 1687, 1454, 1166, 1006, 768

**Chlorure de 3-(5-N-(phénylméthyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécane-5-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminium (composé 30)**



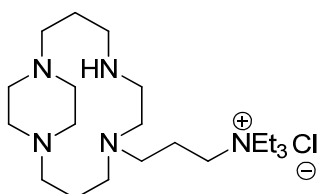
Un mélange constitué du composé **29** (0,28 g, 0,88 mmol), de bromure de 3-bromo-N,N,N-triéthylpropylammonium (0,29 g, 0,97 mmol), de carbonate de potassium (0,12 g, 0,88 mmol) et d'acétonitrile anhydre (10 mL) est chauffé à reflux pendant 24 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré, et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (dichlorométhane/méthanol, 90/10, v/v) pour conduire à l'analogue bromé du composé **30** sous forme d'une huile jaune (0,31 g, 0,58 mmol). Ce sel bromé est ensuite repris dans le méthanol et déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluee avec du méthanol. Après évaporation des fractions d'intérêt, le solide obtenu est séché au dessiccateur sous vide pour conduire au composé **30** sous forme d'une huile jaune (0,29 g, 0,59 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O)** : δ = 1,28 (m, 9H, CH<sub>3</sub>), 1,81 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-β-N), 2,17 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-α-N), 2,69-2,80 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,21-3,40 (m, 14H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,61-3,73 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-α-N), 7,30-7,45 (m, 5H, CH<sub>Ar</sub>)

**RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ +acétone- $d_6$ ) :**  $\delta = 8,2$  (3C,  $\text{CH}_3$ ), 22,8 (1C,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ -N), 23,1 (1C,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ -N), 24,1 (1C,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ -N), 50,2 (2C,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 50,8 (2C,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 51,9 (2C,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 53,2 (1C,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 54,3 (2C,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 56,0 (1C,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 56,5 (1C,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 57,1 (3C,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 57,7 (1C,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 59,3 (1C,  $\text{CH}_2$ - $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 127,8 (1C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 128,5 (2C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 129,8 (2C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 136,5 (1C,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ )

**ESI-MS  $m/z$  :** 230,12 ; valeur théorique pour  $\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{ClN}_5 - \text{Cl}^- + \text{H}^+ [\text{M}+\text{H}]^{2+}$  : 229,72

**Chlorure de 3-(1,5,8,12-tétraazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)- $N,N,N$ -triéthylpropan-1-aminium (composé 31)**

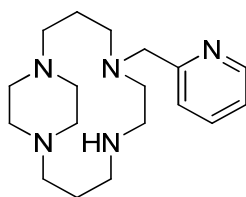


Le composé **30** (0,19 g, 0,38 mmol) en solution dans l'éthanol est déprotégé par hydrogénation catalytique à pression atmosphérique en présence de palladium sur charbon actif à 10% (50 mg). Le milieu réactionnel est filtré sur célite et évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne phase inverse (Fluka, silicagel 90 C18) élué avec un mélange eau ultrapure 0,2% TFA/méthanol (100/0 à 60/40, v/v). Les fractions d'intérêt sont regroupées et évaporées sous vide. Le résidu obtenu est ensuite repris dans le méthanol et déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluee avec du méthanol. Après évaporation des fractions d'intérêt, le composé **31** se présente sous la forme d'une huile jaune (0,124 g, 0,31 mmol).

**RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :**  $\delta = 1,25$  (m, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1,71 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ - $\beta$ -N), 2,39 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 2,60-2,82 (m, 14H,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 3,12 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N), 3,22-3,36 (m, 10H,  $\text{CH}_2$ - $\alpha$ -N)

**ESI-MS  $m/z$  :** 184,62 ; valeur théorique pour  $\text{C}_{21}\text{H}_{46}\text{ClN}_5 - \text{Cl}^- + \text{H}^+ [\text{M}-\text{Cl}+\text{H}]^{2+}$  : 184,69

### 5-*N*-(pyridin-2-ylméthyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécane (composé 32)



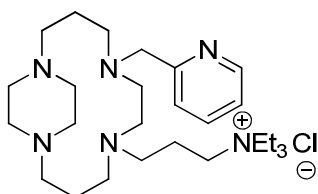
A une solution du composé **8** (0,36 g, 0,9 mmol) dans l'éthanol (50 mL) est ajouté lentement du borohydrure de sodium (0,56 g, 14,4 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 15 jours. Après évaporation sous pression réduite du milieu réactionnel, le résidu est repris dans l'eau désionisée (30 mL) et le produit est extrait avec du dichlorométhane (3 x 20 mL). Les fractions organiques sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées sous pression réduite pour conduire au composé **32** (0,27 g, 0,8 mmol) sous la forme d'une huile jaune.

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 1,76 (m, 4H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 2,23 (tt, 2H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N,  $J=20$ , 4 Hz), 2,51-2,89 (m, 13H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N, NH), 2,95 (t, 4H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N,  $J=4$  Hz), 3,22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,77 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 7,14 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7,35 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>,  $J=8$  Hz), 7,63 (td, 1H, CH<sub>Ar</sub>,  $J=8$ , 3 Hz), 8,52 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>,  $J=4$  Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 23,9 (2C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 48,4 (4C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 51,3 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 55,6 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 56,2 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 57,3 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 59,5 (1C, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 122,6 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 124,0 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 136,5 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 149,4 (1C, C<sub>Ar</sub>), 159,5 (1C, CH<sub>Ar</sub>)

**ESI-MS  $m/z$**  : 318,29 ; valeur théorique pour C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 318,27

### Chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(8-pyridin-2-ylméthyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécane-5-yl)-propan-1-aminium (composé 33)



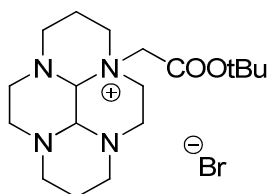
Un mélange constitué du composé **32** (0,27 g, 0,8 mmol), de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropylammonium (0,27 g, 0,9 mmol), de carbonate de potassium (0,11 g, 0,8 mmol) et d'acétonitrile anhydre (30 mL) est chauffé à reflux pendant 24 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré, et le filtrat est évaporé sous

pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (dichlorométhane/méthanol, 90/10, v/v). Les fractions d'intérêt sont regroupées et évaporées sous vide. Le résidu obtenu est ensuite repris dans le méthanol et déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluée avec du méthanol. Après évaporation des fractions d'intérêt, le composé **33** se présente sous la forme d'une huile jaune (0,27 g, 0,49 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 1,25 (m, 9H, CH<sub>3</sub>), 1,82 (m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 2,09 (m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 2,60-2,92 (m, 10H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,20-4,2 (m, 20H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,57-3,80 (m, 4H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 7,40 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>), 7,86 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 8,49 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>)

**ESI-MS *m/z* :** 230,15 ; valeur théorique pour C<sub>27</sub>H<sub>51</sub>ClN<sub>5</sub> - Cl<sup>-</sup> + H<sup>+</sup> [M-Cl+H]<sup>2+</sup> : 230,21

**Bromure de 3a-(tert-butoxycarbonylméthyl)-cis-décahydro-1H,6H-5a,8a,10a-triaza-3a-azoniapyrène (composé 34)**

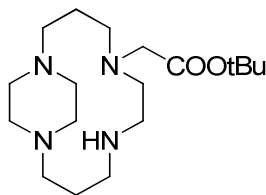


Du bromoacétate de *tert*-butyl (3,26 g, 16,7 mmol) est ajouté à une solution de composé **7** (0,90 g, 4,06 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (40 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 h avant d'être évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est triturée avec de l'éther éthylique (150 mL) et le précipité formé est filtré pour conduire au composé **34** sous forme d'un solide blanc (1,65 g, 3,95 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 1,49 (m, 10H), 1,84 (m, 1H), 2,19 (m, 2H), 2,43 (q, 4H, *J*=13 Hz), 2,96 (m, 7H), 3,50 (m, 2H), 3,76 (m, 1H), 3,91 (m, 3H), 4,34 (d, 2H, *J*= 16 Hz), 4,63 (d, 1H, *J*=16 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O+acétone-*d*<sub>6</sub>) :**  $\delta$  = 18,5 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 19,1 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 27,6 (3C, CH<sub>3</sub>), 42,4 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 46,6 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 50,6 (1C, N-CH<sub>2</sub>-CO), 51,8 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 52,5 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 53,8 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 54,2 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 58,9 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 62,0 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 69,9 (1C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83,2 (1C, C<sub>aminal</sub>), 87,6 (1C, C<sub>aminal</sub>), 163,7 (1C, CO)

**5-*N*-(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécane (composé 35)**

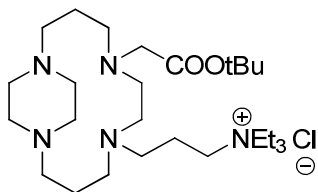


A une solution du composé **34** (0,77 g, 1,84 mmol) dans l'éthanol anhydre (50 mL) est ajouté lentement du borohydure de sodium (1,65 g, 43,6 mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 30 min, puis chauffé à reflux pendant 3 heures. Après retour à température ambiante, de l'eau désionisée (30 mL) est ajoutée. Les solvants sont évaporés à sec. Le résidu est repris dans l'eau désionisée (40 mL) et le pH de la solution est porté à 12 par addition de quelques gouttes d'une solution aqueuse de potasse (10 %, m/m). Après extraction au dichlorométhane (4 x 50 mL), le produit **35** est obtenu sous forme d'une huile jaunâtre (0,59 g, 1,73 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 1,45 (s, 9H), 1,64 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), 2,21 (dt, 2H,  $J=10$  Hz, 4 Hz), 2,61 (m, 6H), 2,87 (m, 10H), 3,13 (dt, 2H,  $J=10$  Hz, 4 Hz), 3,27 (s, 2H)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 23,4 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 26,0 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 28,3 (3C, CH<sub>3</sub>), 47,1 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 48,2 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 50,8 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 51,1 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 51,9 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 54,8 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 55,8 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 56,9 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 81,0 (1C, C), 170,7 (1C, CO)

**Chlorure de 3-(8-(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécane-5-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (composé 36)**



A une solution du produit **35** (0,59 g, 1,73 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (40 mL), sont ajoutés successivement du carbonate de potassium (0,29 g, 2,06 mmol) et du bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropylammonium (0,62 g, 2,06 mmol). La solution est agitée sous argon pendant 30 minutes, puis chauffée à reflux pendant 24 heures. Après retour à température ambiante, l'excès de carbonate de potassium est éliminé par filtration. Le

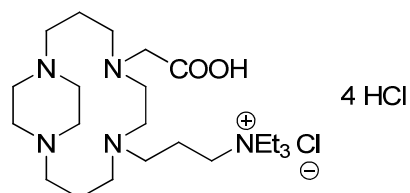
résidu obtenu après évaporation du solvant est ensuite purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (acétone/éthanol/ammoniaque, 90/10/1 puis 70/30/1 (v/v/v)). Les fractions d'intérêt sont regroupées et évaporées sous vide. Le résidu huileux obtenu est remis en solution dans l'éthanol et déposée sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluée par de l'éthanol. Après évaporation des fractions d'intérêt et séchage au dessiccateur sous vide, le composé **36** (0,38 g, 0,73 mmol) est obtenu sous forme d'une huile incolore.

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ = 1,25 (se, 9H), 1,45 (s, 9H), 1,78 (m, 4H), 2,21 (m, 2H), 2,72 (m, 12H), 3,34 (m, 16H), 3,73 (m, 2H), 3,94 (m, 2H)

**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O+acétone-*d*<sub>6</sub>) :** δ = 7,1 (3C, CH<sub>3</sub>), 15,7 (3C, CH<sub>2</sub>-α-N), 21,3 (1C, CH<sub>2</sub>-β-N), 24,5 (1C, CH<sub>2</sub>-β-N), 27,8 (3C, CH<sub>3</sub>), 44,5 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 46,8 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 48,5 (4C, CH<sub>2</sub>-α-N), 53,1 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 53,6 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 54,9 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 56,5 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 59,5 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 83,2 (1C, C), 173,6 (1C, CO)

**HRMS (TOF MS ES+) :** 482,4454 ; valeur théorique pour C<sub>27</sub>H<sub>56</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub> - Cl<sup>-</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> : 482,4434

**Chlorure de 3-(8-(carboxyméthyl)-1,5,8,12-tétrazabicyclo[10.2.2]hexadécan-5-yl)-N,N,N-triéthylpropan-1-aminium (composé **37**)**



Une solution du composé **36** (0,66 g, 1,17 mmol) dans d'acide chlorhydrique fumant à 37% (10 mL) est agitée à température ambiante pendant 3 heures avant d'être évaporée à sec sous pression réduite. Le composé **37** (0,63 g, 1,17 mmol) sous forme chlorhydrate est alors obtenu quantitativement sous forme d'un solide blanc.

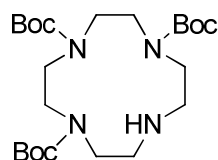
**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ = 1,21 (m, 9H), 1,97 (m, 4H), 2,13 (m, 2H), 2,75 (m, 2H), 3,00 (m, 6H), 3,27 (m, 12H), 3,53 (m, 8H), 3,77 (m, 4H)

**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O+acétone-*d*<sub>6</sub>) :** δ = 7,4 (3C, CH<sub>3</sub>), 15,9 (3C, CH<sub>2</sub>-α-N), 21,7 (2C, CH<sub>2</sub>-β-N), 43,5 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 45,0 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 45,7 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 47,4 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 51,2 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 53,2 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 53,7 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 54,0 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 54,5 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 54,7

(1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 55,0 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 55,8 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 56,3 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 59,3 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 60,6 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 176,8 (1C, CO)

**HRMS (TOF MS ES+)** : 426,3770 ; valeur théorique pour C<sub>23</sub>H<sub>48</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub> – Cl<sup>-</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> : 426,3803

### 1,4,7-Tris-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane (composé **38**)



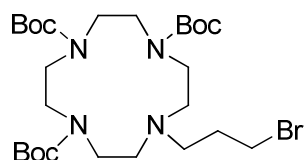
Un mélange de cyclène (2,00 g, 11,6 mmol) et de triéthylamine (3,60 g, 35,6 mmol) dans le chloroforme (60 mL) est refroidi à 0 °C puis une solution de dicarbonate de di-*tert*-butyle (7,77 g, 35,6 mmol) dans le chloroforme (40 mL) est lentement additionnée. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 18 heures avant d'être lavé à l'eau désionisée (2 x 50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée à sec. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de silice éluee par l'éther éthylique pour conduire par ordre d'élution, au composé tétraprotégé (R<sub>f</sub>=0,69) et au composé **38** (3,32 g, 7,02 mmol) sous la forme d'un solide blanc.

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 1,44 (s, 18H), 1,46 (s, 9H), 2,84 (se, 4H), 3,28 (se, 6H), 3,38 (s, 2H), 3,62 (s, 4H)

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 28,6 (6C, CH<sub>3</sub>), 28,8 (3C, CH<sub>3</sub>), 49,7 (4C, CH<sub>2</sub>-α-N), 51,1 (4C, CH<sub>2</sub>-α-N), 79,4 (1C, C-CH<sub>3</sub>), 79,6 (2C, C-CH<sub>3</sub>), 157,7 (3C, CO)

R<sub>f</sub> = (SiO<sub>2</sub>, éther éthylique, I<sub>2</sub>) 0,27

### 1,4,7-Tris-(*tert*-butoxycarbonyl)-10-(3-bromopropan-1-yl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane (composé **39**)



Une solution du composé **38** (1,74 g, 3,68 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (20 mL) est versée lentement dans un mélange de carbonate de potassium (0,78 g, 7,36 mmol) et de 1,3-dibromopropane (2,98 g, 14,8 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (20 mL). Le milieu



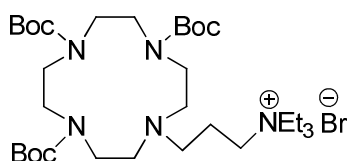
réactionnel est chauffé à reflux pendant 6 jours sous atmosphère inerte. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré puis évaporé sous vide. L'huile obtenue est purifiée sur colonne de silice. Une première élution par le cyclohexane permet de séparer le 1,3-dibromopropane en excès. Une seconde élution par l'éther éthylique permet ensuite de séparer successivement le composé **39** (1,06 g, 1,79 mmol) sous la forme d'un solide blanc, et le composé **38** (0,59 g, 1,25 mmol) qui n'a pas réagi.

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  = 1,44 (s, 18H), 1,45 (s, 9H), 2,01 (quint, 2H,  $J$  = 7 Hz), 2,62 (se, 2H), 2,69 (se, 4H), 3,26 (se, 2H), 3,30 (se, 4H), 3,38 (t, 2H,  $J$  = 7 Hz), 3,48 (se, 4H), 3,54 (se, 2H)

**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  = 27,4 (3C, CH<sub>3</sub>), 28,6 (3C, CH<sub>3</sub>), 28,8 (3C, CH<sub>3</sub>), 32,0 (1C, CH<sub>2</sub>-Br), 48,0 (4C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 50,3 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 50,8 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 53,7 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 54,8 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 79,5 (1C, C-CH<sub>3</sub>), 79,7 (2C, C-CH<sub>3</sub>), 155,5 (1C, CO), 155,8 (1C, CO), 156,3 (1C, CO)

$R_f$  = (SiO<sub>2</sub>, éther éthylique, I<sub>2</sub>) 0,61

**Bromure *N,N,N*-triéthyl-3-(1,4,7-tris-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tétrazacyclodécane-1-yl)propan-1-aminium (composé **40**)**

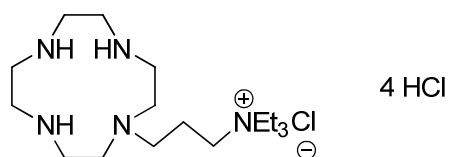


A une solution du composé **39** (1,06 g, 1,79 mmol) dans l'acétone est ajoutée de la triéthylamine (0,72 g, 7,12 mmol). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 15 heures. Après retour à température ambiante et évaporation, le composé **40** est obtenu sous forme d'un solide blanc (1,06 g, 1,53 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** :  $\delta$  = 1,29 (t, 9H,  $J$  = 7 Hz), 1,45 (s, 18H), 1,48 (s, 9H), 1,84 (se, 2H), 2,74 (se, 6H), 3,15 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz), 3,31 (q, 6H,  $J$  = 7 Hz), 3,39 (se, 4H), 3,44 (se, 4H), 3,58 (se, 4H)

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O+acétone-*d*<sub>6</sub>)** :  $\delta$  = 6,7 (3C, CH<sub>3</sub>), 28,0 (9C, CH<sub>3</sub>), 41,8 (3C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 46,2 (3C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 47,4 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 49,1 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 52,7 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 54,9 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 81,3 (3C, C-CH<sub>3</sub>), 157,2 (1C, CO), 157,5 (2C, CO)

**Chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1-yl)propan-1-aminium (composé 41)**



Le composé **40** (1,00 g, 1,44 mmol) est repris par une solution d'acide chlorhydrique 2 M dans l'éther éthylique anhydre (20 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 15 heures. Le solide blanc obtenu est filtré, lavé avec de l'éther éthylique anhydre (2 x 20 mL) puis séché au dessiccateur sous vide. Ce solide est repris dans du méthanol et déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluee par du méthanol. Après évaporation, le solide blanc est séché au dessiccateur sous vide pour conduire au composé **41** sous forme de tétrachlorhydrate (0,71 g, 1,43 mmol).

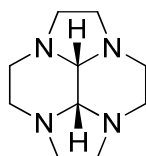
**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ = 1,24 (t, 9H, *J*=7 Hz), 1,88 (m, 2H), 2,73 (t, 2H, *J*=8 Hz), 2,92 (m, 8H), 3,14 (m, 10H), 3,28 (q, 6H, *J*=7 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O+acétone-*d*<sub>6</sub>) :** δ = 6,7 (3C, CH<sub>3</sub>), 15,5 (3C, CH<sub>2</sub>-α-N), 41,6 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 42,0 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 44,3 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 47,0 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 48,6 (2C, CH<sub>2</sub>-α-N), 52,8 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N), 54,3 (1C, CH<sub>2</sub>-α-N)

**ESI-MS *m/z* :** 314,35, 157,65 ; valeurs théoriques pour C<sub>17</sub>H<sub>40</sub>ClN<sub>5</sub> – Cl<sup>-</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> : 314,33, C<sub>17</sub>H<sub>40</sub>ClN<sub>5</sub> – Cl<sup>-</sup> + H<sup>+</sup> [M-Cl+H]<sup>2+</sup> : 157,67

**HRMS (TOF MS ES<sup>+</sup>) :** 314,3286 ; valeur théorique pour C<sub>17</sub>H<sub>40</sub>ClN<sub>5</sub> – Cl<sup>-</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> : 314,3284

***cis*-Décahydro-1*H*,6*H*-2*a*,4*a*,6*a*,8*a*-tétraazacyclopentacénaphthylène (composé 42)**



Le composé **42** a été synthétisé selon la méthode de Le Baccon et coll. (6).

Une solution de cyclène (4 g, 23,2 mmol) et de glyoxal (40% dans l'eau, m/m) (2,67 mL, 23,2 mmol) dans le méthanol (20 mL) est agitée pendant 4 heures à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et le produit obtenu est mis en suspension dans l'éther éthylique (20 mL) pendant 12 heures. Les polymères sont ensuite

filtrés et le filtrat est évaporé pour donner le composé **42** sous la forme d'une huile jaune (4,3 g, 22 mmol).

Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 2,64 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-α-N), 2,97 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,16 (s, 2H, N-CH)

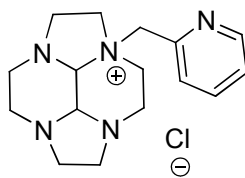
**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 50,4 (4C, CH<sub>2</sub>-α-N), 51,2 (4C, CH<sub>2</sub>-α-N), 77,6 (2C, CH)

**R<sub>f</sub>** : (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5, I<sub>2</sub>) 0,69

**ESI-MS m/z** : 195,13 ; valeur théorique pour C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 195,16

**IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>)** : 2939, 2888, 2797, 1391, 1272, 1181, 1065, 842

**Chlorure de cis-décahydro-2a,6a-(pyridin-2-ylméthyl)-1H,6H-4a,8a-diaza-2a,6a-diazoniacyclopentacénaphthylène (composé **43**)**



Du 2-picolyl chloride hydrochloride (1,8 g, 23,24 mmol) est ajouté à d'une solution aqueuse de soude (3 M) (20 mL). A la fin de l'effervescence, la 2-picolyl chloride est extraite avec du dichlorométhane (3 x 20 mL). Les fractions organiques sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées sous pression réduite. La 2-picolyl chloride est solubilisée dans de l'acétonitrile anhydre (20 mL) et ajoutée à une solution de **42** (1,13 g, 5,81 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (20 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 jours à température ambiante. Le précipité rouge formé est filtré, lavé à l'acétonitrile anhydre (20 mL), et séché sous pression réduite pour donner le composé **43** sous forme d'un solide rose (1,48 g, 4,1 mmol).

**T<sub>f</sub>** : 190°C

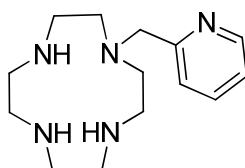
**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O)** : δ = 2,55 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-α-N, J=9 Hz), 2,88 (m, 5H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,19 (m, 5H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,74 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,79 (s, 1H, CH), 4,30 (s, 1H, CH), 4,36 (td, 1H, CH<sub>2</sub>-α-N, J=9, 2 Hz), 4,88 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 7,57 (td, 1H, CH<sub>Ar</sub>, J=7, 2 Hz), 7,68 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>, J=9 Hz), 7,97 (td, 1H, CH<sub>Ar</sub>, J=9, 2 Hz), 8,65 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>, J=7 Hz)

**RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{D}_2\text{O}+\text{acetone-}d_6$ ) :**  $\delta = 45,3$  (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $49,0$  (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $49,1$  (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $49,6$  (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $49,7$  (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $52,7$  (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $59,5$  (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $63,1$  (1C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $63,5$  (1C,  $\text{CH}_2\text{-C}_{\text{Ar}}$ ),  $73,1$  (1C, CH),  $84,7$  (1C, CH),  $127,3$  (1C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ),  $129,5$  (1C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ),  $140,3$  (1C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ),  $148,8$  (1C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ),  $151,7$  (1C,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ )

**ESI-MS  $m/z$  :** 286,17 ; valeur théorique pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{ClN}_5 - \text{Cl}^- [\text{M-Cl}]^+$  : 286,20

**IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) :** 2945, 2883, 2834, 1480, 1451, 1184, 1054, 788

#### 1-*N*-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécane (composé 44)



Une solution du composé **43** (1,2 g, 2,67 mmol) dans de l'hydrate d'hydrazine (15 mL) est chauffée à reflux pendant 4 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est placé 12 heures à 0 °C et le précipité formé est filtré, lavé avec de l'hydrate d'hydrazine (5 mL), puis séché au dessiccateur sous vide pour conduire au composé **44** sous forme d'un solide blanc (0,64 g, 2,4 mmol).

**Tf :** 72°C

**RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta = 2,70$  (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $2,77$  (s, 3H, NH),  $2,91$  (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $3,87$  (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-C}_{\text{Ar}}$ ),  $7,24$  (td, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ,  $J=6$ , 2 Hz),  $7,56$  (d, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ,  $J=9$  Hz),  $7,55$  (td, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ,  $J=9$ , 2 Hz),  $8,54$  (dd, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ,  $J=6$ , 2 Hz)

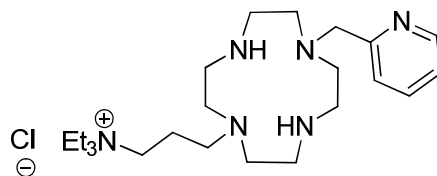
**RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta = 45,1$  (2C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $46,3$  (2C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $47,1$  (2C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $51,6$  (2C,  $\text{CH}_2\text{-}\alpha\text{-N}$ ),  $61,0$  (1C,  $\text{CH}_2\text{-C}_{\text{Ar}}$ ),  $122,0$  (1C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ),  $122,8$  (1C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ),  $136,6$  (2C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ),  $148,9$  (1C,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ )

**R<sub>f</sub> :** ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 90/10,  $I_2$ ) 0,73

**ESI-MS  $m/z$  :** 264, 16 ; valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_5 + \text{H}^+ [\text{M+H}]^+$  : 264,22

**IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) :** 3282, 2959, 2934, 1594, 1463, 1353, 1353, 1114, 824

**Chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(7-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1-yl)propan-1-aminium (composé 45)**



Un mélange constitué du composé **44** (0,82 g, 2,4 mmol), de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropylammonium (0,73 g, 2,4 mmol), de carbonate de potassium (0,33 g, 2,4 mmol) et d'acétonitrile anhydre (30 mL) est chauffé à reflux pendant 24 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré, et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (dichlorométhane/méthanol, 90/10, v/v) pour conduire à l'analogue bromé du composé **45** sous forme d'une huile orangée (0,70 g, 1,4 mmol). Ce dernier est repris dans le méthanol et déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluee par du méthanol. Les fractions d'intérêt sont évaporées sous pression réduite et le solide obtenu est séché au dessiccateur sous vide pour conduire au composé **45** sous forme d'une huile orangée (0,63 g, 1,4 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 1,19 (m, 9H, CH<sub>3</sub>), 1,55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 2,80 (m, 18H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,16 (m, 8H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,75 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>, *J*=20 Hz), 7,31 (t, 1H, CH<sub>Ar</sub>, *J*=40 Hz), 7,44 (d, 1H, CH<sub>Ar</sub>, *J*=40 Hz), 7,85 (t, 1H, CH<sub>Ar</sub>, *J*=60 Hz), 8,43 (td, 1H, CH<sub>Ar</sub>, *J*=60 Hz, 30 Hz)

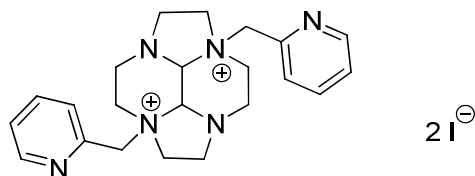
**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O+acetone-*d*<sub>6</sub>) :**  $\delta$  = 7,0 (3C, CH<sub>3</sub>), 12,7 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 15,6 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 21,6 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 46,0 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 48,0 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 49,4 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 49,8 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 50,4 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 50,9 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 52,7 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 53,0 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 55,0 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 59,2 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 61,8 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 124,4 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 128,3 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 138,5 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 148,8 (1C, CH<sub>Ar</sub>), 158,0 (1C, C<sub>Ar</sub>)

**R<sub>f</sub> :** (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10, réactif de Dragendorff) 0,36

**ESI-MS *m/z* :** 203,15 ; valeur théorique pour C<sub>23</sub>H<sub>45</sub>ClN<sub>6</sub> -Cl<sup>-</sup> + H<sup>+</sup> [M-Cl+H]<sup>2+</sup> : 203,19

**IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) :** 3400, 2948, 2833, 1590, 1474, 1164, 796

**Diiodure de *cis*-décahydro-2a,6a-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1H,6H-4a,8a-diaza-2a,6a-diazoniacyclopentacénaphthylène (composé 46)**



Le composé **46** a été synthétisé selon la méthode de El Hajj et coll. (10).

Du 2-picolyl chloride hydrochloride (1,14 g, 6,9 mmol) est ajouté à d'une solution aqueuse de soude (3 M) (20 mL). A la fin de l'effervescence, la 2-2-picolyl chloride est extraite avec du dichlorométhane (3 x 20 mL). Les fractions organiques sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'acétone anhydre (20 mL) et ajouté à une solution d'iodure de sodium (1,15 g, 7,5 mmol) dans de l'acétone anhydre (10 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 6 heures à température ambiante. Le précipité de chlorure de sodium obtenu est filtré, et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Celui-ci est repris dans de l'acétonitrile anhydre (20 mL) et ajouté à une solution de composé **42** (0,59 mg, 3,0 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (15 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 jours à température ambiante. Le précipité rouge formé est filtré, lavé à l'acétonitrile (20 mL) et séché sous pression réduite pour donner le composé **46** sous forme d'un solide rose (1,12 g, 1,8 mmol).

Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

**Tf** : 187°C

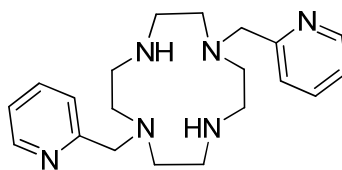
**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O)** :  $\delta$  = 2,58 (q, 2H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N,  $J$ =9 Hz), 3,31 (m, 14H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 4,80 (td, 2H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N,  $J$ =9, 2 Hz), 5,01 (s, 2H, CH), 4,90 (AB system, 4H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>,  $J$ =44 Hz), 7,57 (td, 2H, CH<sub>Ar</sub>,  $J$ =3, 0,5 Hz), 7,74 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>,  $J$ =9 Hz), 7,98 (td, 2H, CH<sub>Ar</sub>,  $J$ =3, 0,5 Hz), 8,68 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>,  $J$ =3 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, D<sub>2</sub>O+acetone-*d*<sub>6</sub>)** :  $\delta$  = 44,2 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 47,6 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 57,7 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 62,5 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 62,9 (2C, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 79,0 (2C, CH), 127,3 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 129,5 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 140,3 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 148,2 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 151,7 (2C, C<sub>Ar</sub>)

**ESI-MS *m/z*** : 189,05 ; valeur théorique pour C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>I<sub>2</sub>N<sub>6</sub> - 2 I<sup>-</sup> [M-2I]<sup>2+</sup> : 189,13

**IR (ATR)** )  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) : 2963, 2946, 2883, 2837, 1461, 1184, 1054, 845, 788

### 1,7-*N,N''*-Bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécane (composé 47)



Le composé 47 a été synthétisé selon la méthode de El Hajj et coll. (10).

Une solution du composé 46 (1,11 g, 1,8 mmol) dans de l'hydrate d'hydrazine (15 mL) est chauffée à reflux pendant 4 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est placé 12 heures à 0 °C et le précipité formé est filtré, lavé avec de l'hydrate d'hydrazine (5 mL), puis séché au dessiccateur sous vide pour conduire au composé 47 sous forme d'un solide rose (0,60 g, 1,7 mmol).

Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

**Tf :** 70°C

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ = 2,70 (m, 10H, CH<sub>2</sub>-α-N, NH), 3,16 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-α-N), 3,87 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 7,26 (td, 2H, CH<sub>Ar</sub>, J=3, 0,7 Hz), 7,61 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>, J=7 Hz), 7,77 (td, 2H, CH<sub>Ar</sub>, J=3, 0,7 Hz), 8,61 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>, J=3 Hz)

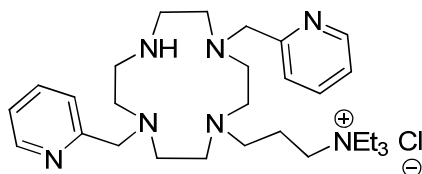
**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ = 45,1 (4C, CH<sub>2</sub>-α-N), 52,0 (4C, CH<sub>2</sub>-α-N), 61,3 (2C, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 122,0 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 122,8 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 136,3 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 149,0 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 159,5 (2C, C<sub>Ar</sub>)

**R<sub>f</sub> :** (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10, I<sub>2</sub>) 0,50

**ESI-MS m/z :** 355,36, 178,14 ; valeurs théoriques pour C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 355,26, C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub> + 2 H<sup>+</sup> [M+2H]<sup>2+</sup> : 178,13

**IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>)** 3276, 2959, 2933, 2836, 1593, 1436, 1055, 783

**Chlorure de 3-(4,10-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1-yl)-*N,N,N*-triéthylpropan-1-aminium (composé 48)**



Un mélange constitué du composé **47** (0,29 mg, 0,8 mmol), de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropylammonium (0,22 mg, 0,8 mmol), de carbonate de potassium (0,11 g, 0,8 mmol) et d'acétonitrile anhydre (30 mL) est chauffé à reflux pendant 24 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré, et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (dichlorométhane/méthanol, 90/10, v/v) pour conduire à l'analogue bromé du composé **48** sous forme d'une huile jaune (0,07 g, 0,1 mmol). Ce dernier est repris dans le méthanol et déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluee par du méthanol. Les fractions d'intérêt sont évaporées sous pression réduite et le solide obtenu est séché au dessiccateur sous vide pour conduire au composé **48** sous forme d'une huile jaune (0,05 g, 0,08 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta$  = 1,12 (t, 9H, CH<sub>3</sub>, *J*=4 Hz), 2,17 (s, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 2,59 (m, 10H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 2,91 (t, 6H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N, *J*=4 Hz), 3,16 (m, 6H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,29 (q, 8H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N, *J*=8 Hz), 7,48 (t, 2H, CH<sub>Ar</sub>, *J*=6 Hz), 7,59 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>, *J*=8 Hz), 7,96 (t, 2H, CH<sub>Ar</sub>, *J*=8 Hz), 8,68 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>, *J*=4 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, D<sub>2</sub>O+acetone-*d*<sub>6</sub>) :**  $\delta$  = 8,2 (3C, CH<sub>3</sub>), 14,5 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 47,5 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 50,2 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 50,4 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 51,0 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 51,4 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 53,9 (4C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 62,7 (2C, CH<sub>2</sub>-C<sub>Ar</sub>), 124,7 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 126,6 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 139,4 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 149,7 (2C, CH<sub>Ar</sub>), 159,8 (2C, C<sub>Ar</sub>)

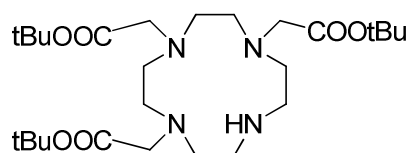
**R<sub>f</sub> :** (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10, réactif de Dragendorff) 0,19

**ESI-MS *m/z* :** 496,45, 248,68 ; valeurs théoriques pour C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>ClN<sub>7</sub> - Cl<sup>-</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> : 496,41, C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>ClN<sub>7</sub> - Cl<sup>-</sup> + H<sup>+</sup> [M-Cl+H]<sup>2+</sup> : 248,71

**IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) :** 3414, 2943, 2833, 1659, 1478, 1439, 796, 767



**1,4,7-*N,N',N''*-tris-(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane (composé 49)**



Le composé **49** a été synthétisé selon la méthode de Jagadish et coll. (11).

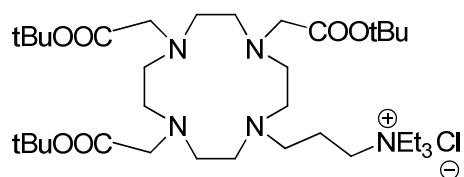
Une solution de bromoacétate de *tert*-butyl (3,77 g, 19,3 mmol) dans du *N,N*-diméthylacétamide (10 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution de cyclène (1,01 g, 5,9 mmol) et d'acétate de sodium (1,59 g, 19,3 mmol) dans le *N,N*-diméthylacétamide (15 mL), préalablement refroidie à -10°C avec un bain glacé (glace + NaCl). Après retour à température ambiante, l'agitation est maintenue pendant 24 heures. De l'eau désionisée (70 mL) est ensuite ajoutée au milieu réactionnel (suspension épaisse marron clair) jusqu'à solubilisation totale. De l'hydrogencarbonate de potassium (3,1 g, 30,7 mmol) est ajouté au milieu réactionnel et l'agitation est maintenue pendant 1 heure. Le précipité apparu est filtré, repris dans le trichlorométhane (50 mL), lavée avec de l'eau désionisée (30 mL), séché sur sulfate de sodium puis concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à environ 5 mL. L'addition d'éther éthylique (75 mL) à ce résidu concentré provoque la précipitation d'un solide blanc recueilli par filtration et séché. Ce solide est dissous dans de l'eau désionisée (160 mL) portée à 75°C. La solution est refroidie à 40°C puis 5 mL de potasse (10%, m/m) (2 eq) sont ajoutés. L'agitation est maintenue pendant 2 heures à température ambiante. La phase aqueuse est extraite avec du n-hexane (3 x 100 mL), les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de sodium puis évaporées à sec sous pression réduite pour conduire au composé **49** (1,15 g, 2,2 mmol) sous la forme d'une huile incolore qui cristallise lentement après quelques jours.

Les valeurs des caractérisations sont en accord avec la littérature.

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  = 1,44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1,45 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 2,60 (t, 4H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N,  $J=4,7$  Hz), 2,76 (brs, 8H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 2,85 (t, 4H, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N,  $J=4,7$  Hz), 3,31 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO-), 3,33 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>-COO-)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  = 28,1 (3C, CH<sub>3</sub>), 28,2 (6C, CH<sub>3</sub>), 47,3 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 48,5 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 49,1 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 51,3 (4C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N, -CH<sub>2</sub>-COO-), 58,1 (1C, -CH<sub>2</sub>-COO-), 81,7 (1C, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 81,9 (2C, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 169,6 (2C, -CO-), 170,6 (1C, -CO-)

**Chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminium (composé 50)**



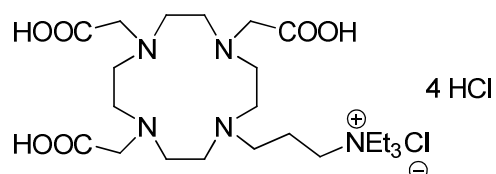
Un mélange constitué du composé **49** (0,92 g, 1,8 mmol), de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropylammonium (0,65 g, 2,2 mmol), de carbonate de potassium (0,25 g, 1,8 mmol) et d'acétonitrile anhydre (40 mL) est chauffé à reflux pendant 48 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré, et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de phase inverse RP C18 (CH<sub>3</sub>CN à 20 mmol HFBA/ H<sub>2</sub>O à 20 mmol HFBA, 20/80 puis 50/50, v/v) les fractions pures sont ensuite éluées sur colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures pour conduire au composé **50** (0,74 g, 1,07 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, MeOD) :**  $\delta$  = 1,35 (t, 9H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-,  $J=7,0$  Hz), 1,51 (s, 18H, CH<sub>3</sub>-C), 1,57 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-C), 2,20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 3,05-3,65 (m, 30H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N, N-CH<sub>2</sub>-COOtBu), 4,13 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-COOtBu)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, MeOD) :**  $\delta$  = 7,7 (3C, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 16,0 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 28,6 (6C, CH<sub>3</sub>-C), 28,8 (3C, CH<sub>3</sub>-C), 45,1 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 47,3 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 48,5 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 49,1 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 51,3 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 53,8 (3C, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 54,8 (2C, -CH<sub>2</sub>-COO-), 55,9 (1C, CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>), 58,1 (1C, -CH<sub>2</sub>-COO-), 81,5 (1C, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 81,6 (2C, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 170,5 (2C, -CO-), 170,7 (1C, -CO-)

**ESI-MS m/z :** 656,51 ; valeur théorique pour C<sub>35</sub>H<sub>70</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>6</sub> - Cl<sup>-</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> : 656,53

**Chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tétrazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminium (composé 51)**



Le composé **50** (500 mg, 0,72 mmol) est mis en suspension dans l'éther éthylique HCl 3M. La suspension est agitée pendant 3 heures à température ambiante puis filtrée. Le

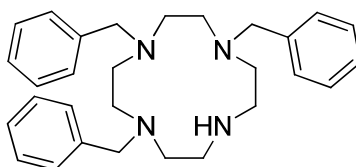
résidu solide obtenu est lavé avec de l'éther éthylique (3 x 50 mL) pour conduire au composé **51** (360 mg, 0,54 mmol) sous sa forme chlorhydrate.

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, MeOD) :**  $\delta$  = 1,24 (t, 9H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-,  $J=6,5$  Hz), 2,02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 3,24 (m, 26H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 3,70 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>-COOH), 3,97 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-COOH)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, MeOD) :**  $\delta$  = 7,6 (3C, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 15,9 (1C, CH<sub>2</sub>- $\beta$ -N), 45,1 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 47,4 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 48,5 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 49,5 (1C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 52,5 (2C, CH<sub>2</sub>- $\alpha$ -N), 55,0 (3C, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 58,7 (1C, CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>), 60,9 (3C, -CH<sub>2</sub>-COO-), 175,5 (3C, -CO-)

**ESI-MS m/z :** 488,31 ; valeur théorique pour C<sub>23</sub>H<sub>46</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>6</sub> - Cl<sup>-</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> : 488,34

### Synthèse du 1,4,7-*N,N',N''*-Tribenzyl-1,4,7,10-tétrazacyclododécane (composé **52**)



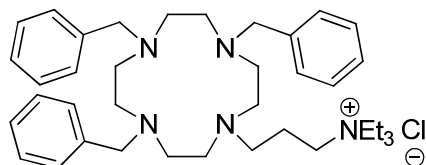
Une solution de bromure de benzyle (1,74 g, 10,2 mmol) dans le chloroforme (10 mL) est ajoutée goutte à goutte à un mélange de cyclène (0,50 g, 2,90 mmol) et de triéthylamine (2,94 g, 29,1 mmol) dans le chloroforme (30 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures, avant d'être lavé avec de l'eau désionisée (3 x 40 mL), séché avec du sulfate de sodium, filtré puis évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux obtenu est ensuite purifié sur colonne d'alumine (acétate d'éthyle/méthanol, 98/2 puis 95/5, v/v) pour conduire par ordre d'éluion au composé tetrabenzylé ( $R_f$  = 0,25, AcOEt/MeOH, 95/5) et au composé **52** ( $R_f$  = 0,05, AcOEt/MeOH, 95/5) (0,62 g, 1,40 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta$  = 2,53 (s, 8H), 2,64 (m, 4H), 2,72 (m, 4H), 3,27 (s, 2H), 3,53 (s, 4H), 7,20 (m, 11H), 7,36 (dd, 4H,  $J$  = 7,7, 1,7 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta$  = 47,6, 51,0, 51,5, 61,3, 126,9, 127,4, 128,2, 128,4, 129,4, 139,2

**ESI-MS m/z :** 443,37 ; valeur théorique pour C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 443,37

**Chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10-tribenzyl-1,4,7,10-tétraazacyclododécan-1-yl)propan-1-aminium (composé 53)**



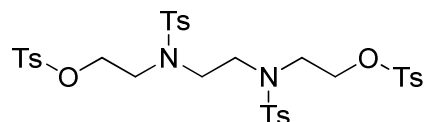
Une solution du composé **52** (0,33 g, 0,74 mmol), de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropylammonium (0,23 g, 0,74 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (50 mL) est chauffé à reflux pendant 15 heures. Après retour à température ambiante, la solution est évaporée sous pression réduite et le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (dichlorométhane/méthanol, 98/2 puis 95/5, v/v) pour conduire par ordre d'éluion au composé **52** ( $R_f = 0,53$ , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5) et à l'analogue bromé du composé **53** ( $R_f = 0,26$ , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5) sous forme d'un solide blanc (0,36 g, 0,54 mmol). Ce dérivé bromé est repris dans le méthanol et déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures éluee avec du méthanol. Après évaporation et séchage, on obtient le composé **53** (0,31 g, 0,50 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta = 1,26$  (se, 9H), 2,23 (se, 2H), 2,70 (se, 6H), 2,78 (se, 4H), 3,14 (m, 4H), 3,44 (se, 12H), 3,66 (se, 6H), 7,13-7,40 (m, 15H)

**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta = 8,1$ , 20,5, 48,4, 49,0, 49,3, 51,8, 52,0, 53,6, 55,2, 57,3, 60,3, 127,9, 128,2, 128,7, 128,9, 130,5, 131,0, 136,6

**HRMS (TOF MS ES<sup>+</sup>)** : 584,4656 ; valeur théorique pour C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>ClN<sub>5</sub> – Cl<sup>-</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> : 584,4692

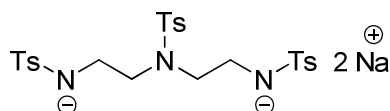
**Tétratosyl-*N,N'*-bis(2-hydroxyéthyl)éthylènediamine (composé 54)**



solution de *N,N'*-bis-(2-hydroxyéthyl)éthylène diamine (5 g, 33,7 mmol) et de triéthylamine (21,3 mL, 0,15 mol) dans le dichlorométhane (125 mL) est maintenue à 0°C et sous atmosphère inerte. Du chlorure de *p*-toluènesulfonyle (27 g, 0,14 mol) est ajouté par portions en 30 minutes. Après retour à température ambiante du milieu réactionnel, l'agitation est maintenue pendant 15 heures. Le précipité blanc formé est filtré, et le filtrat est lavé successivement avec une solution de HCl 1M (3 x 100 mL), de l'eau désionisée (100

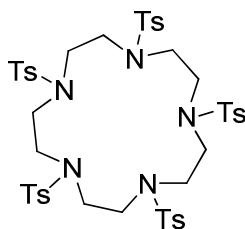


### Ditosyl-N,N'-2-aminoéthyl-éthylènediamine de sodium (composé 56)



Une solution de composé 55 (69,2 g, 0,13 mol) dans l'éthanol anhydre (300 mL) est chauffée à 80°C sous atmosphère inerte. Une solution de sodium (5,68 g, 0,26 mol) dans l'éthanol anhydre est ajoutée au milieu réactionnel et l'agitation est maintenue pendant 30 minutes. De l'éther éthylique (200 mL) est ajouté au milieu réactionnel et le précipité est filtré sous banc d'argon. Le solide est lavé avec de l'éther éthylique (2 x 200 mL) et séché à l'évaporateur rotatif sous atmosphère d'argon pour conduire au composé 56 (79,2 g, 0,13 mol) sous la forme d'un solide blanc.

### 1,4,7,10,13-N,N',N'',N''',N''''-pentatosyl-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécane (composé 57)



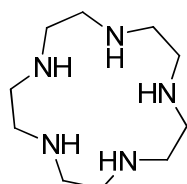
Une solution de composé 56 (15 g, 24,6 mmol) dans le DMF anhydre (75 mL) est chauffée à 110°C sous atmosphère inerte. Une solution de composé 54 (18,8 g, 24,6 mmol) dans le DMF anhydre (100 mL) est ajoutée goutte à goutte pendant 3 heures au milieu réactionnel. A la fin de l'addition, l'agitation est maintenue pendant 15 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif puis est ajouté goutte à goutte à de l'eau désionisée glacée (500 mL). Le précipité formé est lavé successivement avec de l'eau désionisée (3 x 150 mL), du méthanol (3 x 100 mL) et de l'éther éthylique (3 x 100 mL) puis est séché au dessiccateur. Le solide blanc est ensuite purifié par extraction au soxhlet dans l'acétonitrile à reflux (200 mL) pendant 4 jours. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif et placé 6 heures à 0°C. Le solide formé est lavé à l'éther éthylique et séché sous dessiccateur pour conduire au composé 57 (20,9 g, 21,2 mmol) sous la forme d'un solide blanc.

Tf : 262°C

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 2,45 (s, 15H, CH<sub>3</sub>), 3,27 (s, 20H, CH<sub>2</sub>-α-N), 7,31 (m, 10H, CH<sub>Ar</sub>), 7,65 (m, 10H, CH<sub>Ar</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 22,0 (5C, CH<sub>3</sub>), 50,1 (10C, CH<sub>2</sub>-α-N), 127,8 (10C, CH<sub>Ar</sub>), 130,4 (10C, CH<sub>Ar</sub>), 135,2 (5C, C<sub>Ar</sub>), 144,4 (5C, C<sub>Ar</sub>)

### 1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécane (composé 58)



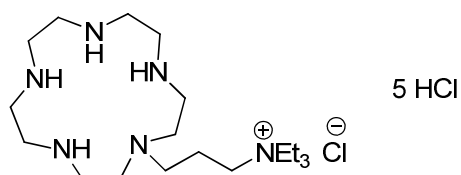
Le composé 57 (15,25 g, 15,46 mmol) est dissous dans de l'acide sulfurique concentré (95-97% dans l'eau, m/m) (125 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à 120 °C pendant 48 heures. Après retour à température ambiante, le mélange est ajouté goutte à goutte sous agitation forte à une solution méthanol/éther éthylique (50/50, v/v) (250 mL) refroidie par un bain de glace. Le précipité gris clair obtenu (i.e. le dérivé pentahydrosulfate) est récupéré par filtration et lavé avec une solution méthanol/éther éthylique (50/50, v/v) (3 x 75 mL). Après séchage, 8,68 g de solide gris clair sont obtenus. Ce solide est dissous dans l'eau désionisée (20 mL) avant d'être déposé sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions hydroxyde éluee avec de l'eau désionisée. Toutes les fractions basiques recueillies (pH > 9) sont rassemblées et évaporées à sec pour conduire au composé 58 (3,33 g, 15,46 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 2,19 (s, 5H, NH), 2,74 (s, 20H, CH<sub>2</sub>-α-N)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 49,1 (10C, CH<sub>2</sub>-α-N)

**ESI-MS m/z** : 216 ; valeur théorique pour C<sub>10</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub> + H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 216,20

### Chlorure de N,N,N-triéthyl-3-(1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécane-1-yl)propan-1-aminium (composé 59)



A une solution du composé **58** (1,14 g, 5,29 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (35 mL) est ajouté du carbonate de potassium (0,731 g, 5,29 mmol). La suspension est portée à reflux puis une solution, constituée de bromure de 3-bromo-*N,N,N*-triéthylpropylammonium (1,12 g, 3,70 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (35 mL), est alors ajouté lentement sur une période d'1 heure. Le milieu réactionnel est maintenu à reflux sous agitation pendant 20 heures. Après retour à température ambiante, l'excès de carbonate de potassium est éliminé par filtration. L'huile pâteuse, obtenue après évaporation, est triturée successivement avec du toluène (2 x 40 mL) et de l'éther éthylique (2 x 40 mL) pour éliminer le réactif de départ **58** n'ayant pas réagi (0,35 g, 1,62 mmol après évaporation).

Le résidu obtenu après lavage est séché sous vide pour conduire à l'analogue bromé du composé **59** sous forme d'un solide blanc très hygroscopique (1,57 g, 3,59 mmol). Ce produit est purifié sur colonne phase inverse. Une première élution par un mélange acétonitrile 20 mM HFBA / eau ultrapure 20 mM HFBA (20/80, v/v) permet d'éliminer une partie des impuretés. Une seconde élution par un mélange acétonitrile 20 mM HFBA / eau ultrapure 20 mM HFBA (30/70, v/v) permet d'éluer le produit désiré. Les fractions obtenues sont contrôlées par CCM d'alumine sans migration à l'aide du réactif de Dragendorff. Les fractions d'intérêt sont regroupées et évaporées sous vide. Le résidu huileux obtenu est remis en solution dans l'éthanol et élué à l'éthanol sur une colonne échangeuse d'anions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures. Après évaporation et séchage, le composé **59** est obtenu sous forme d'un solide blanc hygroscopique (1,10 g, 2,80 mmol).

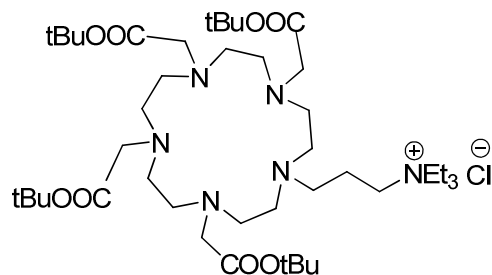
**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ = 1,24 (t, 9H, *J* = 8 Hz), 1,82 (m, 2H), 2,40-2,80 (m, 22H), 3,13 (t, 2H, *J* = 8 Hz), 3,27 (q, 6H, *J* = 8 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, D<sub>2</sub>O+acetone-*d*<sub>6</sub>) :** δ = 6,7, 15,6, 43,4, 44,2, 44,4, 45,5, 48,0, 49,2, 52,7, 53,0, 54,2

**ESI-MS *m/z* :** 357,0 ; valeur théorique pour C<sub>19</sub>H<sub>45</sub>ClN<sub>6</sub> – Cl<sup>-</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> : 357,37



**Chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10,13-tétrakis(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10,13-pentaazacyclodécane-1-yl)propan-1-aminium (composé 60)**

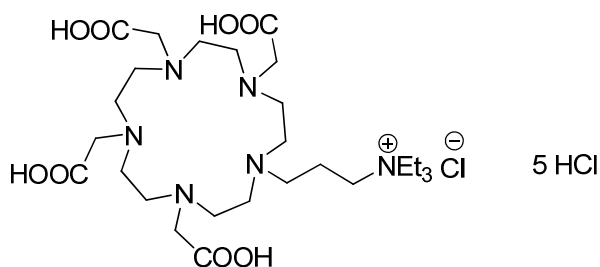


Une solution de composé 59 (0,30 g, 0,52 mmol) et de carbonate de potassium (0,72 g, 5,2 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (30 mL) est agitée pendant 30 minutes, puis une solution de bromoacétate de *tert*-butyl (0,42 g, 2,2 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (20 mL) est ajoutée goutte à goutte. Durant toute la durée de l'addition la température du milieu réactionnel est maintenue à 0°C (bain de glace). Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est agité pendant 48 heures. Après évaporation à sec du milieu réactionnel à l'évaporateur rotatif, le résidu est trituré avec de l'acétone (30 mL) puis filtré. Le filtrat est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est élué successivement sur une colonne d'alumine (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 99/1, v/v) puis sur une colonne échangeuse d'ions (type DOWEX 1x8, 200-400 mesh) saturée en ions chlorures pour conduire au composé 60 sous la forme d'un solide blanc (309 mg, 0,36 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)** :  $\delta$  = 1,20 (s, 9H), 1,46 (brs, 27H), 1,54 (t, 9H,  $J$  = 7 Hz), 1,98 (m, 2H), 2,60 (m, 4H), 2,88 (brs, 10H), 3,39 (m, 2H), 3,55 (m, 14), 3,87 (brs, 2H), 4,21 (m, 4H), 5,08 (m, 2H)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)** :  $\delta$  = 8,3 (3C), 20,0 (1C), 28,4 (12C), 46,5 (1C), 48,4 (2C), 52,6 (2C), 53,7 (3C), 54,1 (3C), 55,3 (2C), 55,8 (1C), 56,6 (2C), 57,6 (1C), 60,0 (1C), 61,1 (1C), 81,0 (3C), 81,6 (1C), 171,4 (4C)

**Chlorure de *N,N,N*-triéthyl-3-(4,7,10,13-tétrakis(carboxyméthyl)-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécan-1-yl)propan-1-aminium (composé 61)**



Le composé **60** (200 mg, 0,24 mmol) est mis en suspension dans l'éther éthylique HCl 3M. La suspension est agitée pendant 3 heures à température ambiante puis filtrée. Le résidu solide obtenu est lavé avec l'éther éthylique (3 x 20 mL) pour conduire à la forme chlorhydrate du composé **61** (153 mg, 0,19 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta = 1,25$  (t, 9H,  $J = 7$  Hz),  $2,15$  (m, 2H),  $3,29$  (brs, 10H),  $3,33$  (brs, 8H),  $3,45-4,40$  (m, 20H)

**RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, D<sub>2</sub>O+acetone-*d*<sub>6</sub>) :**  $\delta = 8,3$  (3C),  $21,4$  (1C),  $49,3-62,4$  (19C),  $180,2$  (4C)



1. **Bruker**. APEX2, SAINT and SADABS. Bruker AXS Inc, Madison, Wisconsin, USA : s.n., 2012.
2. **Sheldrick, G. M.** *Acta Crystallographia*. 2008, Vol. A64, pp. 112-122.
3. **Farrugia, L. J.** *Journal of Applied Crystallography*. 2012, Vol. 45, pp. 849-854.
4. **Fabbrizzi, L. et al.** Light-emitting molecular machines : pH-induced intramolecular motions in a fluorescent nickel (II) scorpionate complex. *Chemistry - A European Journal*. 2002, Vol. 8, 21, pp. 4965-4972.
5. **Weisman, G. R., Ho, S. C. H, Johnson, V.** Tetracyclic tetraamines by glyoxal-macrocylic tetraamine condensation. *Tetrahedron Letters*. 1980, Vol. 21, 4, pp. 335-338.
6. **Le Baccon, M. et al.** Bis-aminal : efficient tools for bis-macrocycle synthesis. *New Journal of Chemistry*. 2001, Vol. 25, pp. 1168-1174.
7. **Bailly, T. et al.** Synthesis of a new tricyclic ring system : 1,4,8,11-tetraazatricyclo(9.3.1.14,8)hexadecane obtained by the reaction of tetramethyldiaminomethane with 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane (cyclam). *Académie des Sciences. serie IIB*, 1996, Vol. 322, 2, pp. 151-154.
8. **Royal, G. et al.** New synthesis of trans-disubstituted cyclam macrocycles - Elucidation of the disubstitution mechanism on the basis of x-ray data and molecular modeling. *European Journal of Organic Chemistry*. 1998, pp. 1971-1975.
9. **Goubert-Renaudin, S. et al.** Voltametric detection of lead(II) using amide-cyclam-functionalized silica-modified carbon paste electrodes. *Electroanalysis*. 2009, Vol. 21, 15, pp. 1731-1742.
10. **El Hajj, F. et al.** Macrocycle-based spin-crossover materials. *Inorganic Chemistry*. 2009, Vol. 48, pp. 10416-10423.
11. **Jagadish, B. et al.** On the synthesis of 1,4,7-tris(tert-butoxycarbonylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane. *Tetrahedron Letters*. 52, 2011, pp. 2058-2061.











## **Conceptions et évaluations biologiques de nouveaux radiotraceurs**

Les pathologies modifiant l'intégrité de la matrice cartilagineuse (arthrose, arthrite, pathologies des disques intervertébraux, chondrosarcome...) sont caractérisées par un diagnostic tardif dû à l'absence d'un marqueur spécifique du cartilage. Notre unité de recherche développe depuis quelques années un radiotraceur à base de  $^{99m}\text{Tc}$  capable de se lier aux protéoglycanes, un des constituants essentiels du cartilage. Son utilisation en tomographie par émission monophotonique (TEMP) a permis de mettre en évidence sa capacité à cibler spécifiquement les protéoglycanes du cartilage. Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent dans la continuité de cette étude. De nouveaux radiotraceurs à base de cuivre-64 ont été synthétisés avec pour objectif de réaliser une imagerie fonctionnelle et quantifiable du cartilage en tomographie par émission de positons (TEP). La structure de base de ces radiotraceurs combine une partie vectrice ciblant spécifiquement les protéoglycanes du cartilage (fonction ammonium quaternaire) et une partie chélatante affine de l'ion cuivrique (polyazamacrocycle). Nos études préliminaires montrent que ces radiotraceurs pourraient permettre un diagnostic précoce et un suivi longitudinal des pathologies du cartilage.

Mots-clés : arthrose, chondrosarcome, protéoglycane, radiotraceur, cuivre-64, imagerie TEP

## **Designs and biologicals evaluations of new radiotracers**

Pathologies altering the integrity of the cartilaginous matrix (osteoarthritis, arthritis, intervertebral discs diseases, chondrosarcoma...) are characterized by a delayed diagnosis due to the absence of a specific marker of cartilage. Since several years, our research unit developed a radiotracer based on  $^{99m}\text{Tc}$  able of binding proteoglycans, one of the essential constituents of the cartilage. Its use in single photon emission tomography (SPECT) had enabled to demonstrate its ability to specifically target the cartilage proteoglycans. Works reported in this thesis are a follow-up to this study. New radiotracers based on copper-64 were synthesized with the aim to achieve functional and quantifiable cartilage imaging in positron emission tomography (PET). The basic structure of these radiotracers combines a carrier function specifically targeting cartilage proteoglycan (quaternary ammonium function) and a chelating moiety for cupric ion (polyazamacrocycle). Our preliminary studies show that these radiotracers could allow early diagnosis and a longitudinal follow-up of cartilage diseases.

Keywords : osteoarthritis, chondrosarcoma, proteoglycan, radiotracer, copper-64, PET imaging