



HAL
open science

Développement, synthèse et marquage au fluor-18 de ligands de la Lp-PLA2 pour la détection précoce de plaques d'athérome par imagerie TEP.

Florian Guibbal

► **To cite this version:**

Florian Guibbal. Développement, synthèse et marquage au fluor-18 de ligands de la Lp-PLA2 pour la détection précoce de plaques d'athérome par imagerie TEP.. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université de la Réunion, 2017. Français. NNT : 2017LARE0017 . tel-01881006

HAL Id: tel-01881006

<https://theses.hal.science/tel-01881006>

Submitted on 25 Sep 2018

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 DE LA RÉUNION
UFR SCIENCES ET TECHNOLOGIES



THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

Spécialité Chimie Organique

par

Florian GUIBBAL

**Développement, synthèse et marquage au fluor-18 de
ligands de la Lp-PLA₂ pour la détection précoce de
plaques d'athérome par imagerie TEP.**

Soutenue le 27 septembre 2017 devant la commission d'examen :

Mme le Professeur	Pascale Guiraud	Présidente	(Université de la Réunion)
Mme le Professeur	Sonia Karabina	Rapportrice	(Université Pierre et Marie Curie)
M. le Professeur	Raphaël Tripier	Rapporteur	(Université de Bretagne occidentale)
M. le Docteur	Frédéric Dollé	Examineur	(CEA)
M. le Docteur	Jimmy Sélambarom	Examineur	(Université de la Réunion)
M. le Docteur	Olivier Meilhac	Directeur	(INSERM)
Mme le Docteur	Emmanuelle Jestin	Encadrante	(Université de la Réunion-CYROI)

« Ce n'est pas le titre qui honore l'homme mais l'homme qui honore le titre »

Nicolas Machiavel

« Ceux qui veulent une belle fin à leur histoire doivent l'écrire eux même »

Paine FFX-2

« C'est par le travail que l'homme se transforme »

Louis Aragon

À Shu,

Sans qui rien n'aurait été possible

Remerciements

Je voudrais remercier vivement Madame Pascale GUIRAUD pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements à Monsieur Raphaël TRIPIER ainsi qu'à Madame Sonia KARABINA pour avoir accepté d'évaluer et de juger ces travaux de thèse en tant que rapporteurs.

Je souhaite également témoigner ma reconnaissance et remercier Messieurs Jimmy SELAMBAROM et Frédéric DOLLÉ pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je voudrais tout d'abord adresser mes sincères remerciements, mon amitié et mon affection à Monsieur Olivier MEILHAC, mon directeur de thèse et directeur de l'UMR DÉTROU U1188 Inserm – Université de La Réunion. Merci de m'avoir accueilli au sein de ton laboratoire, merci pour ton investissement continu, ta patience, ta pédagogie, tes conseils éclairés mais également tes mimiques inimitables. Même si les séances de maté n'auront pas toujours eu le même goût ou encore la même productivité scientifique, merci pour le savoir enseigné, la rigueur transmise et ces moments précieux. Nous ne sommes peut-être pas les meilleurs chanteurs de cette terre, mais les oreilles de Gaïa tremblent néanmoins devant notre duo stratosphérique.

Je voudrais ensuite remercier Madame Emmanuelle JESTIN, mon encadrante ainsi que la responsable du RIPA sur la plateforme de recherche GIP-CYROU. Merci pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces travaux de thèse qui n'auraient pas existé sans ton intuition pour ce projet. Merci pour les conseils et le temps passé à m'écouter me lamenter (temps qui ne va pas en se raccourcissant) et surtout pour m'avoir guidé et épaulé dans une branche de la science que j'ignorais totalement.

Je tiens ensuite à remercier profondément Monsieur Sébastien BÉNARD, mon co-encadrant de thèse. Merci beaucoup Seb pour tout ce que tu m'as appris. Je n'aurai pas assez de place ici pour écrire tout ce qui me vient à l'esprit. Merci pour ta bonne humeur, ton humour, ta culture sans fin de la chimie organique. Je voudrais également te remercier pour avoir fait de moi le chimiste que je suis aujourd'hui. Malgré nos moments de hauts et de bas, j'ai réussi à surmonter les épreuves et c'est en grande partie grâce à ton soutien et ta présence.

Je souhaite également remercier Monsieur Christian MÉRIAU pour m'avoir accueilli au sein de la plateforme GIP-CYROU ainsi que pour la mise à disposition du matériel et des équipements.

Je voudrais également remercier l'entreprise PROMONET-PROMÉDICAL pour m'avoir permis de réaliser une thèse CIFRE au sein de l'entreprise ainsi que pour la confiance qu'elle m'a accordée.

Je souhaite aussi remercier l'ANRT pour m'avoir accordé une bourse CIFRE, ainsi que l'Université de la Réunion, l'école doctorale et son directeur Monsieur Christian LEFEBVRE D'HELLENCOURT pour leur soutien financier.

Je témoigne un profond respect et toute ma gratitude à l'ensemble des membres de DÉTROU. Merci à tous pour ces moments conviviaux et de complicité. Même si la seule phrase de moi que vous retiendrez est : « Je suis fatigué... » sachez que vivre cette expérience entouré par des biologistes de talent a été un réel bonheur pour moi.

Je tiens également à remercier de tout cœur l'ensemble du personnel CYROI avec qui j'ai passé des moments plus qu'agréables tant personnels que professionnels. Je ne cesserai d'avoir de petits yeux le matin. Merci à Anaëlle, Géraldine, Maya, Michel et tous ceux que j'aurai oublié de citer mais qui ne sont pas oubliés.

Un merci spécial pour Aurélie et Angélique. Vous êtes sûrement les plus chanceuses de cette unité à m'avoir vu sous tous les angles. Les moments passés à travailler, à rire et ces instants chers à Biarritz resteront gravés.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements à l'équipe de production du CYROI. Merci à tous pour la bonne humeur à 7h du mat'. Sans votre aide, vos compétences et votre bonne humeur, les manip de radiochimie n'auraient pas eu le même attrait.

Je souhaite aussi remercier Jean-Patrick et Jimmy pour leur aide en spectrométrie de masse. Les bonnes blagues et la bonne humeur auront su me redonner du baume au cœur quand le moral n'y était pas.

Je tiens à remercier vivement Gilles. Tu sais, dans la vie, les gens te traitent souvent pour ce que tu n'es pas. Tu as su voir à travers les apparences. Merci pour tous ces moments passés à discuter science mais surtout merci pour ces attentions, ton affection et ton amitié.

J'aimerais remercier chaleureusement Marie-Paule. Merci pour ces moments passés côte à côte. Merci pour les conseils qu'ils soient nutritionnels (et oui plus de sodas), professionnels (alors ça avance cette rédaction ?) et personnels. Merci pour m'avoir soutenu et aidé dans cette thèse pluridisciplinaire où l'expertise d'une biologiste affirmée et vétérane était plus que précieuse.

Je souhaite également remercier Nicolas. Merci pour ces moments uniques en histologie ou encore en microscopie cloîtrés dans le noir. Merci pour la pédagogie, les conseils et les petits clin d'œil.

Je remercie également Jessica sans qui bon nombre de mes résultats n'auraient pas vu le jour. Merci pour ta grande aide. Grâce à toi mes précieux sont maintenant en sécurité et se portent plus que bien.

Je remercie vivement Vincent pour sa participation aux expérimentations radiochimiques. Merci pour ces moments cloîtrés où je t'ai fait partager mon goût de la musique démodée dans des températures illégales. On s'est un peu gelé les miches en zone mais c'était pour la bonne cause !

J'aimerai de tout cœur remercier Imade pour son aide plus que précieuse sur petit animal. Merci Imade d'avoir passé des heures avec moi, dans le froid et la bonne humeur. Merci pour tous ces moments autour d'une clope, autour d'une blague, d'un sourire et d'un homme formidable. Ne change rien tu es parfait (et puis ça mettrait trop de temps) et garde ce que tu as vu pour toi...

Je souhaite remercier Joël et Pierre. Comme dirait Aragon ou presque, que serais-je sans vous ? Merci beaucoup pour votre aide sur ce fichu appareil qui est la plus belle invention de l'homme mais aussi celle qui met notre patience à rude épreuve. Le spectre reste et l'hélium s'envole...

J'aimerai également remercier la Majda dream team. Léa, Majda, Kévin, Manon avec qui j'aurai passé d'incroyables moments entre chants Disney et humour déplacé. Merci à tous pour tous ces moments précieux et maintenant gravés. Votre bonne humeur et joie de vivre n'auront de cesse de me faire sourire. Léa entraîne toi bien en classique et deviens incollable.

Un grand merci à Claire et Julien. Ces après-midi à essayer de penser à autre chose que la rédaction sont autant de moments que j'ai appréciés de passer avec vous.

Un grand merci à Jennyfer. Ces petites séances musicales à deux accords à 20h sont loin derrière nous. Aujourd'hui nous n'avons plus que la dernière ligne droite. Merci pour ton soutien, tes conseils, ton écoute et même si mon humour n'aura pas brisé ta ceinture de chasteté sache que je garde au fond de mon cœur de nombreux moments inoubliables.

Un énorme merci à Johan. Koi fé ? Comment dire... Mon compagnon de geekitude, de partage, de soutien, d'amitié. Merci d'avoir passé une semaine à installer Java sur mon portable pour qu'au final je travaille sur un fixe XD. Merci de me retrouver le soir quand la journée a été rude, merci de partager ces moments privilégiés. Et qui sait ? Peut-être irons-nous applaudir Faker en Chine cette année. L'avenir nous le dira... En tout cas, promis, prochain concert de FF tu seras prévenu et tu te joindras à moi pour le prélude à toute une vie et notre amitié.

Un immense merci à Fanny. Une vraie licorne, pleine de bonne humeur, de couleurs, de sourires, de gentillesse, de conseils, d'amour et tant d'autres. Tu sais, quelqu'un voit tout ce que tu accomplis pour les autres et te le rendra. Après nous avoir menés avec Shu sur l'autel, tu m'auras soutenu jour et nuit. Moi, le petit Caliméro, fier de te connaître et surtout de partager un morceau de cette vie avec toi.

Bien qu'aller CHEZ le coiffeur avec toi serait un grand plaisir pour moi, je préfère écouter du Disney ou encore passer des heures avec Monsieur Brogniart devant la télé. Merci Fanny pour tes attentions et ton amitié sans faille. Tu as marié deux hommes avec tant de grâce et nous t'en serons reconnaissants à jamais.

A Émmie, la petite étoile. Le rôle de parrain est quelque chose que j'apprends grâce à toi et tes parents. Ne t'inquiète pas, je te ferai découvrir la vraie musique Disney, Barbara, Brel tout ça quoi. Un immense merci à Fanny pour ses sourires, sa bonne humeur et les craquages devant ce tant aimé logiciel Vivid. Ah, de beaux souvenirs...

À mes parents qui, depuis le départ, m'ont toujours soutenu tant dans mes choix professionnels que personnels. Merci à vous pour l'amour que vous nous portez tous les trois. L'avenir ne se décide pas en une fraction de seconde ou d'idée. Il faut le construire comme vous me l'avez appris. Merci à Amélia pour avoir pris le temps de relire ce manuscrit (en même temps tu es comme moi en orthographe XD) et Damien avec qui nous avons traversé de nombreuses épreuves. Merci à ma famille pour leur soutien et leur amour.

Enfin, mon petit Shu. Ah, l'homme de ma vie. On en aura fait du chemin jusqu'ici. Les épreuves, les difficultés, les plaisirs et les joies sont tant de choses que j'aime quand je suis auprès de toi. Même si je suis un professionnel du guet-apens, sache que je ne pourrai résumer en un paragraphe tous les moments que nous avons passés ensemble. Les soirs de déprime devant le travail harassant. Les soirs d'excitation devant GOT. Les soirs de geekitude. Tant de choses que je veux continuer à faire, à vivre avec toi. Le chimiste des polymères que j'ai connu est devenu aujourd'hui un guide touristique de talent. Comme quoi, rien n'est impossible.

春雨秋霜，此爱不減，此情不變。

Résumé

L'athérosclérose est une maladie cardiovasculaire dont l'impact en santé publique dans les sociétés industrialisées nécessite de puissants outils diagnostics. La Phospholipase A₂ associée aux lipoprotéines (Lp-PLA₂) est une enzyme produite par les cellules inflammatoires (monocytes/macrophages) et transportée par les lipoprotéines basse densité (LDL) et haute densité (HDL). Avec son rôle d'hydrolyse des phospholipides oxydés à la surface des LDL, elle est présente en grande quantité au sein des plaques athéromateuses. Ces travaux de thèse traitent de la synthèse d'inhibiteurs ligands de la Lp-PLA₂ ainsi que leurs radiomarquages au fluor-18 afin de réaliser une imagerie TEP (Tomographie par Émission de Positons) de plaques d'athérosclérose.

La première partie de ce projet a été consacrée à la synthèse des références froides (¹⁹F) de nos ligands. Bien qu'une ambiguïté de la littérature ait rendu la synthèse complexe, les références ont été obtenues et nous avons proposé différentes méthodes permettant l'alkylation de la thiouracile.

La seconde partie de ces travaux a été consacrée à la synthèse des précurseurs de marquage permettant de produire le Darapladib marqué ainsi que ses analogues. Plusieurs voies ont été étudiées (aryles iodoniums, ylures) et c'est finalement la voie des aryl-boronates qui a été retenue permettant l'accès au précurseur du Darapladib. Ce composé a alors été engagé dans des radiomarquages induits par le cuivre en présence de ¹⁸F nucléophile et d'un co-solvant (n-BuOH), ce qui a permis l'obtention du ¹⁸F-Darapladib avec des rendements satisfaisants permettant de réaliser les expériences *in vivo* et *ex vivo*.

La dernière partie de ce projet a consisté en l'utilisation du radiotracer synthétisé dans deux modèles murins et sur des plaques d'athérosclérose carotidienne. Un premier modèle murin de mélanome a été utilisé. Ce modèle permet d'évaluer notre radiotracer dans des tumeurs métaboliquement actives. Après injection du radiotracer, aucun radiomarquage n'a été observé au sein des tumeurs induites en comparaison avec le ¹⁸F-FDG (radiotracer de référence pour les tumeurs et étudié dans l'athérosclérose). Le second modèle étudié est la souris ApoE -/- permettant la formation de plaques athéromateuses au niveau de l'aorte. L'imagerie corps entier a permis d'étudier la biodistribution du ¹⁸F-Darapladib et l'étude *ex vivo* de l'aorte de ces souris a permis d'observer un marquage spécifique du traceur le long de l'aorte où sont colocalisées des plaques observées macroscopiquement. Enfin, des carotides humaines ont été marquées par notre traceur montrant une accumulation dans des plaques athéromateuses mais également au niveau de dépôts lipidiques caractéristiques d'une plaque à risque de rupture.

En conclusion, la synthèse du ¹⁸F-Darapladib a permis le marquage spécifique de plaques d'athérome en ciblant la Lp-PLA₂ au sein de modèles murins et de carotides humaines. Une des perspectives majeures de ce travail serait d'étudier des analogues du ¹⁸F-Darapladib déjà radiomarqués au sein du laboratoire et présentant de meilleurs rendements de radiomarquage ainsi qu'un métabolisme et une élimination *in vivo* différents.

Abstract

Atherosclerosis is a cardiovascular disease that requires powerful diagnostic tools due to its impact on public health in industrialized societies. Lipoproteins associated Phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) is an enzyme produced by inflammatory cells (monocytes/macrophages) and associated to low and high density lipoproteins (LDL and HDL). By hydrolyzing oxidized phospholipids at the surface of oxidized LDL, this enzyme is overexpressed in atheroma plaques. This work deals with Lp-PLA₂ ligands synthesis, their radiolabelling using 18-fluorine and their use in PET (Positron Emission Tomography) imaging towards atherosclerotic vulnerable plaques.

The first part of this work focused on the synthesis of cold references (¹⁹F) of our ligands. Although a discrepancy in the literature rendered the synthesis tedious, those references were obtained and we proposed various routes towards thiouracile alkylation.

The second part of this PhD focused on radiolabelling precursors allowing ¹⁸F-labelling of Darapladib and its analogs. Various methods were studied (aryls iodonium, ylides) and it was through boronates moieties that the precursors of Darapladib were obtained. This compound was radiolabelled using an alcohol enhanced (n-BuOH) copper-mediated method using nucleophilic ¹⁸F allowing ¹⁸F-Darapladib recovery in satisfying yields for *in vivo* and *ex vivo* experiments.

The last part of this work dealt with our radiotracer use in two murine models and carotids atherosclerotic plaques. The first model consisted in murine melanoma and allows evaluation of our radiotracer in metabolically active tumor cells. After injection of the radiotracer, no accumulation was observed in induced tumors compared to ¹⁸F-FDG (gold standard for tumors and used in atherosclerosis imaging studies). The second model used was ApoE -/- mice that develop atheromatous plaques within their aortas. The whole body was studied allowing understanding of Darapladib biodistribution and *ex vivo* aorta studies showed a strong accumulation within the plaques correlating with macroscopic views of the aortas. Eventually, human carotids were incubated with the radiotracer showing a strong accumulation in pathological parts of the carotid but also in lipid deposits within the vessel characterizing vulnerable plaques prone to rupture.

To conclude, ¹⁸F-Darapladib synthesis allowed specific accumulation of atheroma plaques by targeting Lp-PLA₂ in murine and human models. The major perspective would be to study ¹⁸F-Darapladib analogs already radiolabelled in the laboratory. These compounds present better yields and show *in vivo* differences of metabolism and elimination compared to Darapladib.

Sommaire

Liste des publications et communications scientifiques.....	13
Abréviations	15
Liste des Figures.....	19
Liste des Tableaux.....	22
Liste des Schémas	23
Introduction générale.....	25
Chapitre I : Athérosclérose, diagnostic et Lp-PLA ₂	27
1) Introduction.....	29
2) Athérogenèse et complications associées à l'athérosclérose.....	31
2.1 Introduction	31
2.2 Dysfonction endothéliale et stress oxydant	32
2.3 LDL et LDL oxydées (LDLox)	34
2.4 LDLox et formation de cellules spumeuses	39
2.5 Néovascularisation	40
2.6 Fibrose ou cicatrisation vasculaire	42
2.7 Complications.....	44
2.8 Conclusion.....	47
3) Diagnostic de l'athérosclérose	49
3.1 Biomarqueurs circulants et tissulaires	51
3.1.1 Marqueurs de l'inflammation	51
3.1.2 Marqueurs lipoprotéiques.....	53
3.2 Imagerie de la plaque vulnérable.....	55
3.2.1 Méthodes invasives	55
3.2.1.1 Angiographie	55
3.2.1.2 Angioscopie.....	56
3.2.1.3 Echographie intravasculaire	57
3.2.1.4 Tomographie en cohérence optique.....	59
3.2.1.5 Thermographie	60
3.2.1.6 Imagerie par Résonance Magnétique Intravasculaire (IRMiv)	60
3.2.1.7 Spectroscopie.....	61
3.2.1.8 Conclusion.....	61
3.2.2 Imageries non-invasives	62
3.2.2.1 Angiographie CT (Computed Tomography)	62
3.2.2.2 Tomodensitométrie aux rayons X (TDMRX)	62

3.2.2.3 IRM	63
3.2.3 Médecine nucléaire.....	64
3.2.3.1 Radioactivité.....	65
3.2.3.2 Modalités d'imagerie nucléaire	65
3.2.3.3 Radiotraceurs en imagerie de l'athérosclérose	68
4) Phospholipase A ₂ associée aux lipoprotéines (Lp-PLA ₂)	74
4.1 Biochimie, propriétés structurales et fonctionnelles.....	75
4.4 Rôle de la Lp-PLA ₂ dans l'athérosclérose et son intérêt en imagerie nucléaire.....	77
Chapitre II : Étude du Darapladib	81
1) Introduction.....	83
2) Revue bibliographique	84
2.1 Historique	84
2.2 Études précliniques et cliniques	86
2) Synthèse du Darapladib	90
2.1 Stratégies de synthèse.....	90
2.2 Synthèse du fragment A	92
2.2.1 Méthode de Cardwell	92
2.2.2 Méthode de Hickey	94
2.2.3 Méthode de Mulholland	102
2.3 Synthèse du fragment B	105
2.4 Couplage des fragments A et B.....	108
Chapitre III : Synthèse des précurseurs et radiomarquage du Darapladib et de ses analogues	113
1) Introduction.....	115
2) Revue Bibliographique	116
2.1 Fluor-18.....	116
2.2 Échange isotopique.....	116
2.3 Radiomarquage de composés aliphatiques ou vinyliques	118
2.4 Radiomarquage des arènes	120
2.4.1 Fluoruration électrophile	120
2.4.2 Fluoruration nucléophile et via les métaux de transition	121
3) Synthèse des précurseurs	127
3.1 Voie de l'iode hypervalent	127
3.2 Voie des boronates	132
3) Étude des analogues structuraux	137
4) Radiomarquages.....	142
4.1 Radiomarquage du Darapladib.....	142

4.2 Radiomarquage des analogues structuraux	149
Chapitre IV : Imagerie de la plaque d'athérome	157
1) Modèles animaux	159
1.1 Modèle d'inflammation : mélanome murin B16	159
1.2 Modèle ApoE -/-	160
2) Expériences sur carotides humaines.....	164
3.3 Conclusion.....	165
Conclusion générale	167
Experimental Part	177
General information	179
Chemistry	181
Radiochemistry.....	225
1) General Materials and Methods	225
2) Synthesis of K ¹⁸ F	226
3) Automated synthesis of ¹⁸ F-Darapladib (¹⁸ F-16)	227
4) Quality control of ¹⁸ F-Darapladib ¹⁸ F-16	227
5) Stabilities in buffer and plasma of ¹⁸ F-Darapladib.....	228
Biology and associated imaging modalities	230
Références bibliographiques	235

Liste des publications et communications scientifiques

Publications dans des journaux à comité de lecture international

V. Abet, R. Evans, F. Guibbal, S. Caldarelli, R. Rodriguez Modular Construction of Dynamic Nucleodendrimers, **2014**, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 4862 –4866.

F. Guibbal, S. Bénard, J. Patché, V. Meneyrol, J. Couprie, O. Meilhac, E. Jestin Regioselectivity of Thiouracile Alkylation: Application to Optimization of Darapladib Synthesis, soumis.

F. Guibbal, V. Meneyrol, I. Ait-Arsa, S. Bénard, F. Gimié, J. Yong-Sang, I. Khantaline, R. Veerapen, E. Jestin, O. Meilhac. Development, Synthesis and ¹⁸F- Labeling of an Lp-PLA₂ Ligand for PET Imaging of Atherosclerotic Plaques, *en préparation*.

Brevet - F. Guibbal, S. Bénard, E. Jestin, O. Meilhac Development, Synthesis and Radiolabelling of Various Lp-PLA₂ Ligand for Medical Imaging, EP17306272.0 *déposé le 26/09/2017*.

Communications et affiches

2013 - 13th ICSN Symposium (Gif/Yvette, France) « Modular Construction of Dynamic Nucleodendrimers » (Poster).

2016 - 3MT® (Bordeaux, France) « Nouveaux outils pour la détection précoce de plaques d'athérome vulnérables » (Communication orale).

2017 – 13^{ème} Congrès annuel de la Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (Biarritz, France) « Development, Synthesis and ¹⁸F- Labelling of an Lp-PLA₂ Ligand for PET Imaging of Vulnerable Atherosclerotic Plaques » (Poster).

Abréviations

Biologie

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIT	Accident Ischémique Transitoire
Apo	Apolipoprotéine
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
CML	Cellules Musculaires Lisses
cPLA ₂	Phospholipase A ₂ cytosolique
CRP	Protéine C Réactive
hsCRP	Protéine C Réactive Ultra-Sensible
EC	Ester de Cholestérol
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
GSK	Glaxo Smith Kline
HDL	Lipoprotéine Haute Densité
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice Médiane
IDL	Lipoprotéine de Densité Intermédiaire
IM	Infarctus du Myocarde
KO	Knock-Out
LDL	Lipoprotéine Basse Densité
LDLox	Lipoprotéine Basse Densité oxydée
LDLr	Récepteur aux LDL
Lp-PLA ₂	Phospholipase A ₂ associée aux Lipoprotéines
LysoPAF	Facteur d'agrégation plaquettaire hydrolysé en position <i>sn2</i>
LysoPC	Phosphatidylcholine hydrolysée en position <i>sn2</i>

MEC	Matrice ExtraCellulaire
MPO	Myéloperoxydase
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
oxNEFA	Acides gras non estérifiés oxydés
oxPC	Phosphatidylcholine oxydée
PAF	Platelet Activating Factor
PAF-AH	Platelet Activating Factor AcetylHydrolase
PC	Phosphatidylcholine
sPLA ₂	Phospholipase A ₂ sécrétée
TG	Triglycéride
TNF	Tumor Necrosis Factor
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité

Chimie-Radiochimie

ACN	Acétonitrile
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)diméthylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCE	1,2-Dichloroéthane
DCM	Dichlorométhane
DiPEA	<i>N, N</i> -Diisopropyléthylamine
DMF	<i>N, N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
FCH	Fluorométhylcholine
FDG	Fluorodéoxyglucose
FET	Fluoroéthyltyrosine

FLT	Fluorothymidine
Hex	Hexane
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMDS	Hexaméthylidisilazane
L-DOPA	L- 3,4-Dihydroxyphénylalanine
m-CPBA	Acide métachloroperbenzoïque
NMM	N-Methylmorpholine
NMP	<i>N</i> -Méthyl-2-pyrrolidone
QMA	Quaternary Methyl Ammonium
RCY	Rendement radiochimique
Rf	Rapport Frontal
SEAr	Substitution électrophile Aromatique
TA	Température ambiante
TBAB	Tetra- <i>n</i> -butylammonium bromide
TFA	Acide trifluoroacétique
TFMISO	1-(2-Nitro-1H-imidazol-1-yl)-3-(2,2,2-trifluoroethoxy)propan-2-ol
THF	Tétrahydrofurane
TIS	Triisopropylsilane
TMS	Triméthylsilyle

Imagerie

CT	Computed Tomography
IR	InfraRouge
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IRMiv	Imagerie par Résonance Magnétique Intravasculaire
IVUS	Échographie IntraVasculaire
MDCT	Tomodensitométrie Multi-Détecteurs

OCT	Tomographie par Cohérence Optique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RX	Rayons X
TDMRX	Tomodensitométrie aux Rayons X
TEP	Tomographie par Émission de Positons
TEMP	Tomographie par Émission MonoPhotonique

Unités

Bq	Becquerel
g	Gramme
GBq	Gigabecquerel
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton
keV	Kilo-électronvolt
L	Litre
m	Mètre
nm	Nanomètre
MBq	Mégabecquerel
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mm	Millimètre
μg	Microgramme
μm	Micromètre
μmol	Micromole
mol	Mole
nM	Nanomolaire

Liste des Figures

Figure 1. Structure d'une artère saine.....	31
Figure 2. Progression des facteurs de risque à l'athérosclérose : stress oxydant et dysfonction endothéliale	33
Figure 3. Représentation schématique des lipoprotéines plasmatiques humaines.....	36
Figure 4. Formation des cellules spumeuses issues de macrophages et de CML.....	40
Figure 5. Angiogenèse lors de l'athérosclérose.....	41
Figure 6. Présentation d'une plaque athéromateuse	43
Figure 7. Hémorragie intraplaque.....	44
Figure 8. Différences entre plaque stable et instable.....	45
Figure 9. Sections histologiques de calcifications vasculaires humaines.....	46
Figure 10. Séquence d'évolution des lésions athérosclérotiques du type I au type IV ainsi que les différentes voies possibles de progression au-delà du type IV.....	47
Figure 11. La CRP ultrasensible (hsCRP) et le risque cardiovasculaire associé aux niveaux de LDL-cholestérol	51
Figure 12. Cycles d'halogénéation et peroxydase de la MPO.....	52
Figure 13. Association de la Lp-PLA ₂ et des phospholipides oxydés à la Lp(a) dans le plasma de patients sains et atteints de maladie coronarienne.....	53
Figure 14. Prédiction du risque cardiovasculaire comparant les taux d'ApoB-100 et les facteurs de risque usuels	54
Figure 15. Prédiction du risque cardiovasculaire en comparant les taux ApoA1 et les facteurs de risque usuels	55
Figure 16. Exemple d'images obtenues par angiographie.....	56
Figure 17. Exemple d'images obtenues par angioscopie	57
Figure 18. Plaque d'athérome par IVUS	58
Figure 19. Élastographie d'une plaque coronarienne montrant 5 acquisitions pendant les cycles cardiaques.....	58
Figure 20. Imagerie intracoronarienne <i>in vivo</i> d'une plaque possédant un cœur riche en lipides par OCT (A) et IVUS (B).....	59
Figure 21. IRM d'une plaque carotidienne humaine.....	60
Figure 22. Images MDCT d'artères coronaires divisées en coupes de 3 mm	63
Figure 23. Désintégration β^+ (positron).....	66
Figure 24. Principe d'une TEP	66
Figure 25. Principe d'une TEMP.....	67
Figure 26. Exemple du ^{99m} Tc (demi-vie : 6h) se transformant en ⁹⁹ Tc après émission gamma.	67
Figure 27. Plaque d'athérome et cibles moléculaires accompagnées des radiotraceurs associés.....	70
Figure 28. Imagerie d'un patient adulte avec accumulation (flèche blanche) au niveau d'une plaque carotidienne	71
Figure 29. Imagerie d'une artère coronaire de patient.....	73
Figure 30. Structure de la Lp-PLA ₂ avec en vert les feuilletts β , en violet les hélices et en gris les boucles.....	76
Figure 31. Rôle proathérogène de la Lp-PLA ₂ dans l'athérosclérose par formation de lyso-PC et ox-NEFA	78
Figure 32. Biomarqueurs d'intérêts produit lors de l'athérogenèse	79

Figure 33. Clichés immunohistologiques montrant la présence de Lp-PLA ₂ au sein de plaques coronariennes humaines	80
Figure 34. STABILITY (STabilization of Atherosclerotic plaque By Initiation of darapLadIb TherapY)	86
Figure 35. Courbes de Kaplan-Meier concernant les critères de jugement de type IM et AVC	87
Figure 36. Étude SOLID-TIMI 52.....	88
Figure 37. Courbes d'incidence cumulée de l'étude SOLID-TIMI 52.....	88
Figure 38. Spectres RMN ¹ H (a) et ¹³ C (b) des esters obtenus.....	97
Figure 39. Corrélations HMBC attendues pour l'attribution des signaux des composés 5 , 6 et 7	98
Figure 40. Spectre HMBC du composé 5 dans le DMSO- <i>d</i> ₆	99
Figure 41. Spectre HMBC du composé 6 dans le DMSO- <i>d</i> ₆	99
Figure 42. Spectre HMBC du composé 7 dans le DMSO- <i>d</i> ₆	100
Figure 43. Test d'activité Lp-PLA ₂ A : <i>N</i> 1-Ester (5), B : <i>O</i> -Ester (6), C : <i>N</i> 3-Ester (7), D : Darapladib (16), E : <i>O</i> -Darapladib (30), F : <i>N</i> 3-Darapladib (32)	139
Figure 44. Module GE Tracerlab FX-FN pour la préparation de ¹⁸ F-Darapladib	143
Figure 45. Schéma général de radiomarquage et utilisation des cartouches de séparation (QMA, Alumine, C18).....	144
Figure 46. Profils HLC analytique (UPLC Dionex Ultimate 3000 ; colonne : Gemini C ₁₈ 250 × 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex), elution isocratique : NH ₄ OAc 0.1M (pH 6)/MeCN ; débit : 1 or 1.5 ml/min; température ambiante). A. Profil UV du Darapladib froid ; B : Profil radio ¹⁸ F-Darapladib.....	148
Figure 47. Stabilité du ¹⁸ F-Darapladib marqué dans la solution d'injection	149
Figure 48. Profils HLC analytique (UPLC Dionex Ultimate 3000 ; colonne : Gemini C ₁₈ 250 × 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex), elution isocratique : NH ₄ OAc 0.1M (pH 6)/MeCN ; débit : 1 or 1.5 ml/min; température ambiante). A : Profil UV du composé 26 ; B : Profil radio du composé ¹⁸ F- 5 ; C : Profil UV du composé 35 ; B : Profil radio du composé ¹⁸ F- 30	152
Figure 49. Stabilité du composé ¹⁸ F- 5 dans la solution d'injection EtOH/sérum physiologique.....	153
Figure 50. Stabilité du composé ¹⁸ F- 30 dans la solution d'injection EtOH/sérum physiologique.....	154
Figure 51. Imagerie PET de tumeurs B16 de mélanome murin par injection de ¹⁸ F-Darapladib et ¹⁸ F-FDG.....	159
Figure 52. Profils lipidiques de cholestérol chez divers modèles en comparaison à l'homme	161
Figure 53. Imagerie corps entier du ¹⁸ F-FDG et ¹⁸ F-Darapladib sur un modèle murin d'athérome...	162
Figure 54. Imagerie des aortes et cœurs des souris C57Bl6 et KO ApoE après injection de ¹⁸ F-Darapladib et ¹⁸ F-FDG	163
Figure 55. Comparaison entre ¹⁸ F-Darapladib et ¹⁸ F-FDG dans des carotides humaines	165
Figure 56. Analyse immunohistochimique de sections de tumeurs de mélanome murin B16.F10 par l'antigène F4/80.....	171
Figure 57. Dépendance liée à l'âge du diamètre de la paroi vasculaire et de la lumière du vaisseau chez des souris ApoE -/- par microscopie par résonance magnétique	172
Figure 58. Imagerie d'un patient adulte par ¹⁸ F-FDG avec accumulation (flèche blanche) au niveau d'une plaque carotidienne avec zoom sur la zone d'intérêt (Orbay, Hong <i>et al.</i> 2013).	173
Figure 59. Imagerie TEP d'un patient présentant sténose carotidienne sévère par ¹⁸ F-FDG corrélée avec la présence en histologie de macrophage (CD68).....	174
Figure 60. GE Tracerlab FX-FN module for the preparation of ¹⁸ F-Darapladib and analogs.....	226
Figure 61. HPLC chromatogram of Darapladib compared with ¹⁸ F-Darapladib.....	228
Figure 62. Phosphate buffer saline stability of ¹⁸ F-Darapladib at 0, 30 min and 1h 30 min	229
Figure 63. ¹⁸ F-Darapladib and ¹⁸ F-FDG injection in tumor induced mouse model (mouse B16 melanoma).....	231
Figure 64. ¹⁸ F-Darapladib and ¹⁸ F-FDG injection in C57BL/6 mice	232

Figure 65. ^{18}F -Darapladib and ^{18}F -FDG injection in KO ApoE mice	232
Figure 66. ^{18}F -Darapladib biodistribution in KO ApoE and C57BL/6 mice.....	233
Figure 67. ^{18}F -Darapladib and ^{18}F -FDG in KO ApoE mice aortas and heart.....	233
Figure 68. <i>Ex vivo</i> accumulation of ^{18}F -Darapladib compared to ^{18}F -FDG in human carotid endarterectomy samples	234

Liste des Tableaux

Tableau 1. Caractéristiques structurales des lipoprotéines plasmatiques humaines.....	35
Tableau 2. Facteurs de risque possibles de complications cardiovasculaires	50
Tableau 3. Méthodes d'imagerie invasives de la plaque vulnérable	62
Tableau 4 Avantages et inconvénients des méthodes d'imagerie structurale et fonctionnelle.....	64
Tableau 5. Radiotraceurs récemment décrits dans l'imagerie moléculaire TEP de la plaque d'athérome.....	69
Tableau 6. Superfamille des phospholipases A ₂	74
Tableau 7. Formation du composé 1	93
Tableau 8. Alkylation du composé 4 par la méthode de Hickey <i>et al.</i>	95
Tableau 9. Méthodologie appliquée concernant l'alkylation dans le DMF.	101
Tableau 10. Méthodologie concernant l'alkylation sélective de 4	104
Tableau 11. Optimisation des conditions de couplage de Suzuki-Miyaura.	107
Tableau 12. Réactions nucléaires permettant la production de ¹⁸ F	116
Tableau 13. Activités des radiomarquages du Darapladib	146
Tableau 14. Activités des radiomarquages des composés 26 et 35	151

Liste des Schémas

Schéma 1. Formation de peroxyinitrite.....	34
Schéma 2. Principales formes oxydées de la phosphatidylcholine (PC)	38
Schéma 3. Synthèse du ^{18}F -FDG.	71
Schéma 4. Dégradation du PAF en Lyso-PAF et de la ox-PC en Lyso-PC par la PAF-AH	76
Schéma 5. Inhibiteur de lipases à sérine Tetrahydrolipstatin ou Orlistat.	84
Schéma 6. Structure de la forme racémique de SB-216477.	84
Schéma 7. Structure des diastéréoisomères SB-222657 et SB-223777.....	85
Schéma 8. Structure de deux inhibiteurs au noyau pyrimidone à forte inhibition PAF-AH	85
Schéma 9. Structure du Darapladib ou SB-480848 ($\text{IC}_{50} < 0.1 \text{ nM}$).....	85
Schéma 10. Groupes constitutifs du Darapladib.....	90
Schéma 11. Différentes approches concernant la synthèse du noyau pyrimidone du Darapladib incluant différentes approches concernant la <i>NI</i> -alkylation.....	91
Schéma 12. Fragments A et B dans la stratégie divergente choisie pour la synthèse totale du Darapladib.	91
Schéma 13. Synthèse du fragment A via la méthode de Cardwell <i>et al</i>	92
Schéma 14. Synthèse du fragment A via la méthode de Hickey <i>et al</i>	94
Schéma 15. Formes mésomères de 4 entraînant 3 sites possibles d'alkylation.	96
Schéma 16. Produits obtenus lors de l'alkylation de 4 selon Hickey <i>et al</i>	97
Schéma 17. Réactivité des groupes partants.....	101
Schéma 18. Méthode sélective de Mulholland <i>et al</i> . afin d'accéder au composé 2	102
Schéma 19. Mécanisme proposé et supposé de formation de l'ester intermédiaire 11	103
Schéma 20. Voie sélective de synthèse permettant d'accéder au fragment A.	105
Schéma 21. Synthèse du composé 12	105
Schéma 22. Mécanisme supposé du couplage de Suzuki-Miyaura permettant l'obtention de 12	106
Schéma 23. Synthèse du composé 13	107
Schéma 24. Voie alternative à l'obtention de 13	108
Schéma 25. Mécanisme supposé de formation d'un amide avec le COMU.....	109
Schéma 26. Obtention du Darapladib 16 après couplage peptidique.	109
Schéma 27. Synthèse totale du Darapladib.....	111
Schéma 28. Radiofluoration par échange isotopique avec source nucléophile de ^{18}F	117
Schéma 29. Principaux radiotraceurs issus de radiofluoration aliphatique utilisés en médecine nucléaire	118
Schéma 30. Exemples de radiofluoration électrophile vinylique	119
Schéma 31. Synthèse de la L-DOPA par SEAr	120
Schéma 32. Structure du Selectfluor.	121
Schéma 33. Radiosynthèse de fluoro arènes par réactions de Balz-Schiemann (a) et Wallach (b)....	121
Schéma 34. Principaux groupes secondaires utilisés dans la radiofluoration aromatique.....	122
Schéma 35. Formation des sels d'aryliodonium et radiofluoration	124
Schéma 36. Exemple de formation d'ylures d'iodoniums et radiofluoration.....	123
Schéma 37. Mécanisme supposé et proposé de la radiofluoration catalysée par le titane	118
Schéma 38. Exemple de complexe de palladium permettant l'incorporation de fluor.	124
Schéma 39. Exemple de radiofluoration en présence de complexe de nickel.	125
Schéma 40. Marquage de boronates aromatiques induit par un complexe de cuivre.	125
Schéma 41. Fluoration d'aryl stannanes et d'aryl trifluoroboranes.....	126

Schéma 42. Radiofluoration d'esters de boronate induite par le cuivre	126
Schéma 43. Voies de synthèse envisagées par Rotstein <i>et al.</i>	127
Schéma 44. Synthèse de l'intermédiaire 18	128
Schéma 45. Tentative de synthèse de l'ylure précurseur de marquage du Darapladib.....	129
Schéma 46. Tentatives de couplage des composés 17 et 19	129
Schéma 47. Tentatives de formation de l'ylure sur deux étapes.....	130
Schéma 48. Rétrosynthèse possible de sels d'aryliodoniums.....	131
Schéma 49. Tentatives de stannylation des composés 17 et 18	132
Schéma 50. Synthèse de l'intermédiaire 25	133
Schéma 51. Alkylation sélective à partir du composé 25	133
Schéma 52. Synthèse du fragment A (composé 27).....	134
Schéma 53. Hydrolyse acide d'un ester tert-butylique	135
Schéma 54. Synthèse du précurseur 28	135
Schéma 55. Synthèse totale du précurseur de marquage du Darapladib 28	136
Schéma 56. Synthèse des régioisomères en position <i>N3</i> (7 et 32) et <i>O</i> (6 et 30) du Darapladib.....	138
Schéma 57. Synthèse des précurseurs 33 et 35 régioisomères <i>O</i> du Darapladib.....	141
Schéma 58. Radiofluoration induite par le cuivre	142
Schéma 59. Mécanisme supposé de fluoration induite par le cuivre.....	144
Schéma 60. Structures des analogues 5 et 30	150
Schéma 61. Structures des précurseurs de marquage 26 et 35	150
Schéma 62. Radiomarquage du composé 33	155
Schéma 63. Darapladib.....	168
Schéma 64. Précurseur de marquage du Darapladib	169
Schéma 65. ¹⁸ F-Darapladib.....	170
Schéma 66. Radiolabelling of ¹⁸ F-Darapladib via alcohol enhanced copper mediated radiofluorination	227

Introduction générale

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de morbidité et mortalité dans le monde (WHO 2012). L'athérosclérose, qui conduit à l'obstruction des artères, est à l'origine de 50% des décès dans les sociétés industrialisées. La rupture d'une plaque d'athérosclérose dite vulnérable entraîne de nombreuses complications qui, en fonction du territoire artériel considéré, vont de l'AIT (Accident Ischémique Transitoire) et l'AVC (Accident Vasculaire Cérébral) pour les artères irriguant le cerveau, à l'infarctus du myocarde (coronaires) ou l'ischémie des membres inférieurs (fémorales).

Pour pallier ce problème de santé publique majeur, l'enjeu clinique et en particulier diagnostique repose notamment sur la prévention de ces complications cardiovasculaires dans une population à haut risque comme à l'île de la Réunion, qui se caractérise par une incidence élevée d'atteinte vasculaire et de mortalité associée (première cause de mortalité, 28% de l'ensemble des décès sur l'île) (ORS 2015). Or, à l'heure actuelle, il n'existe aucune technique d'imagerie permettant la détection précoce et sans ambiguïté des plaques d'athérosclérose vulnérables. La médecine nucléaire possède une très grande sensibilité et pourrait offrir des outils diagnostics performants permettant d'évaluer la formation de ces plaques. Parmi tous les biomarqueurs tissulaires et circulants produits lors de l'athérogenèse, nous avons choisi la Lp-PLA₂ (phospholipase A₂ associée aux lipoprotéines), enzyme associée aux processus inflammatoires (produite par les monocytes et macrophages), comme cible de l'athérosclérose en imagerie TEP (Tomographie par Émission de Positons). En effet, les cellules productrices de Lp-PLA₂ s'accumulent dans les plaques d'athérome, tout comme les lipoprotéines qui transportent cette enzyme (LDL et HDL ; Low Density Lipoproteins et High Density Lipoproteins), faisant de cette lipase à sérine une cible possible pour l'imagerie de l'athérosclérose précoce.

La première partie de cette thèse porte sur le contexte du projet, notamment l'athérosclérose, ainsi que la Lp-PLA₂ et son utilité en tant que biomarqueur. **La seconde partie de ce projet** traite de la synthèse d'un inhibiteur puissant de la Lp-PLA₂ mis au point en 2003 par le groupe pharmaceutique GSK (Glaxo Smith Kline), que nous utiliserons comme ligand de cette enzyme : le Darapladib. **La troisième partie de ces travaux** expose la synthèse de précurseurs de marquage permettant de former, après radiomarquage, le ¹⁸F-Darapladib. Enfin, **la quatrième et dernière partie de ce manuscrit** sera consacrée à

l'utilisation de ce nouveau radiotracer en imagerie TEP sur modèle murin d'athérome *in vivo* ainsi que sur des pièces d'endartériectomies athérosclérotiques carotidiennes humaines *ex vivo*.

Chapitre I : Athérosclérose, diagnostic et Lp-PLA₂

1) Introduction

Les maladies cardiovasculaires tuent chaque année 17,5 millions de personnes, soit 31% des décès dans le monde et représentent ainsi la première cause de mortalité (WHO 2012). Parmi elles, l'athérosclérose est une maladie progressive caractérisée par une accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans la paroi des artères.

Plusieurs études épidémiologiques ont révélé divers facteurs de risque d'ordre environnemental (Heller, Hartley *et al.* 1983) ou génétique (International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association, Ehret *et al.* 2011) associés à l'athérosclérose. Cependant, les progrès concernant la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires ont été freinés par la complexité étiologique de la maladie (Marian 2012). Néanmoins, les nombreux modèles animaux développés et notamment ceux obtenus par modifications génétiques ont permis de mieux cerner les interactions moléculaires qui connectent le métabolisme altéré du cholestérol avec tous les autres facteurs de risque liés au développement de la plaque athérosclérotique (Emini Veseli, Perrotta *et al.* 2017). La compréhension de la pathologie est ainsi passée d'une conséquence dégénérative liée à l'âge à une condition associée à des dyslipidémies provoquant une réponse de l'organisme dite "inflammatoire chronique", conduisant à des complications cliniques par rupture de la plaque et thrombose. Cette rupture provoque l'obstruction totale ou partielle de la lumière du vaisseau entraînant des complications de type AVC, AIT ou infarctus myocardique.

L'AVC ou Accident Vasculaire Cérébral ischémique résulte de la formation d'un caillot ou de l'embolisation d'un débris de plaques d'athérosclérose obstruant un vaisseau sanguin (typiquement les carotides) et bloquant l'arrivée de sang jusqu'au cerveau. L'AIT ou Accident Ischémique Transitoire a les mêmes causes et est techniquement un AVC "transitoire". Même si les conséquences d'un AIT sont moins délétères que celles de l'AVC, la survenue d'un tel évènement ne doit pas être négligée.

La méthode de référence permettant d'évaluer le niveau de sténose et la circulation sanguine est l'écho-doppler de l'aorte, des artères périphériques et des artères à destination cérébrale (carotides) dès qu'un patient présente soit des symptômes classiques d'artérite des membres inférieurs, ou bien un accident ischémique transitoire et de façon plus systématique chez les patients de plus de 40 ans présentant au moins 3 facteurs de risque cardiovasculaires

(hypertension, tabagisme, dyslipidémie, excès de poids, diabète, sédentarité, stress, hérédité) (Franceschi 1979).

Les plaques d'athérosclérose vulnérables sont caractérisées par une capsule fibreuse fine enveloppant un cœur nécrotico-lipidique ainsi que par la présence de cellules immunitaires et inflammatoires. Le processus menant au développement de la plaque athérosclérotique vulnérable est caractérisé par un recrutement massif de leucocytes dans la paroi artérielle (Braunersreuther and Mach 2006). Les techniques non invasives et applicables en routine actuellement disponibles sont peu satisfaisantes, notamment pour les artères difficiles d'accès comme les coronaires. Parmi les techniques en cours d'évaluation, celles reposant sur l'utilisation de la médecine nucléaire, par leur grande sensibilité et aux informations moléculaires et fonctionnelles qu'elles fournissent, peuvent représenter des pistes d'avenir pour le diagnostic précoce de ces plaques (Glaudemans, Slart *et al.* 2010).

Le but de mon travail de thèse est d'évaluer l'efficacité d'un possible nouveau radiotraceur de la plaque vulnérable. Pour cela, une cible moléculaire, marqueur de la plaque d'athérome, a été choisie : la Lp-PLA₂ (Dennis, Cao *et al.* 2011). L'inhibiteur utilisé se nomme Darapladib et a été développé par GSK en 2003 ; il présente une IC₅₀ de 0,25 nM (Blackie, Bloomer *et al.* 2003). Étant donnée la forte accumulation de LDL et de monocytes / macrophages au niveau des stries lipidiques et de la plaque d'athérome, la forte affinité du Darapladib pour la Lp-PLA₂ pourrait permettre d'atteindre la sélectivité recherchée dans le diagnostic précoce de l'athérosclérose.

2) Athérogenèse et complications associées à l'athérosclérose

2.1 Introduction

L'athérosclérose, se développe principalement dans les artères de moyen et gros calibre (Ross 1999). La structure d'une artère saine est présentée en **Figure 1**.

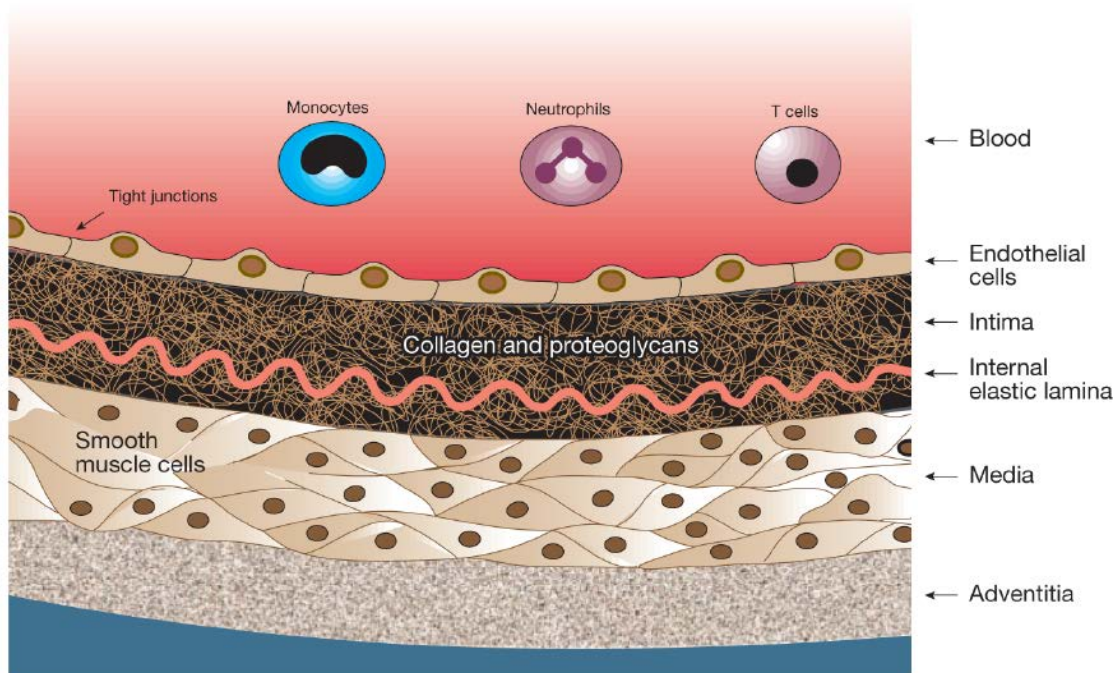


Figure 1. Structure d'une artère saine. Elle est constituée par 3 tuniques morphologiquement bien distinctes. L'intima, la couche la plus interne, est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales du côté de la lumière du vaisseau reposant sur de la matrice extracellulaire, principalement des fibres de collagènes et élastiques. Les lamelles élastiques interne et externe définissent morphologiquement la média, principalement constituée par des cellules musculaires lisses (CML) qui ont pour rôle majeur la contraction du vaisseau. La richesse en lamelles élastiques et CML des artères définit leur nature, élastique et musculaire. Enfin, l'adventice est la tunique externe de la paroi vasculaire ; elle est constituée de tissu conjonctif, des fibroblastes, de terminaisons nerveuses, de cellules immunitaires, d'adipocytes et de *vasa-vasorum*, petits vaisseaux qui alimentent les parties les plus externes de l'artère (Lusis 2000).

Cette pathologie se développe sur des sites spécifiques du circuit vasculaire et conduit à la formation de plaques d'athérosclérose. Contrairement aux idées reçues, cette formation

débutent dès les premières années de la vie de chaque individu pendant lesquelles des cellules inflammatoires s'infiltrent dans l'espace sous-endothélial (Lusis 2000). Les facteurs de risque prédisposant chaque individu au développement de lésions d'athérosclérose ont été déterminés à partir d'études épidémiologiques menées sur des populations dont les caractéristiques sont connues. Ces études permettent de corréler les survenues d'accidents cardiovasculaires à certaines habitudes ou caractéristiques de ces populations. L'hypertension, le tabagisme, une dyslipidémie, l'excès de poids, le diabète, la sédentarité, le stress et l'hérédité sont ainsi les principaux facteurs de risque identifiés à partir de ces différentes études épidémiologiques.

2.2 Dysfonction endothéliale et stress oxydant

L'endothélium vasculaire est un tapis semipermeable constitué d'un unique type cellulaire. Cette couche très sélective permet la démarcation entre le flux sanguin et la paroi vasculaire dans l'intégralité du système circulatoire. Constitué de cellules endothéliales longues et plates (20-40 μm de long, 10-15 μm de large et 0,1-0,5 μm d'épaisseur en moyenne) orientées le long de l'axe du vaisseau, l'endothélium se caractérise par des jonctions serrées aux bordures latérales de chaque cellule qui restreignent le déplacement des macromolécules (Cahill and Redmond 2016).

Sa principale fonction est le transport de molécules au sein de la paroi vasculaire. L'endothélium permet également de réguler la réponse inflammatoire ainsi que la migration et la croissance des CML. Par synthèse et relargage de substances vasoactives, il a pour tâche délicate de préserver, en fonction des besoins, l'équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation (Kasprzak, Klosinska *et al.* 2006). Les dommages subis par l'endothélium dérèglent cet équilibre homéostatique et initient des processus favorisant l'athérosclérose : perméabilité, agrégation plaquettaire et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Ross 1999)

Parmi les substances relarguées par l'endothélium, le composé vasodilatateur majeur est le monoxyde d'azote (NO^*) originellement identifié comme EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor) (Davignon and Ganz 2004). Les autres substances vasodilatatrices incluent la prostacycline et la bradykinine (Drexler 1998). Le NO^* et la prostacycline agissent de concert afin d'inhiber l'agrégation plaquettaire qui est un phénomène pro-athérogène (Luscher and Barton 1997). La production de NO^* et de prostacycline est stimulée par la

bradykinine et favorise d'autant plus la vasodilatation. L'endothélium produit également des substances vasoconstrictrices telles que l'endothéline qui est l'un des plus puissants vasoconstricteurs endogènes connus ainsi que l'angiotensine II. Cette dernière a une double casquette de vasoconstricteur mais également de pro-oxydant (Sowers 2002). Ensemble, l'angiotensine II et l'endothéline favorisent la prolifération de CML et contribuent ainsi à la formation des plaques d'athérome. Les macrophages activés et les CML vasculaires (composants cellulaires des plaques) produisent de grandes quantités d'endothéline (Kinlay, Behrendt *et al.* 2001). Les différents liens entre dysfonction endothéliale et athérosclérose sont présentés sur la **Figure 2**.

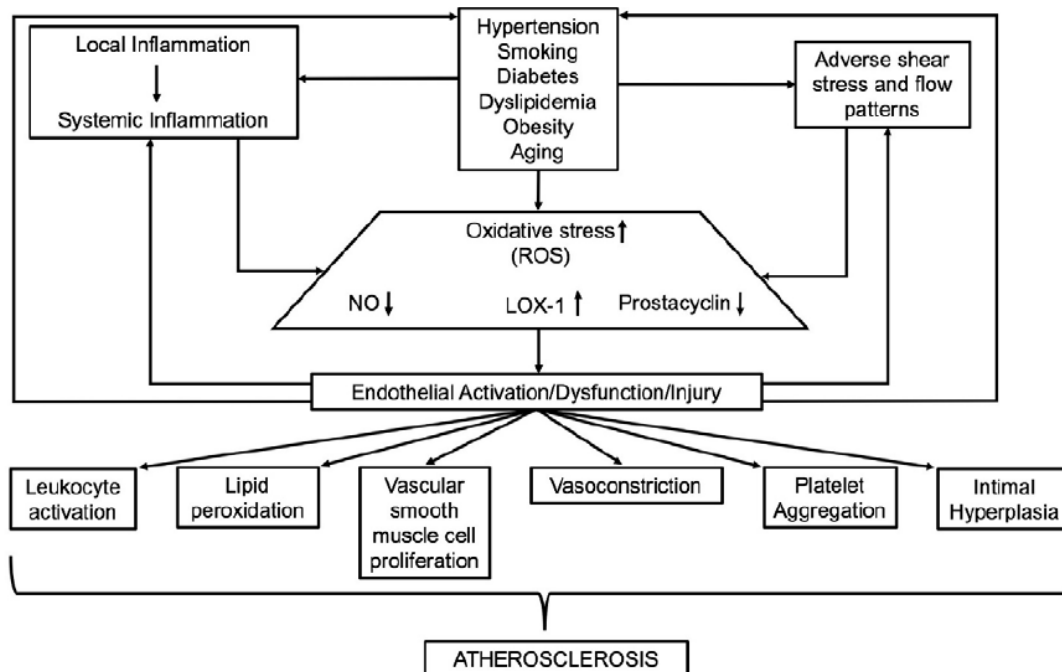


Figure 2. Mécanismes moléculaires associés aux facteurs de risque de l'athérosclérose : stress oxydant et dysfonction endothéliale. L'augmentation du stress oxydant causée par les facteurs de risque cardiovasculaires entraîne une dysfonction endothéliale menant au développement de l'athérosclérose (Jensen and Mehta 2016).

L'élément clé de la dysfonction endothéliale est l'incapacité des artères et artérioles à se dilater efficacement (face à des stimuli) ce qui limite l'apport en nutriments et en hormones aux tissus. Certes, la production augmentée d'endothéline entraîne la vasoconstriction mais c'est plus précisément la diminution en biodisponibilité de NO[•] qui favorise cette dysfonction. Les intermédiaires réactifs de l'oxygène et en particulier l'anion superoxyde (O₂^{•-}) favorisent la diminution de NO[•] disponible. L'anion superoxyde réagit directement avec NO[•] pour former le peroxynitrite. Les facteurs modulant l'expression et l'activité de l'enzyme

responsable de la production de NO^\bullet (eNOS ou NOS III) peuvent favoriser la production de superoxyde plutôt que de NO^\bullet . Les mécanismes de production de NO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ et OONO^- sont présentés dans le **Schéma 1** (Moulian, Truffault *et al.* 2001).

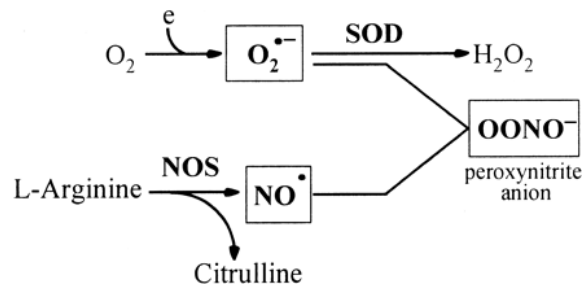


Schéma 1. Formation de peroxynitrite. Le peroxynitrite est produit par réaction de $\text{O}_2^{\bullet-}$ avec NO^\bullet . NO^\bullet est produit par la NO synthase endothéliale (eNOS) qui utilise l'arginine et l'oxygène pour former le NO^\bullet et la citrulline. SOD catalyse la dismutation des radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Bien que complexes, ces différents mécanismes incluant stress oxydant et dysfonction de l'endothélium sont les premières étapes de la formation des plaques d'athérome.

2.3 LDL et LDL oxydées (LDLox)

Les membranes cellulaires sont à l'interface avec le milieu extracellulaire et garantent des réponses à divers stimuli et changements environnementaux. La composition des membranes chez l'homme résulte principalement de l'apport nutritionnel en cholestérol et en lipides. Dans le sang, les transporteurs majoritaires de lipides au sein de l'organisme sont les lipoprotéines (Goldstein and Brown 2001). L'hypercholestérolémie, comme indiqué précédemment, est un des facteurs de risque majeur responsable en grande partie de la formation des plaques d'athérome (Glass and Witztum 2001).

Les lipoprotéines se différencient par leur densité. Ces particules sont présentées dans le **Tableau 1**. La composition lipidique et protéique des lipoprotéines est variable et les protéines les composant sont appelées apolipoprotéines (Apo). Le cœur lipidique hydrophobe des lipoprotéines est constitué d'esters de cholestérol et de triglycérides. L'enveloppe amphiphile aux propriétés hydrophiles et hydrophobes est constituée de phospholipides, de cholestérol non estérifié et d'apolipoprotéines qui garantissent à chaque lipoprotéine ses propriétés fonctionnelles et son devenir métabolique (Goldstein and Brown 2001).

Lipoprotéines	Densité (g/mL)	Taille (nm)	Proportion EC/ TG	Apolipoprotéine
Chylomicron	0,93	75 - 1200	1/19	B48, E, C
VLDL	0,93-1,006	30 - 80	1/3,3	B100, E, C
IDL	1,006-1,019	27 - 35	1/3,5	B100, E
LDL	1,019-1,063	18 - 27	1/0,23	B100
HDL	1,063-1,210	7 - 12	1/0,205	AI, AII, C

Tableau 1. Caractéristiques structurales des lipoprotéines plasmatiques humaines. EC : ester de cholestérol ; TG : triglycérides. Les chylomicrons sont responsables du transport des lipides exogènes de l'intestin grêle vers les tissus adipeux périphériques. Les VLDL, IDL et LDL sont chargées de transporter le cholestérol, libre ou estérifié, dans le sang et à travers le corps pour l'apporter aux cellules. Les HDL sont responsables du transport du cholestérol vers le foie (efflux de cholestérol) où il pourra être éliminé (Dimastromatteo 2010).

Au sein d'un organisme humain, la majorité du cholestérol plasmatique est transporté par les LDL qui sont principalement captées par les cellules des tissus périphériques et par le foie. Les LDL sont des particules sphériques avec un diamètre moyen de 23 nm. Le cœur hydrophobe d'une particule de LDL moyenne contient environ 1500 molécules d'esters de cholestérol encerclés par un manteau polaire composé principalement de phospholipides et d'une protéine de 513 KDa : l'apolipoprotéine B-100 (ApoB100) (Vogelstein 2001). Un autre système de régulation du cholestérol est fourni par l'efflux réalisé par les HDL (High-Density Lipoproteins). Ces dernières ont en charge le retour de l'excès de cholestérol cellulaire vers le foie afin d'être éliminé par voie intestinale. Elles sont principalement composées de 80 à 100 protéines par particules (organisées autour d'une à trois apolipoprotéines A1 / ApoA1) et mesurent en moyenne entre 8 et 10 nm (Kontush, Chantepie *et al.* 2003). Les HDL contiennent également de nombreuses autres protéines à savoir des enzymes et parfois des lipides apolaires. De plus, plusieurs sous-classes de ces lipoprotéines ont été décrites leur conférant une structure et des propriétés biologiques hétérogènes (Eckardstein 2014) (**Figure 3**).

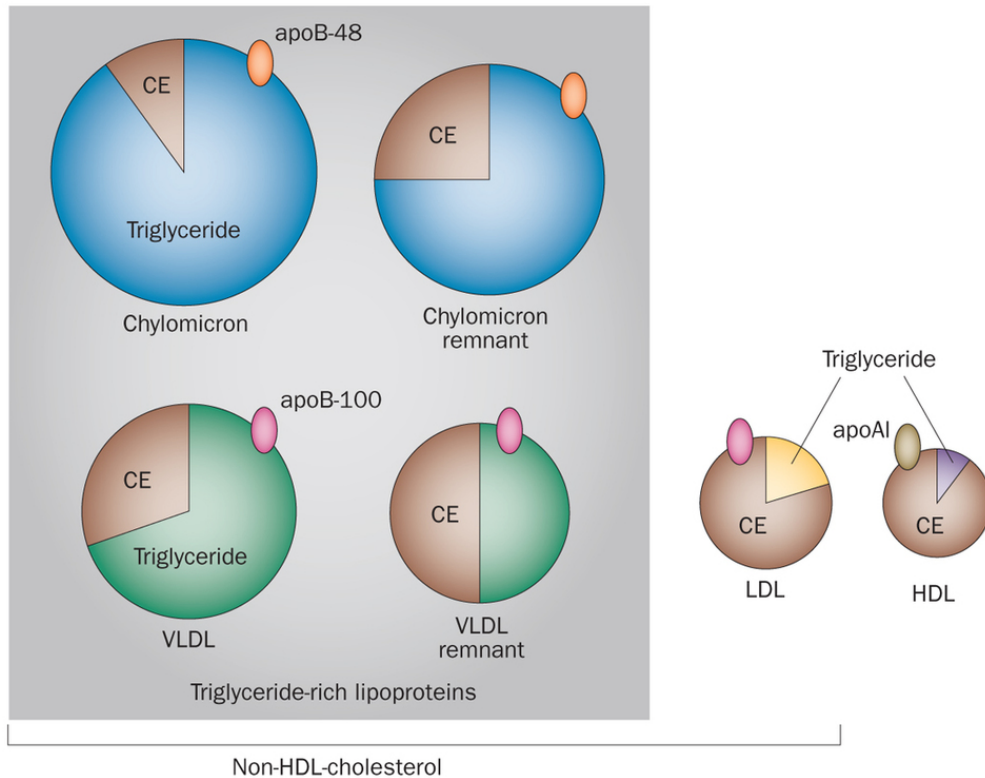


Figure 3. Représentation schématique des lipoprotéines plasmatiques humaines. Les reliquats de chylomicrons et de VLDL (remnants) sont issus de l'hydrolyse des VLDL et chylomicrons par les lipases hépatiques (Watts, Ooi *et al.* 2013).

Les HDL possèdent de nombreux effets bénéfiques qui pourraient protéger contre le développement de l'athérosclérose et même participer à la régression des lésions. Ce rôle athéroprotecteur inclut différents processus à savoir préserver la fonction endothéliale, limiter les modifications des LDL et accélérer l'efflux de cholestérol. Elles possèdent également des propriétés anti-inflammatoires et anti-thrombotiques (Annema, von Eckardstein *et al.* 2015) (Tran-Dinh, Diallo *et al.* 2013). La compréhension des mécanismes de régulation du cholestérol a permis le développement de modèles animaux mimant partiellement la formation de plaques d'athérome (ApoE KO ou LDLr KO).

Dans le développement de l'athérosclérose, un évènement principal est l'accumulation de LDL dans la matrice sous-endothéliale. Cette accumulation est d'autant plus grande que les niveaux circulants de LDL sont élevés. Le transport et la rétention de LDL sont augmentés dans des sites préférentiels de formation des lésions, notamment au niveau de bifurcations où le flux sanguin est perturbé. Ce phénomène marque le début de la formation de stries lipidiques, caractéristiques de l'initiation de la plaque d'athérome (Linton, Yancey *et al.*

2000). On peut observer une très grande variation de la pénétration de LDL dans la paroi artérielle saine entre un individu normocholestérolémique et un individu hypercholestérolémique (Steinberg, Parthasarathy *et al.* 1989).

Les LDL circulantes passent du plasma vers l'espace sous-endothélial et se retrouvent dans l'intima. En conditions normales physiologiques, l'endothélium est capable de réguler le transfert de lipides dans la paroi puis vers les tissus périphériques. Cependant, la composition de la matrice extracellulaire (MEC) d'une artère saine est clairement différente d'une artère pathologique. Ainsi, l'affinité supérieure de la MEC de la plaque d'athérome pour les LDL entraîne leur rétention au sein de la paroi artérielle (Boren, Gustafsson *et al.* 2000). C'est cette rétention prolongée qui va en outre entraîner leur modification, en particulier par oxydation.

Les lipides et l'ApoB100 sont modifiés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) au cours de l'oxydation des LDL. Les ERO de l'endothélium vasculaire sont produits par la Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) oxydase, la MPO (myéloperoxydase), les lipoxigénases et la chaîne respiratoire mitochondriale dysfonctionnelle (Nowak, Deng *et al.* 2017). Chez l'homme, une surexpression de la NADPH oxydase est corrélée avec une surproduction de l'anion superoxyde et une augmentation de l'athérosclérose (Sorescu, Weiss *et al.* 2002). L'activité oxydante des ERO peut être contrecarrée par des enzymes anti-oxydantes à savoir la superoxyde dismutase, la catalase ou encore la glutathion peroxydase et réductase (Galkina and Ley 2009). Cependant, la surproduction d'ERO peut dépasser la capacité de l'organisme à lutter contre ce stress oxydant qui entraînera inéluctablement des modifications des lipides, des protéines et de l'ADN.

Les LDL oxydées par ces ERO (LDLox) jouent un rôle primordial dans la formation de cellules spumeuses (voir chapitre 2.4), l'altération de la voie de signalisation du NO[•] et l'expression de molécules d'adhésion qui accélèrent le recrutement de leucocytes sur le site de la lésion (Matsuura, Kobayashi *et al.* 2006). Les LDLox possèdent différentes classes de lipides oxydés. La phosphatidylcholine (PC) étant le phospholipide majoritaire des cellules de mammifères (40-50%) et des lipoprotéines, la majorité des LDLox contiennent une entité choline. Les modifications oxydantes de la PC introduisent un groupe carboxylate ou un peroxyde mais peuvent également tronquer la chaîne *sn2* du phospholipide (Fruhirth, Loidl *et al.* 2007). Quand des molécules contenant de l'acide linoléique en position *sn2* sont oxydées, les produits formés contiennent soit un aldéhyde soit un acide carboxylique à la place du carbone 9 (Itabe, Takeshima *et al.* 1994). Par un mécanisme similaire, la

peroxydation de la PC contenant l'acide arachidonique produit la PC oxydée avec en position 5 un aldéhyde ou un acide carboxylique. Ces molécules à courte chaîne sont parfois appelées facteurs d'activation plaquettaire dérivés de la PC (PAF pour Platelet Activating Factor) car leur structure rappelle celle du PAF lipidique (Edwards and Constantinescu 2009). Ces molécules oxydées sont d'ailleurs capables de former des imines avec les protéines et réagissent entre elles pour former des produits de condensation aldolique (Friedman, Horkko *et al.* 2002). Tous ces composés issus de la PC sont résumés en **Schéma 2**.

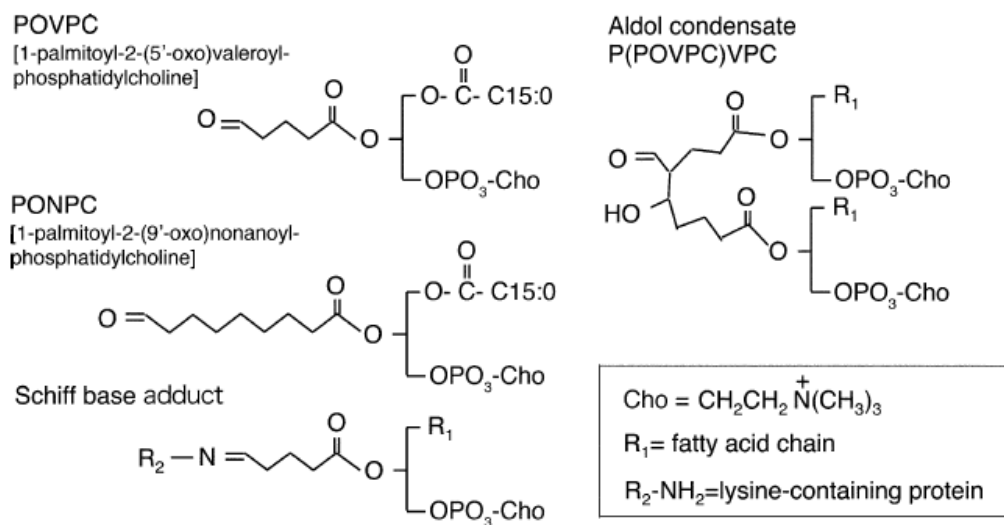


Schéma 2. Principales formes oxydées de la phosphatidylcholine (PC). Les composés portant des fonctions aldéhydes (POVPC, PONPC) sont capables de former des imines (ou bases de Schiff) qui réagissent avec des protéines formant des aldols (P(POVPC)VPC) (Matsuura, Kobayashi *et al.* 2006).

Au sein des lésions, de nombreux antigènes sont présents et sont responsables de l'activation et de la réponse du système immunitaire. Les lipoprotéines modifiées par oxydation mais également les produits secondaires formés portent des néo-épitopes qui mènent à cette réponse immunitaire entraînant l'arrivée importante de lymphocytes et de monocytes/macrophages dans l'espace sous-endothélial (Palinski, Koschinsky *et al.* 1995) (Wick, Perschinka *et al.*).

Les phospholipases jouent un rôle crucial dans le métabolisme de ces phospholipides oxydés. Le PAF dérivé de la PC peut être le substrat de phospholipases A_2 telles que la PAF-AH ou Lp-PLA₂ (Platelet-Activating Factor AcetylHydrolase ou Phospholipase A_2 associée

aux Lipoprotéines). Cette enzyme très étudiée dans la littérature ainsi que son plus puissant inhibiteur (Darapladib) seront des éléments centraux de ces travaux de thèse.

2.4 LDLox et formation de cellules spumeuses

La découverte de la capacité des cellules des parois vasculaires à produire des cytokines a permis de mieux comprendre le développement de l'athérosclérose. Les cytokines sont des petites protéines indispensables dans la signalisation cellulaire et affectant le comportement d'autres cellules. On parle alors d'interférons, d'adipokines, d'interleukines ou encore de TNF (Tumor Necrosis Factor) (Cannon 2000). Elles permettent entre autre une signalisation entre les leucocytes (globules blancs) d'où leur nom d'interleukines. Les LDLox et leurs produits dérivés favorisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

Les leucocytes jouent un rôle clef dans le développement des lésions athérosclérotiques et leur recrutement au niveau de la paroi vasculaire est une étape importante dans la formation de la plaque (Libby 2012). Les premiers leucocytes circulants à pénétrer dans la paroi vasculaire sont les monocytes, qualifiés de macrophages lorsqu'ils se trouvent au sein de tissus. L'activation de la production de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales par des cytokines pro-inflammatoires engendre le recrutement leucocytaire (Rao, Yang *et al.* 2007). Après avoir atteint l'intima, les monocytes/macrophages prennent en charge les lipoprotéines modifiées (LDLox). La captation des LDL via leur récepteur apoB100 est régulée, grâce à un rétro-contrôle négatif limitant la présence de ce récepteur à la surface des cellules lorsque la quantité de cholestérol est suffisante. En revanche, l'internalisation des LDL modifiées par les phagocytes (ou macrophages) se fait de manière non régulée par des récepteurs dits "scavengers" (éboueurs, principalement CD36 et SR-A), menant à une accumulation importante de lipides à l'intérieur des cellules (Podrez, Febbraio *et al.* 2000). Ces macrophages riches en lipides sont appelés cellules spumeuses et forment le cœur de ce que l'on appelle les stries lipidiques au sein des lésions athérosclérotiques (Stary, Chandler *et al.* 1994).

Cependant, les macrophages ne sont pas les seules cellules capables de prendre en charge les LDLox. Une seconde hypothèse émise implique les CML comme cellules capables de devenir des cellules spumeuses par prise en charge des lipoprotéines modifiées (**Figure 4**) (Cookson 1971).

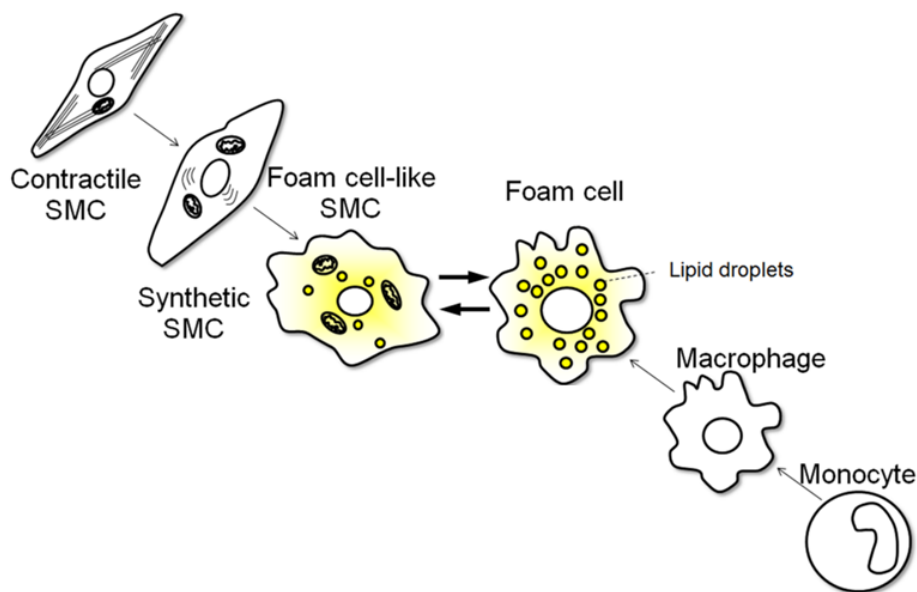


Figure 4. Formation des cellules spumeuses issues de macrophages et de CML (SMC pour Smooth Muscle Cells) (Aikawa 2015).

Ces cellules spumeuses dérivées de CML ne sont pas si évidentes à identifier car elles expriment des marqueurs phagocytaires habituellement caractéristiques des macrophages, comme le CD68 (Allahverdian, Chehroudi *et al.* 2014). Ceci a conduit à une sous-estimation de la capacité des CML à prendre en charge l'excès de lipides et à participer à la formation de stries lipidiques, aux stades précoces de la plaque (Nakashima, Wight *et al.* 2008).

Contrairement aux modèles murins qui possèdent une intima très fine et pauvre en CML dans l'athérosclérose et les stades la précédant, les CML sont des cellules importantes de l'intima humaine sans qu'il y ait eu au préalable développement de plaques athérosclérotiques (Bauriedel, Hutter *et al.* 1999).

2.5 Néovascularisation

La néovascularisation se définit comme la génération de nouveaux vaisseaux sanguins (Risau 1997). L'angiogenèse est la forme prédominante de néovascularisation dans l'athérosclérose amenant à la formation de nouveaux capillaires (Carmeliet 2003). En principe, l'angiogenèse est fondamentale au développement et à la réparation et elle pourrait

notamment servir comme mécanisme de défense dans l'athérosclérose pour compenser l'hypoxie des tissus (manque en dioxygène) et restaurer l'homéostasie de la paroi vasculaire. Elle pourrait alors, en théorie, faciliter la réparation du vaisseau pathologique et son approvisionnement à savoir en nutriments et en oxygène mais également d'aider à l'élimination des déchets systémiques (Moreno, Purushothaman *et al.* 2006).

En dépit de ces effets bénéfiques, de plus en plus d'études suggèrent que la néovascularisation de la plaque soit corrélée à la progression de l'athérosclérose et que la densité en néovaisseaux tende à devenir un facteur de risque indépendant associé à la rupture de la plaque (McCarthy, Loftus *et al.* 1999, Moreno, Purushothaman *et al.* 2004). Ce processus, qui entraîne également un épaissement du cœur lipidique par échange du cholestérol membranaire des érythrocytes avec le cholestérol plasmatique, est présenté en **Figure 5**.

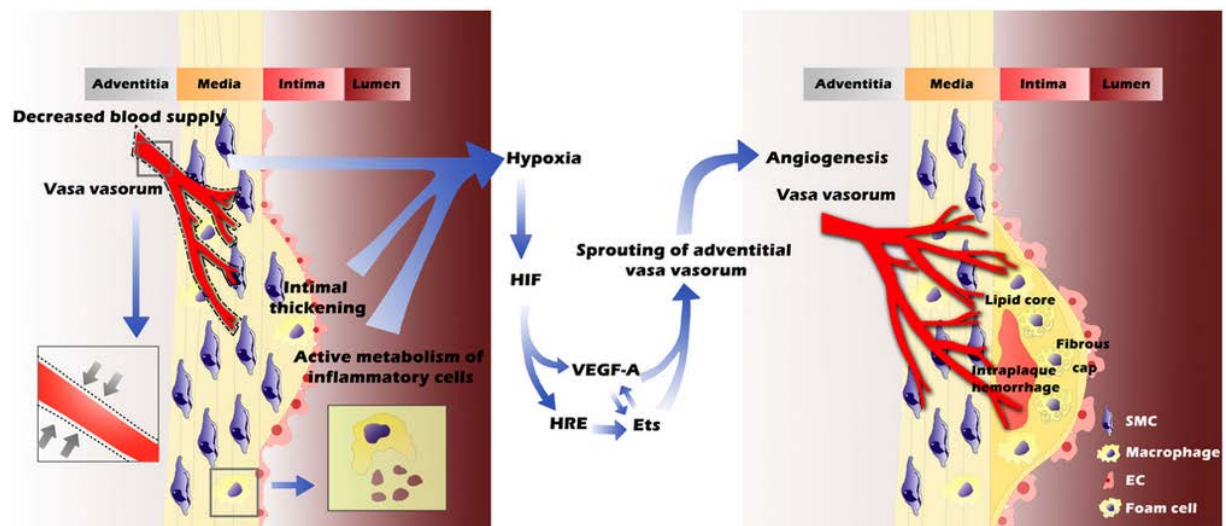


Figure 5. Angiogenèse lors de l'athérosclérose. La perméabilité microvasculaire des néovaisseaux est responsable de l'extravasation des érythrocytes. La lyse de la membrane des globules rouges riche en cholestérol mais également les dépôts de cérvides (mélange de lipides oxydés et de protéines) ainsi que la phagocytose de ces érythrocytes participent à l'accumulation de lipides au sein de la plaque (Xu, Lu *et al.* 2015).

Comme indiqué précédemment, l'angiogenèse permet d'augmenter la vascularisation au niveau des plaques. Ceci va entraîner une augmentation du nombre d'érythrocytes (globules rouges) au sein des lésions en cas de rupture de l'endothélium (Jeney, Balla *et al.* 2014). La membrane érythrocytaire contient du cholestérol et il est maintenant admis que le

cholestérol plasmatique s'échange avec celui de la membrane des érythrocytes *in vivo* (Lange, Cohen *et al.* 1977). Des études utilisant des thérapies hypolypémiantes ont montré une diminution concomitante du niveau de cholestérol membranaire des globules rouges (Lange, Ye *et al.* 2004). Ainsi, lorsque les globules rouges ne sont pas éliminés correctement par des cellules phagocytaires après leur extravasation, les membranes érythrocytaires résultant d'une nécrose participent à enrichir la plaque en lipides.

En conclusion, bien que la néovascularisation soit reconnue comme une réaction compensatoire du déficit en O₂ et en nutriments dans la paroi vasculaire interne, la néovascularisation intraplaque quant à elle peut mener à la déstabilisation de la plaque, l'hémorragie intraplaque, l'athérombose et finalement à la rupture. Ces jeunes vaisseaux sont immatures, irréguliers, fragiles ((Le Dall, Ho-Tin-Noe *et al.* 2010) et surtout plus enclins à ce que l'on appelle l'extravasation (épanchement d'érythrocytes au sein de la plaque) (Xu, Lu *et al.* 2015).

2.6 Fibrose ou cicatrisation vasculaire

La fibrose est définie comme la cicatrisation d'un tissu ayant subi des dommages. Bien que les mécanismes pro-fibrosants varient en fonction du type tissulaire affecté, dans tous les cas c'est une transition d'une reconstruction de matrice extracellulaire (MEC) stable à un état de reconstruction instable qui dérive vers un processus pathologique (Wight and Potter-Perigo 2011). La MEC subit des changements conséquents qui vont altérer sa distribution, sa quantité et inéluctablement sa qualité (Schuppan, Ruehl *et al.* 2001).

L'athérosclérose est considérée comme une pathologie fibroproliférative (Ross 1993) et contrairement aux autres mécanismes de fibrose au cours desquels les fibroblastes sont les cellules responsables de la réparation, ce sont ici les CML qui sont en charge de la cicatrisation (Ross 1993). Les CML trouvées dans les plaques ont un phénotype altéré et modulé. En effet, elles vont passer d'une fonction contractile à un phénotype sécrétoire ; ceci est dû à une diminution d'expression des protéines contractiles et à l'augmentation des protéines de synthèse de la MEC (collagène, élastine) (Owens, Kumar *et al.* 2004).

Ce processus de cicatrisation va alors conduire à la formation d'une chape fibreuse autour de l'agglomérat de cellules spumeuses ou du centre nécrotico-lipidique (cf **Figure 6**)

afin de l'isoler de la circulation. En effet, les CML ne semblent pas neutraliser ou éliminer les lipides et composés toxiques mais simplement les ingérer ce qui engendre la formation de tissu fibreux entrelacé de CML lipidiques (GK 1996). Cette incapacité de l'organisme à éliminer les lipides de la paroi vasculaire (par transport inverse des HDL notamment) pourrait être liée à la perte de mobilité des CML et à la formation de cette chape fibreuse (Steinberg and Witztum 1990) (**Figure 6**).

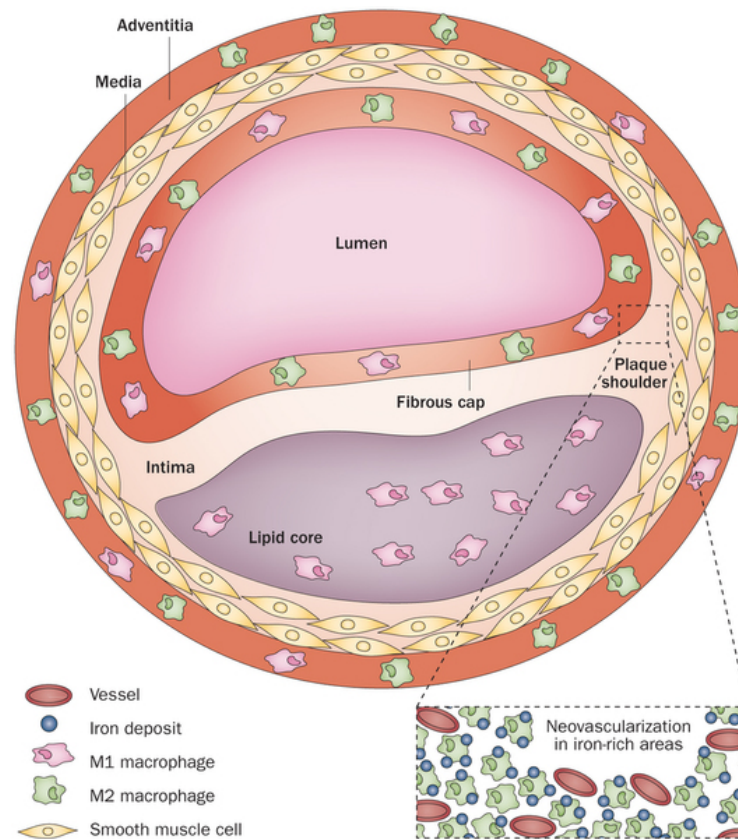


Figure 6. Présentation d'une plaque athéromateuse. La chape fibreuse formée par prolifération de CML permet d'insuler le cœur nécrotico-lipidique de la lumière du vaisseau. Elle contient également des macrophages de type M1 et M2. Le phénotype M1 est pro-inflammatoire tandis que le M2 est anti-inflammatoire (Chinetti-Gbaguidi, Colin *et al.* 2015).

La mort cellulaire ou nécrose des cellules spumeuses et cellules environnantes va entraîner la libération de lipides extracellulaires ainsi que des débris cellulaires : le cœur nécrotico-lipidique. Les CML meurent par ingestion de composés toxiques (LDLox) ou par hypoxie par un processus d'apoptose (mort cellulaire discrète ne provoquant pas d'inflammation) (Kockx, De Meyer *et al.* 1998). Le défaut d'élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes professionnels (macrophages) peut conduire à une nécrose

post-apoptotique, qui consiste en une rupture de la membrane plasmique et le relargage des lipides ingérés et d'autres éléments cellulaires dans l'espace extracellulaire. Cette nécrose va participer à l'enrichissement du cœur lipidique et à l'attraction de cellules inflammatoires par les médiateurs lipidiques et cytokiniques. La chape fibreuse censée protéger le cœur nécrotico-lipidique de la lumière du vaisseau de l'athérome peut être digérée par les protéases libérées par les cellules inflammatoires et spumeuses (Newby 2007).

2.7 Complications

L'athérosclérose est une maladie évolutive pouvant entraîner de nombreuses complications physiopathologiques.

Nous avons auparavant mentionné l'extravasation possible des érythrocytes lors d'une angiogenèse imparfaite conduisant à une fragilité endothéliale. Cette conséquence, due à la densité grandissante en néocapillaires de l'adventice vers la plaque, favorise la diapédèse (infiltration) de cellules sanguines. L'endothélium de ces néovaisseaux fragiles peut se rompre et le sang se retrouve alors en contact avec le cœur nécrotico-lipidique ce qui cause l'hémorragie intraplaque (**Figure 7**) (Michel, Virmani *et al.* 2011). Cette hémorragie intraplaque est possible dans le cœur lipidique, entraînant ainsi une brutale augmentation du volume de la plaque, possiblement accompagnée d'une occlusion de l'artère ou d'embolies athéromateuses.

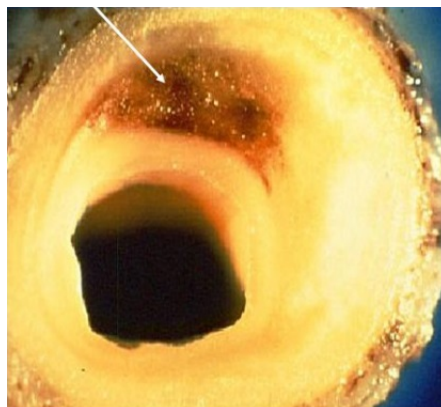


Figure 7. Hémorragie intraplaque. Ce phénomène est principalement causé par la rupture de néovaisseaux formés lors de l'angiogénèse.

Un autre facteur de vulnérabilité de la plaque à la rupture est l'augmentation du volume et de la taille du cœur nécrotico-lipidique (Libby 2008). La chape fibreuse isolant ce cœur lipidique présente alors deux morphologies distinctes (**Figure 8**) :

- Une chape fibreuse épaisse et un cœur lipidique réduit caractérisent les plaques stables dans lesquelles l'épaisseur de la couche de CML est suffisamment rigide pour préserver le cœur de lipides (Webb 2008)
- Une chape fibreuse fine et un cœur lipidique étendu. C'est la situation la plus pathogène car cette chape n'est pas suffisamment rigide pour insuler le cœur nécrotique et une rupture de la plaque est possible (Webb 2008)

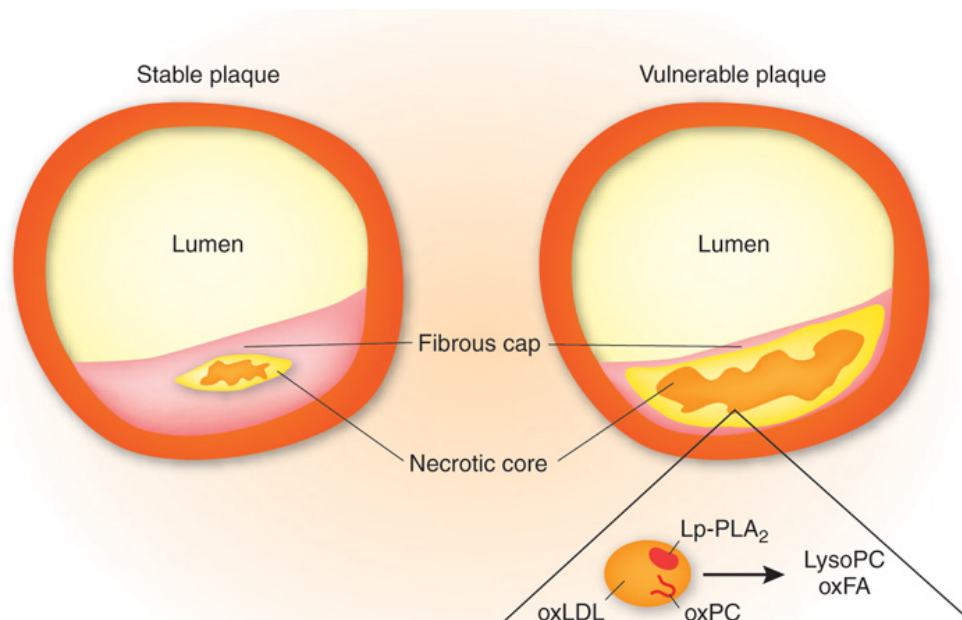


Figure 8. Différences entre plaque stable et instable. Comparées aux plaques athérosclérotiques stables, les plaques instables qui sont enclines à la rupture contiennent un cœur lipidique large et une chape fibreuse fine. La Lp-PLA₂ sécrétée au sein des lésions ou transportée par les LDL hydrolyse oxPC à la surface des LDLox en produisant la lysoPC et des oxNEFA (Non Esterified Fatty Acids). Ces lipides bioactifs contribuent à l'expansion du cœur nécrotique ainsi qu'au rétrécissement de la chape fibreuse (Webb 2008).

Dans le cas d'une plaque vulnérable, la chape est pauvre en CML et riche en macrophages. Si la plaque se rompt, un phénomène de thrombose peut se produire, notamment par l'exposition du collagène qui active les plaquettes ; on parle alors d'athérombose. Cependant, la rupture n'est pas la seule voie conduisant à la thrombose.

Une érosion superficielle de la plaque est un facteur prédisposant à la thrombose. Le thrombus ainsi formé va obstruer la lumière du vaisseau pouvant alors entraîner des complications cardiovasculaires de type AIT, AVC ou encore infarctus du myocarde (Agius 2007).

Enfin, un dernier phénomène se déroulant au sein d'une plaque vulnérable est la calcification vasculaire (**Figure 9**). De manière générale, elle a lieu au sein de la média et de l'intima des artères. La calcification intimale est caractérisée par des dépôts de lipides dans l'espace sous-intimal et par une accumulation de macrophages (Farzaneh-Far, Proudfoot *et al.* 2001, Amann 2008). *A contrario*, la calcification médiale peut avoir lieu indépendamment de l'athérosclérose.

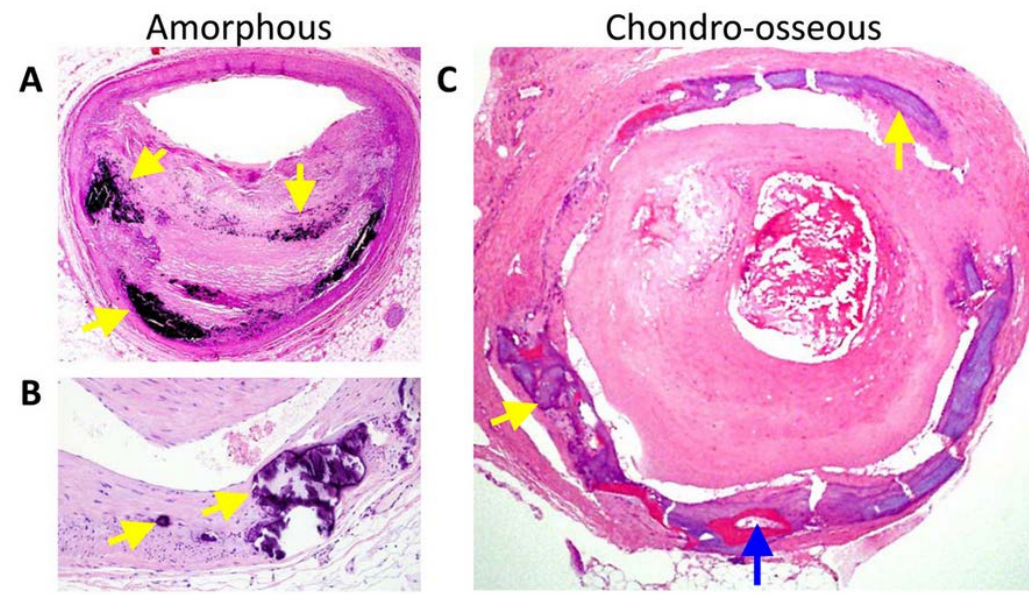


Figure 9. Sections histologiques de calcifications vasculaires humaines. En jaune : minéral amorphe. En bleu : tissu osseux (moelle). (A) Calcification artérielle médiale, métaplasie osseuse et cartilagineuse (en noir) (B) Agrandissement de (A) montrant des chondrocytes (cellules du cartilage), (C) Artère humaine avec un thrombus dans la lumière du vaisseau et présence de calcification médiale (Sage, Tintut *et al.* 2010).

La calcification est due à une accumulation de cristaux d'apatite en association avec la MEC. Cette accumulation de calcium entraîne une rigidification de la plaque et une perte de mobilité favorisant la rupture de la plaque (Doherty, Asotra *et al.* 2003).

En définitive, les plaques d'athérosclérose vulnérables peuvent se rompre ou générer des thrombus dans la lumière des artères, entraînant des conséquences cliniques variables en fonction du territoire vasculaire touché. Les médecins ont alors pour nécessité de classifier ces lésions afin de pouvoir prendre en charge de façon optimale les patients. Une classification est présentée en **Figure 10**. Selon l'« American Heart Association » (AHA), les plaques d'athérome peuvent présenter huit phases successives d'évolution, identifiées d'un point de vue histopathologique par huit types de plaques.

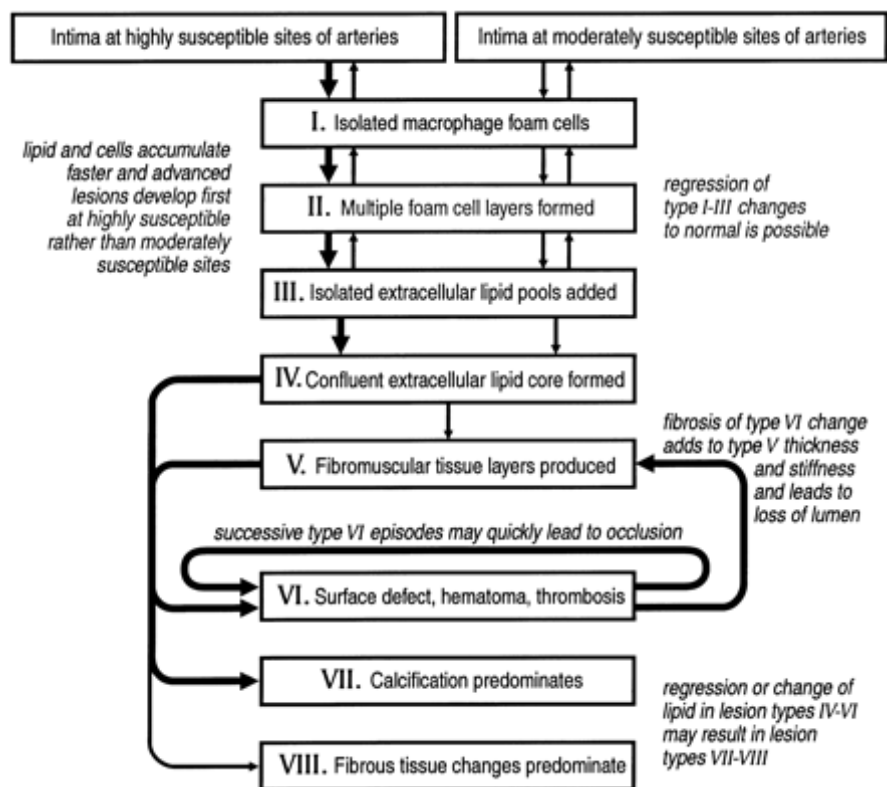


Figure 10. Séquence d'évolution des lésions athérosclérotiques du type I au type IV ainsi que les différentes voies possibles de progression au-delà du type IV. L'épaisseur des flèches indique la facilité de développement des lésions sur des sites spécifiques ou bien la fréquence et l'importance de la voie d'évolution de la lésion (Stary 2000).

2.8 Conclusion

Les plaques d'athérome vulnérables se développent au niveau de sites préférentiels du circuit vasculaire. Ces sites sont souvent caractérisés par des perturbations du flux sanguin. Les LDL circulantes en excès vont alors s'infiltrer dans l'espace sous-endothélial où elles vont subir une oxydation. Les cellules endothéliales activées vont recruter des cellules

inflammatoires circulantes qui se différencient sur site en macrophages et dont la fonction est notamment d'éliminer les LDLox. Cependant, la quantité croissante de lipoprotéines dépasse les capacités de phagocytose des macrophages qui deviennent des cellules spumeuses et entrent en apoptose. La progression de la plaque athéromateuse fait également intervenir des CML qui migrent de la média vers l'intima. Elles subissent un changement phénotypique et vont synthétiser et sécréter des fibres de collagène et d'élastine (principal constituant de la chape fibreuse). Elles vont, de la même manière que les macrophages, phagocyter les LDLox. L'apoptose des cellules spumeuses et leur non-élimination va entraîner la formation d'un cœur nécrotico-lipidique isolé de la lumière du vaisseau par une chape fibreuse. L'épaisseur de cette chape va déterminer le niveau de vulnérabilité de la plaque à la rupture. La rupture de la plaque d'athérome entraîne la formation d'un thrombus résultant du contact entre le sang et les éléments du cœur lipidique. C'est la formation de ce thrombus occlusif qui est responsable de l'ischémie du myocarde et des symptômes cliniques tels que l'AIT ou encore l'AVC ischémique.

3) Diagnostic de l'athérosclérose

Les facteurs de risque associés aux maladies cardiovasculaires ont été présentés précédemment et permettent d'évaluer une probabilité de survenue d'un accident cardiovasculaire (Wilson, D'Agostino *et al.* 1998). Ces facteurs sont modifiables (nutrition, sédentarité, tabagisme) ou non-modifiables (génétiques) et permettent de mettre en place une stratégie de prévention ou des stratégies thérapeutiques adaptées (De Backer, Ambrosioni *et al.* 2003).

Au cours des dernières années, un grand nombre de paramètres de type biochimique ont été analysés comme facteurs de risque de complications cardiovasculaires. Parmi ces nombreux marqueurs biochimiques (**Tableau 2**), ceux qui pourraient être introduits en pratique clinique doivent, dans un premier temps, être indépendants des autres facteurs et, dans un second temps, améliorer la prédiction globale de survenue de complications (Hellings, Peeters *et al.* 2007).

Dans cette partie, nous parlerons des facteurs de risque majeurs ainsi que du diagnostic de la plaque d'athérome vulnérable utilisant ou non ces nouveaux outils de prédiction de survenue de complications.

Marqueurs de l'inflammation	Marqueurs lipoprotéiques	Marqueurs de l'homéostasie	Marqueurs de l'oxydation	Autres marqueurs
Protéine C-réactive ultrasensible (hsCRP)	Lp(a)	Fibrinogène	ADMA (diméthylarginine asymétrique)	Microalbuminurie Cystatin C
Sérum amyloïde A (SAA)	VLDL	D-dimères	Lp-PLA ₂	Peptides natriurétiques
Cytokines (IL-6, IL-18)	Lipoprotéines résiduelles	Fibrinopeptides	Homocystéine	Obésité abdominale
Molécules d'adhésion cellulaire (VCAM-1, ICAM-1)	LDLox	Inhibiteur I de l'activateur du plasminogène (PAI-I)		Adiponectine
Lp-PLA ₂ (Lipoprotein associated phospholipase A ₂)	Génotypes de l'ApoE	Activateur tissulaire du plasminogène (TPA)		
Ligand CD40 soluble		Facteurs V, VII, VIII		
Nombre de leukocytes		Fragments de la prothrombine 1+2		
MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)		Activité et agrégation des thrombocytes		

Tableau 2. Facteurs de risque possibles de complications cardiovasculaires (Riesen 2008).

3.1 Biomarqueurs circulants et tissulaires

3.1.1 Marqueurs de l'inflammation

La protéine C-Réactive (CRP) est une protéine de phase aiguë et un marqueur inflammatoire principalement produit par le foie en réponse aux interleukines 1, 6 et au TNF- α (Ridker 2007). Des données récentes suggèrent que la CRP pourrait être produite par les tissus extrahépatiques dont plusieurs types cellulaires dans la plaque d'athérosclérose (Montecucco and Mach 2008). D'autres études ont suggéré un possible rôle de la CRP dans l'athérogenèse. En effet, il a été montré que la CRP augmentait la production de molécules d'adhésion, promouvait la captation de LDL par les macrophages et inhibait la production de NO \cdot en déstabilisant eNOS qui sont (comme détaillé précédemment) des éléments importants dans la formation des plaques ce qui en fait un biomarqueur de choix (**Figure 11**) (Campbell P 2006).

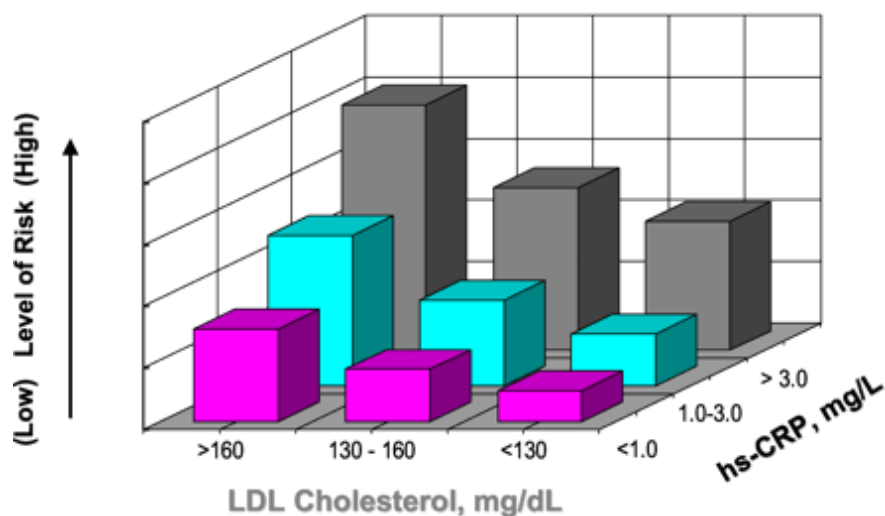


Figure 11. La CRP ultrasensible (hsCRP) et le risque cardiovasculaire associé aux niveaux de LDL-cholestérol. La hsCRP augmente la prédiction du risque cardiovasculaire quels que soient les niveaux de LDL-cholestérol (Ridker 2003).

Cependant, plusieurs études ont montré que la concentration élevée de CRP était corrélée à d'autres facteurs de risque déjà connus et sa mesure en pratique clinique est encore débattue (Danesh, Wheeler *et al.* 2004, Miller, Zhan *et al.* 2005).

La Lp-PLA₂ est une enzyme pro-inflammatoire appartenant à la superfamille des phospholipases A₂. Elle est principalement sécrétée par les macrophages et circule à 70-80% liée aux LDL et à 20-30% aux HDL (Stafforini 2009). Bien que des études aient montré son rôle athéroprotecteur par sa capacité à dégrader le PAF, la Lp-PLA₂ est devenue une enzyme associée à l'augmentation du risque cardiovasculaire (Koenig, Twardella *et al.* 2006). Une partie de ce chapitre sera consacrée à ce biomarqueur d'intérêt puisqu'elle est la cible en imagerie moléculaire de ces travaux de thèse.

La myéloperoxydase (MPO) est une protéine tétramérique de l'hème stockée principalement dans les leucocytes. On la retrouve principalement dans les neutrophiles et dans une moindre mesure dans les monocytes ; elle est relarguée après activation des neutrophiles. Il a été démontré qu'elle joue un rôle primordial dans les mécanismes de défense contre les micro-organismes par formation de radicaux libres aux propriétés antimicrobiennes (Nambi 2005). La MPO remplit sa fonction par des mécanismes d'oxydation et d'halogénéation (**Figure 12**). Les produits résultant de sa fonction d'halogénéation semblent jouer un rôle significatif dans l'athérosclérose à travers la formation de composés chlorés et de phospholipides insaturés (Friedrichs, Baldus *et al.* 2012).

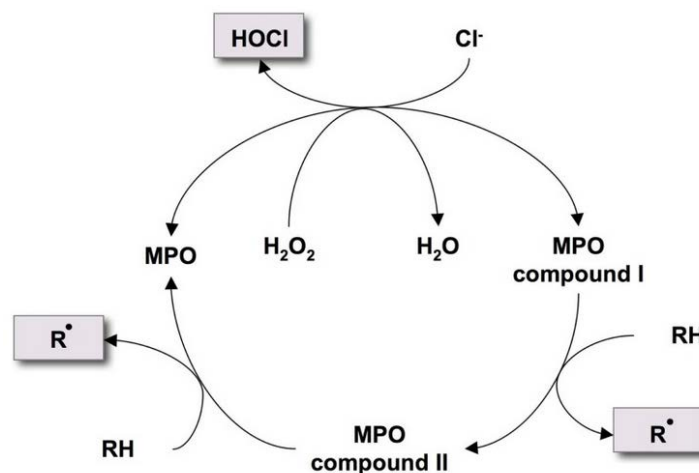


Figure 12. Cycles d'halogénéation et peroxydase de la MPO. La MPO réagit avec H₂O₂ pour former le composé I qui oxyde un chlorure pour former l'acide hypochloreux à fonction oxydante. De manière alternative, le composé I réagit avec des molécules oxydables (RH comme la tyrosine) pour former un radical intermédiaire via le composé II (Friedrichs, Baldus *et al.* 2012).

Ces composés sont présents de manière importante au niveau des lésions d'athérosclérose et possèdent des propriétés proathérogènes. De plus, la MPO provoque l'oxydation des LDL qui sont alors prises en charge par les macrophages et CML, entraînant la formation de cellules spumeuses délétères à la paroi vasculaire (Nambi 2005). La MPO peut aussi oxyder l'apoA1 des HDL, les rendant ainsi dysfonctionnelles et réduisant la capacité de l'ApoA1 à promouvoir le transport de cholestérol (Shao, Oda *et al.* 2010).

S'ajoutent aux marqueurs discutés précédemment, d'autres candidats qui sont actuellement à l'étude comme notamment le sérum amyloïde A (SSA), les molécules d'adhésion de l'endothélium (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine, P-sélectine) ou bien les médiateurs produits par les macrophages tels que les cytokines (IL-6, TNF etc.) (Riesen 2008).

3.1.2 Marqueurs lipoprotéiques

La Lp(a) (Lipoprotéine a) est constituée d'une particule de LDL et d'une glycoprotéine Apo(a) liée de façon covalente à l'ApoB. Le taux plasmatique de Lp(a) varie considérablement d'un individu à l'autre (**Figure 13**) (Tsimikas, Tsironis *et al.* 2007).

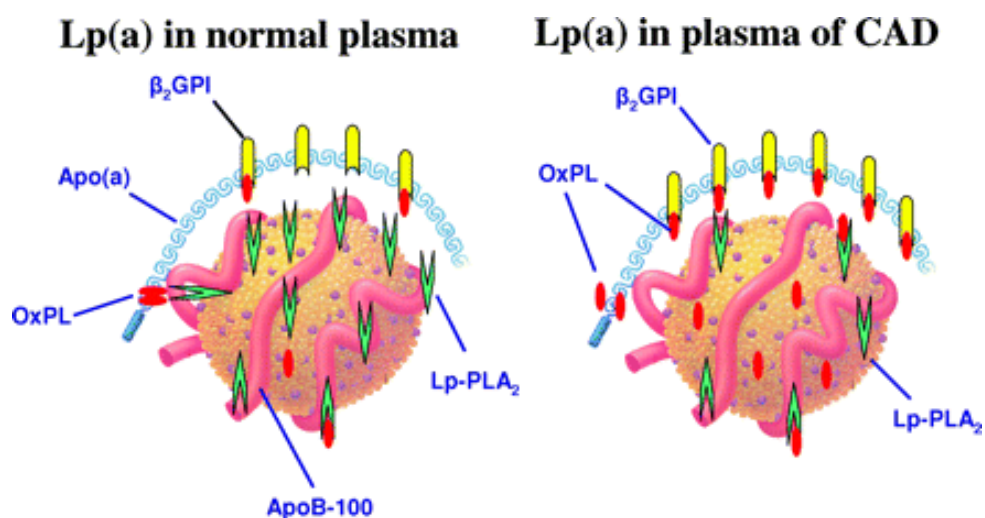


Figure 13. Association de la Lp-PLA₂ et des phospholipides oxydés à la Lp(a) dans le plasma de patients sains et atteints de maladie coronarienne. La Lp(a) de patients contient des niveaux plus élevés de phospholipides oxydés et beaucoup moins de Lp-PLA₂ que les sujets sains (Tsimikas, Tsironis *et al.* 2007).

Seulement 6% du cholestérol est transporté sous forme de Lp(a). Une méta-analyse a montré que des patients avec un taux de Lp(a) plus élevé présentaient un risque coronarien accru de 70%. De plus, une élévation de ce taux augmente le risque conféré par les autres facteurs de risque (Riesen 2008). Cette augmentation du risque est principalement due à l'apo(a) (cf **Figure 13**) ; sa capacité à induire la production de médiateurs pro-inflammatoires et pro-apoptotiques (notamment par le biais des phospholipides oxydés qu'elle transporte) pourrait prédisposer à l'athérogenèse et à la rupture de plaques (Tsimikas, Tsironis *et al.* 2007).

L'ApoB-100 est l'apolipoprotéine principale des chylomicrons, VLDL et LDL. De manière structurale, il y a une unité d'ApoB-100 par particule de LDL (Benn, Stene *et al.* 2008). Des études ont montré que la concentration d'ApoB-100 est un indicateur supérieur du risque cardiovasculaire en comparaison avec les profils lipidiques standards (Sniderman, Williams *et al.* 2011) (**Figure 14**).

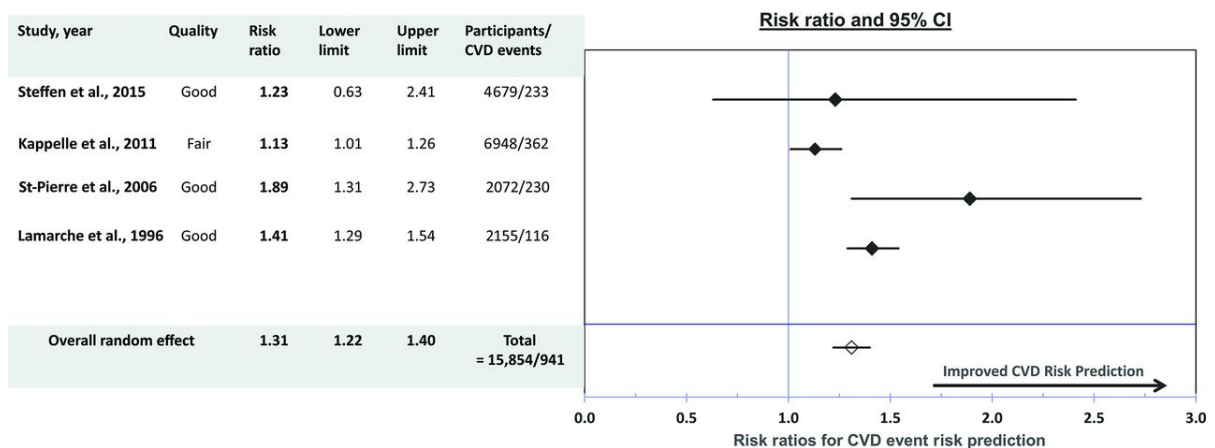


Figure 14. Prédiction du risque cardiovasculaire comparant les taux d'ApoB-100 et les facteurs de risque usuels (Sandhu, Musaad *et al.* 2016).

L'ApoA1 est l'apolipoprotéine majoritaire des particules HDL comptant pour 70% de leur masse et qui leur confère des propriétés anti-athérogènes (Walldius, Jungner *et al.* 2001). Les niveaux de HDL-cholestérol sont inversement proportionnels au risque cardiovasculaire. Cependant, la composition et la taille des particules de HDL est hétérogène d'un sujet à l'autre ce qui rendrait la mesure de l'ApoA1 plus précise en reflétant son potentiel athéroprotecteur (Dallmeier and Koenig 2014)(**Figure 15**).

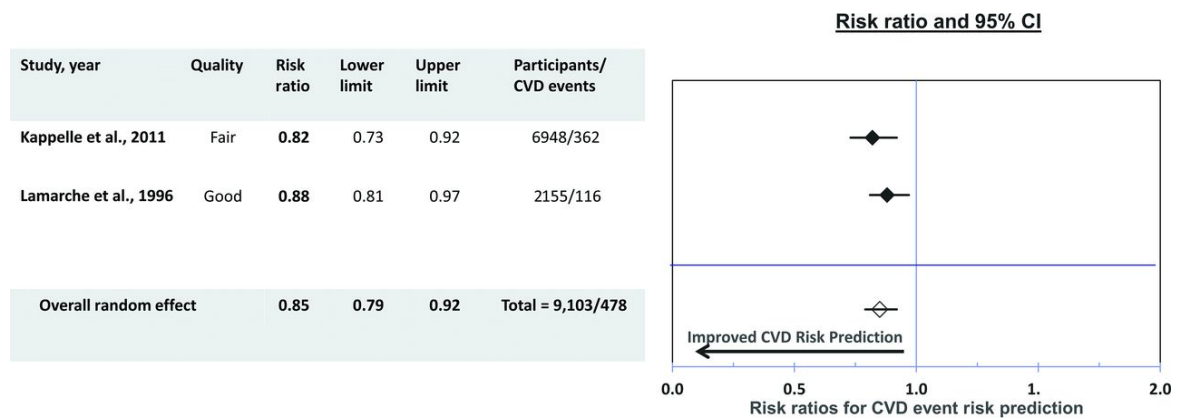


Figure 15. Prédiction du risque cardiovasculaire en comparant les taux ApoA1 et les facteurs de risque usuels (Sandhu, Musaad *et al.* 2016).

3.2 Imagerie de la plaque vulnérable

Afin de réaliser l'imagerie de la plaque d'athérome, différentes techniques d'exploration sont utilisées directement en clinique ou sont encore à l'étude. On peut distinguer deux catégories de techniques (Celeng, Takx *et al.* 2016) :

- les méthodes invasives qui nécessitent un cathétérisme pour accéder aux zones d'intérêt
- les méthodes non invasives qui au contraire ne nécessitent aucune intrusion dans l'organisme du patient mise à part l'injection d'un agent de contraste dont la toxicité et l'innocuité auront été auparavant déterminées

3.2.1 Méthodes invasives

3.2.1.1 Angiographie

L'angiographie est un outil permettant l'étude des vaisseaux sanguins. Le principe de cette technique repose sur l'injection d'un produit de contraste au cours d'une imagerie aux rayons X (RX). Un cathéter est alors introduit dans l'arbre vasculaire puis est amené jusqu'aux artères nécessitant un diagnostic (Maddux, Wink *et al.* 2004). Cette méthode renseigne sur l'étendue de la lumière vasculaire et de la sténose (**Figure 16**). Cependant

aucune information concernant la composition de la plaque ainsi que sur l'intérieur de la paroi vasculaire n'est accessible par cette technique (Eckert, Schmidt *et al.* 2015).

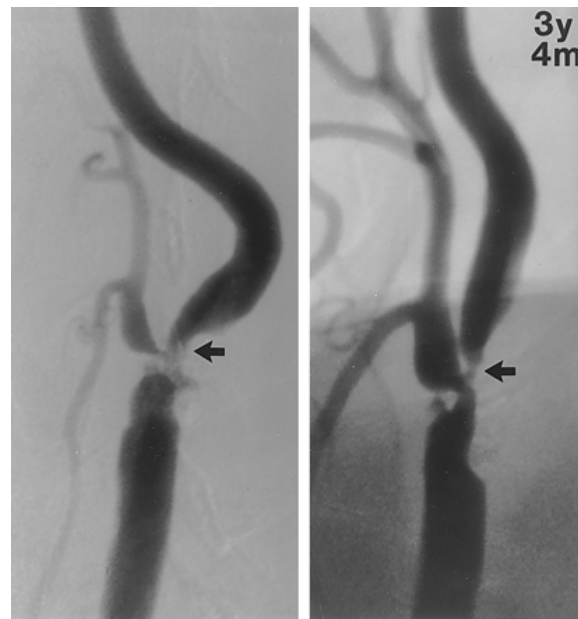


Figure 16. Exemple d'images obtenues par angiographie. Bifurcation carotidienne et progression de la sténose après 3 ans et 4 mois (3y4m) entre la figure de gauche et celle de droite (Akins, Pilgram *et al.* 1998).

3.2.1.2 Angioscopie

L'angioscopie permet l'observation directe de la paroi vasculaire. Cette technique invasive repose sur un principe de transmission par fibre optique de la lumière visible (380-780 nm). Les images obtenues sont alors colorisées et permettent de différencier une lésion fibreuse (en blanc), une lésion plus lipidique (en jaune) et enfin un thrombus (en rouge). Un exemple d'images obtenues est proposé en **Figure 17** (Savastano, Zhou *et al.* 2017).

Cependant, cette méthode nécessite un environnement artériel dépourvu de sang par blocage du flux sanguin pouvant entraîner une occlusion aiguë de l'artère étudiée. Bien que la discrimination des couleurs permette de classer les plaques, cette technique ne donne cependant pas accès à des facteurs importants comme l'épaisseur de la chape fibreuse ou encore la taille du cœur nécrotico-lipidique (Yamamoto, Okamatsu *et al.* 2009).

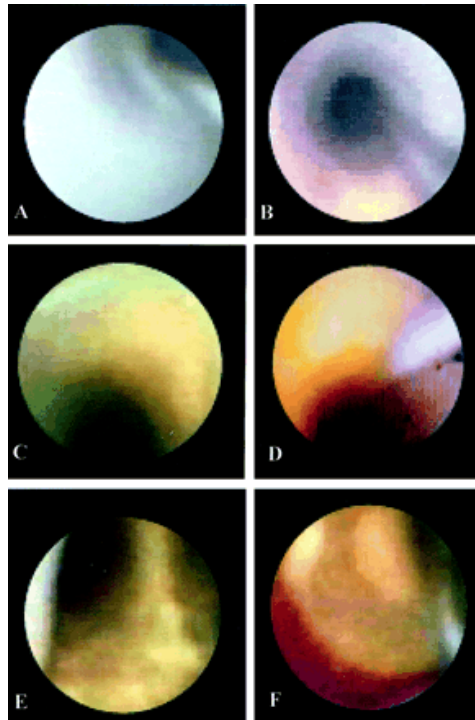


Figure 17. Exemple d'images obtenues par angioscopie. (A) Plaque avec cœur riche en lipides et une chape fibreuse fine. La chape de plus en plus fine augmente l'intensité de l'image (B, C et D). En E, on voit un complexe plaque-cœur riche en lipides et en F une plaque lipidique associée à un thrombus (MacNeill, Lowe *et al.* 2003).

3.2.1.3 Echographie intravasculaire

L'échographie intravasculaire (IVUS pour IntraVascular UltraSound) est un examen nécessitant la cathétérisation d'une sonde à ultrasons. Son principe repose sur la capacité d'un tissu à répondre face à une onde acoustique. En effet, le milieu biologique va opposer une résistance face à l'onde qui le traverse et possède en conséquence ce qu'on appelle une impédance. La résolution axiale de cette méthode est d'environ 150 μm (Gogas, Farooq *et al.* 2011).

L'IVUS permet d'obtenir des informations concernant l'épaisseur et la densité de la paroi des vaisseaux et d'en déduire si une artère est saine ou pathologique (**Figure 18**). Cependant, la faible résolution est un frein à la détermination de l'épaisseur de la chape fibreuse (Kimura, Bhargava *et al.* 1995).

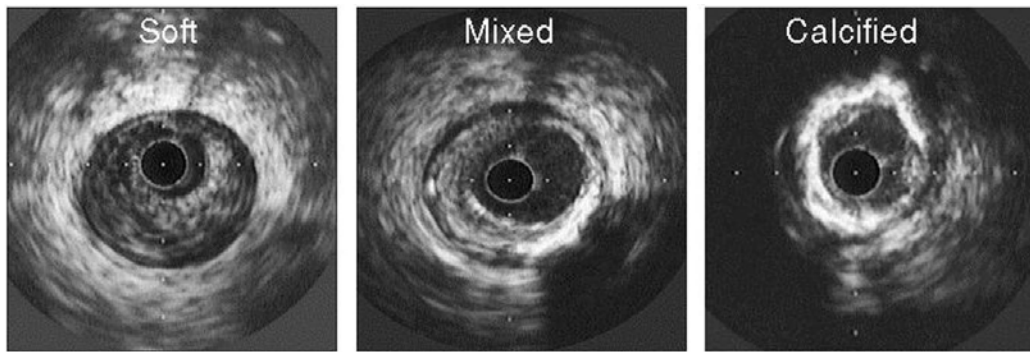


Figure 18. Plaque d'athérome par IVUS. Tissu mou (gauche), tissu faiblement calcifié (centre) et tissu calcifié (droite) (De Franco and Nissen 2001).

L'IVUS peut être complétée par l'élastographie qui permet d'étudier la déformation des tissus en fonction du cycle cardiaque (systole et diastole) en étudiant les différences de pression entre les tissus. Un exemple d'imagerie par élastographie est présenté en **Figure 19**. La combinaison des deux images permet d'obtenir une cartographie de l'élasticité des différentes zones de la plaque en fonction de sa composition (de Korte and van der Steen 2002).

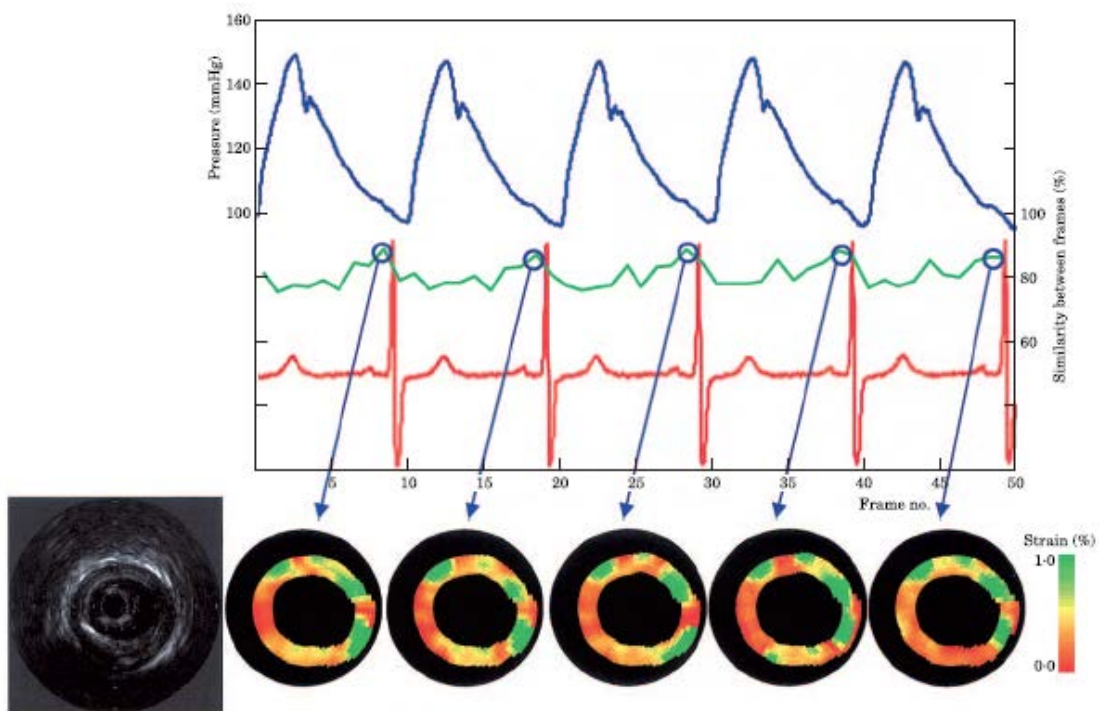


Figure 19. Élastographie d'une plaque coronarienne montrant 5 acquisitions pendant les cycles cardiaques. (de Korte, Carlier *et al.* 2002).

Enfin, il est possible d'utiliser l'imagerie fonctionnelle par IVUS grâce notamment au développement de produits de contraste. L'équipe de Villanueva *et al.* a par exemple montré par ultrasons la détection de molécules d'adhésion leucocytaires comme ICAM-1 (Villanueva, Jankowski *et al.* 1998). Dans cette étude, les auteurs mettent au point *in vitro* (modèle de culture cellulaire) une microbulbe (agent de contraste) conjuguée à un anticorps monoclonal d'ICAM-1 humaine capable de se lier spécifiquement aux cellules endothéliales activées d'artères coronaires humaines surexprimant ICAM-1. Cependant, cette technique invasive n'est que peu utilisée à l'heure actuelle.

3.2.1.4 Tomographie en cohérence optique

La tomographie en cohérence optique (OCT pour Optical Coherence Tomography) est une technique d'imagerie optique intravasculaire qui peut être décrite comme analogue à l'IVUS. Son principe repose sur la réverbération des ondes infrarouges (IR) par les tissus et elle possède une résolution allant jusqu'à 10 μm (**Figure 20**). La très bonne résolution de cette technique permet entre autre d'étudier l'épaisseur de la chape fibreuse (Fujimoto, Boppart *et al.* 1999).

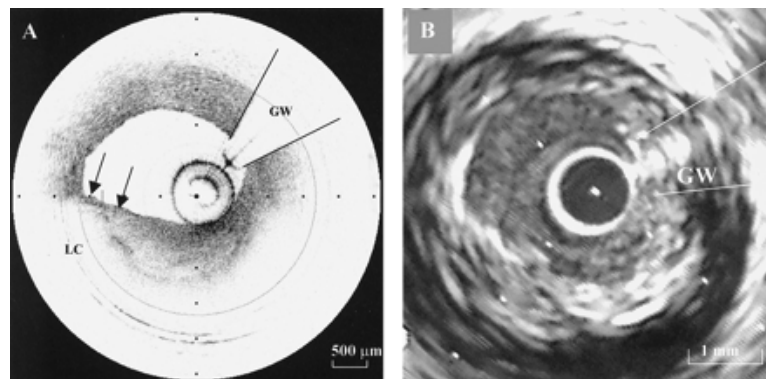


Figure 20. Imagerie intracoronarienne *in vivo* d'une plaque possédant un cœur riche en lipides par OCT (A) et IVUS (B). On voit ici la supériorité de résolution de l'OCT. La chape fibreuse fine (indiquée par une flèche) protège un cœur lipidique (LC) (MacNeill, Lowe *et al.* 2003).

Les principales limites de l'OCT sont l'atténuation du signal par le flux sanguin et la faible pénétration des ondes IR dans le tissu (2-3 mm) Ainsi, la taille du cœur nécrotico-lipidique ne peut pas être déterminée (Terashima, Kaneda *et al.* 2012).

3.2.1.5 Thermographie

La thermographie est une technique reposant sur la mesure de la température à la surface de la paroi vasculaire artérielle. L'inflammation, au sens propre du terme, entraîne une augmentation de la production de chaleur et l'élévation de température au sein des plaques vulnérables pourrait être corrélée à l'intensité de l'inflammation locale (Ley and Kim 2007).

Une des principales limites serait ce que l'on appelle le « cooling effect » qui correspond à la dissipation de chaleur par le flux sanguin (Stefanadis, Toutouzas *et al.* 2003). Le couplage de cette méthode avec l'IVUS permet d'obtenir des informations anatomiques (Kenneth and Cespedes 2003).

3.2.1.6 Imagerie par Résonance Magnétique Intravasculaire (IRMiv)

Cette technique repose sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et donc sur le comportement des atomes à spins non nuls (ici le proton ^1H) soumis à un champ électromagnétique. Cette méthode combine une sonde intravasculaire réceptrice et une IRM classique (Corti, Fuster *et al.* 2001). Une étude a par exemple montré une différence de signal entre la chape fibreuse, les lipides et la calcification *ex vivo* sur des plaques de carotides humaines (Rogers, Prichard *et al.* 2000).

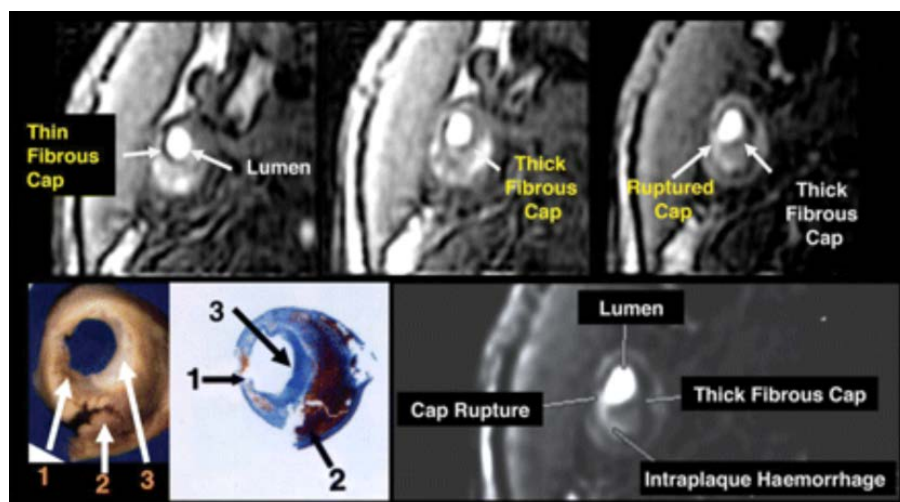


Figure 21. IRM d'une plaque carotidienne humaine avec hémorragie intraplaque (flèche 2) et rupture de la chape fibreuse (flèche 1) accolée à une zone où la chape fibreuse est épaisse (flèche 3) (Corti and Fuster 2011).

Les principales limites sont la taille du cathéter et la durée des acquisitions. Cependant, malgré ces difficultés, la qualité de l'image (**Figure 21**) obtenue et les développements récents de cathéters compatibles avec l'IRM font de l'IRMiv un domaine de recherche intense (Corti and Fuster 2011).

3.2.1.7 Spectroscopie

La spectroscopie repose sur l'absorption des rayonnements par les molécules induisant alors différentes transitions et émissions selon la longueur d'onde utilisée.

On peut tout d'abord distinguer la spectroscopie infrarouge. En effet, les molécules absorbent des radiations dans le proche infrarouge (500-2500 nm). En fonction de la réponse, on peut déterminer avec précision la nature de la zone atteinte. Cette méthode a été utilisée chez l'homme en *post-mortem* et chez le lapin hypercholestérolémique (Moreno, Lodder *et al.* 2002). L'étude chez l'homme a notamment montré une sensibilité et une spécificité de 90% et 93% pour le corps lipidique, 77% et 93% pour la fine capsule fibreuse, et 84% et 89% pour la présence de cellules inflammatoires, respectivement.

On peut aussi distinguer la spectroscopie RAMAN qui permet d'étudier la vibration des liaisons au sein d'un édifice moléculaire. Cette vibration va entraîner l'émission d'un photon dont le décalage en longueur d'onde par rapport à l'onde excitatrice est caractéristique de la liaison. Des groupes ont réussi à quantifier la teneur en cholestérol et en calcium d'artères coronaires humaines *ex vivo* (van de Poll, Kastelijn *et al.* 2003).

3.2.1.8 Conclusion

Il est important de noter que chaque méthode présentée possède ses propres avantages et inconvénients (**Tableau 3**). Il serait sûrement judicieux de combiner les différentes modalités (OCT, IVUS, IRM) et ainsi de corréler les informations de compositions, morphologiques et structurales. Cependant, à l'échelle d'une population et en application clinique, les méthodes invasives sont souvent trop compliquées à mettre en œuvre.

Technique	Détection de la chape fibreuse	Statut inflammatoire	Cœur lipidique	Remodelage
IVUS	+	-	+	+++
OCT	+++	+	+	-
Thermographie	-	+++	-	-
Angioscopie	-	-	++	-
IRMiv	-	-	++	-
Spectroscopie	-	++	++	-

Tableau 3. Méthodes d'imagerie invasives de la plaque vulnérable. Chaque méthode possède ses avantages et inconvénients. La combinaison de plusieurs méthodes permet l'étude simultanée de plusieurs paramètres (Rodriguez-Granillo, Regar *et al.* 2005).

3.2.2 Imageries non-invasives

3.2.2.1 Angiographie CT (Computed Tomography)

L'angiographie CT est un outil d'imagerie diagnostique non invasif qui permet notamment la détection de la plaque d'athérosclérose et le degré de sténose associé. Cette méthode permet la visualisation de la composition et de la morphologie de la plaque. Les plaques vulnérables sont caractérisées par une chape fibreuse fine (<65 μm) et un important cœur nécrotico-lipidique. Bien que la résolution spatiale actuelle de l'angiographie CT ($\approx 400 \mu\text{m}$) ne permette pas la visualisation d'une chape fibreuse fine, les dimensions d'un gros cœur nécrotico-lipidique rentrent dans le seuil de détection (Versteyslen, Kietselaer *et al.* 2013).

3.2.2.2 Tomodensitométrie aux rayons X (TDMRX)

Cette technique non invasive utilise les RX (**Figure 22**). Le tissu étudié est bombardé de rayons X (ou photons de longueur d'onde comprise entre 10^{-12} et 10^{-8} m) et des capteurs sont chargés de recevoir les photons passant au travers du tissu. En fonction du tissu traversé, l'atténuation (sous forme de niveaux de gris sur l'image) sera différente et proportionnelle à la

densité du tissu. Cette méthode permet entre autres de détecter les calcifications dans la plaque d'athérosclérose (Achenbach, Moselewski *et al.* 2004) mais présente quelques limites pour les lésions non calcifiées (Leber, Knez *et al.* 2004). La TDMRX a vu sa technique s'améliorer avec une augmentation du nombre de détecteurs ce qui a donné naissance à une génération de « Multi Detector Computed Tomography » (MDCT).

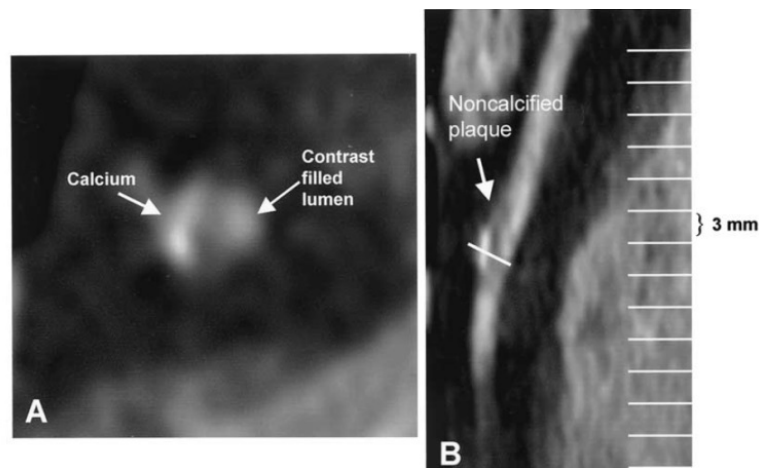


Figure 22. Images MDCT d'artères coronaires divisées en coupes de 3 mm. Vue axiale (A) et longitudinale (B) présentant une plaque calcifiée et non calcifiée (Leber, Knez *et al.* 2004).

Même si la méthode permet une détection efficace de la calcification, la controverse concernant le caractère vulnérable d'une plaque et sa calcification est encore présente et pose les limites de la méthode (Wu, Pei *et al.* 2014).

3.2.2.3 IRM

Cette technique permet de détecter différents aspects des plaques carotidiennes tels que les cœurs riches en lipides, la chape fibreuse ou encore l'hémorragie intraplaque (Hatsukami, Ross *et al.* 2000, Yuan, Mitsumori *et al.* 2001). Cependant, l'imagerie cardiaque est freinée par le compromis entre résolution spatiale et temporelle (Elgort and Duerk 2005). Une étude a par ailleurs montré qu'un signal hyper-intense au sein de la paroi vasculaire était associé avec une accumulation de macrophages et une absence de calcification alors que l'accumulation intra-luminale de signal était reliée à la présence d'un thrombus (Matsumoto, Ehara *et al.* 2015). De plus, chez des patients atteints de syndrome coronarien aigu, les images ont pu être corrélées avec la présence de thrombus (Jansen, Perera *et al.* 2011). Cependant,

l'imagerie cardiaque par résonance magnétique ne permet pas avec précision la discrimination des composants des plaques coronariennes.

3.2.3 Médecine nucléaire

Les méthodes d'imagerie présentées possèdent toutes une bonne résolution spatiale mais malheureusement une faible sensibilité (**Tableau 4**) (Dobrucki and Sinusas 2010).

Technique	Résolution spatiale	Sensibilité (mol/l)	Avantages	Inconvénients
Ultrasons	0,05-0,5 mm	/	Facile d'accès Peu coûteuse Pas de rayonnement ionisant	Profondeur de pénétration limitée Peu de sondes moléculaires disponibles
CT	0,05-0,2 mm	10^{-3} - 10^{-5}	Absorption proportionnelle à la concentration en agent de contraste Excellente résolution spatiale	Rayonnement ionisant Agent de contraste néphrotoxique Faible sensibilité
IRM	0,02-0,1 mm	10^{-3} - 10^{-5}	Pas de rayonnement ionisant Excellente résolution spatiale Équipement disponible en routine	Faible sensibilité Artéfacts de mouvement Peu de sondes disponibles

Tableau 4 Avantages et inconvénients des méthodes d'imagerie structurale et fonctionnelle (Dobrucki and Sinusas 2010).

L'intérêt actuel en ce qui concerne le diagnostic de l'athérosclérose est la détection précoce ainsi que la prévention de la pathologie afin de limiter les coûts notamment en santé

publique (Ohsfeldt, Gandhi *et al.* 2010). Traditionnellement, le diagnostic de l'athérosclérose (comme vu précédemment) repose sur des techniques qui permettent de mesurer des changements dans le métabolisme, le flux sanguin ou encore dans les fonctions biologiques. L'imagerie moléculaire (ou médecine nucléaire) est une méthode non invasive qui permet la détection de processus biologiques caractérisant les tissus avant l'apparition de complications anatomiques et de conséquences physiologiques (Grammaticos 2014). Dans cette partie, nous définirons les deux modalités utilisées en imagerie médicale (TEP : Tomographie par Emission de Positrons et TEMP : Tomographie par Emission MonoPhotonique dite aussi SPECT pour Single-Photon Emission Computed Tomography) et enfin les principaux radiotraceurs à l'étude et utilisés en routine clinique.

3.2.3.1 Radioactivité

La radioactivité est un phénomène physique par lequel des noyaux atomiques dits instables (radioisotopes ou radionucléides) vont se transformer en d'autres atomes par un phénomène de désintégration. Ces radioisotopes vont alors émettre des particules de matière (électron, neutron...) et de l'énergie (photon). Ces rayonnements émis entraînent l'ionisation de la matière traversée. Parmi tous les rayonnements ionisants, on distingue les rayons α , β et γ (Jha 2004).

3.2.3.2 Modalités d'imagerie nucléaire

La TEP est une des méthodes d'imagerie médicale permettant d'évaluer certains aspects de l'activité métabolique ou bien moléculaire d'un tissu ou d'un organe en 3D. Dans ce cas, c'est la désintégration β^+ qui intervient en ce qui concerne les radiotraceurs et isotopes utilisés. Ce type particulier de rayonnement concerne les isotopes présentant un excès de protons et s'accompagne de l'émission d'un positon et d'un neutrino (Jha 2004) (Maisey 2005) (**Figure 23**). Cette technique repose sur l'injection d'une molécule marquée (avec un radioisotope) dont le comportement et propriétés *in vivo* sont connus. Leur accumulation ou liaison permet d'obtenir une image d'un organe ou d'une cible moléculaire déterminée.

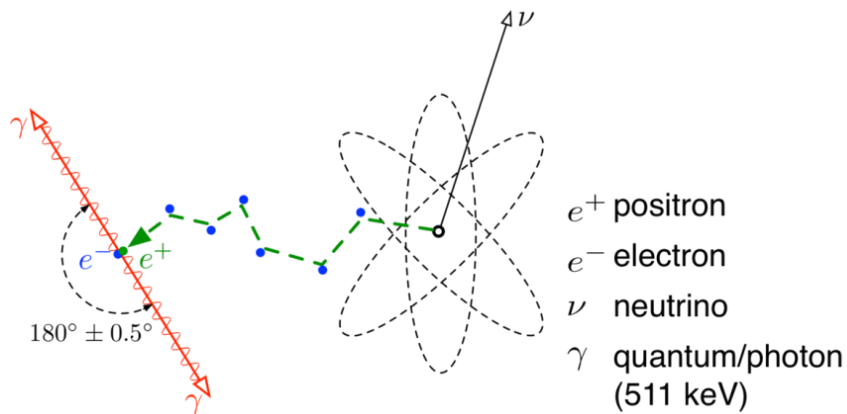


Figure 23. Désintégration β^+ (positon).

Le positron est la particule anti-électronique et va, lorsqu'elle rencontre un électron de la matière, s'annihiler en deux rayonnements gamma émis à 180° (sous forme de photons). La détection des photons est simultanée et on peut ainsi par coïncidence de la réception revenir au lieu de l'annihilation (Maisey 2005). La TEP permet de visualiser les activités métaboliques des cellules ; on parle alors d'imagerie fonctionnelle qui s'oppose aux méthodes d'imagerie structurales présentées dans le chapitre précédent. Un exemple d'instrumentation TEP est présenté en **Figure 24** avec injection du radiotracer (^{18}F , ^{68}Ga , ...), acquisition des images et reconstruction (Corporation 2016).

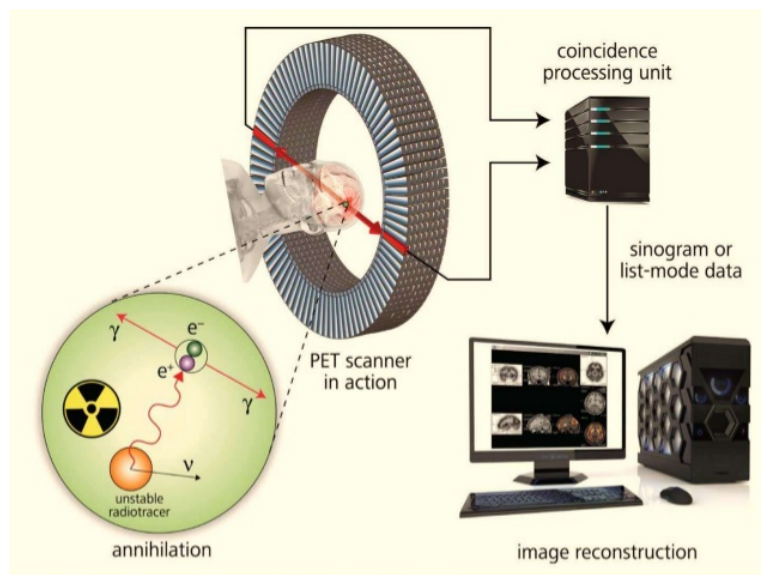


Figure 24. Principe d'une TEP. Les cristaux de détection permettent la mesure des rayonnements gamma. Ces signaux sont ensuite analysés (sinogramme) et transformés sous forme d'image après leur reconstruction.

Le principe de la TEMP est proche de celui de la TEP puisqu'il s'agit également d'une tomographie d'émission reposant sur l'injection d'un radiopharmaceutique. La TEMP est également une technique d'imagerie nucléaire reposant quant à elle sur la scintigraphie et permettant l'obtention d'images par le biais de gamma caméras qui tournent autour du patient (Figure 25).

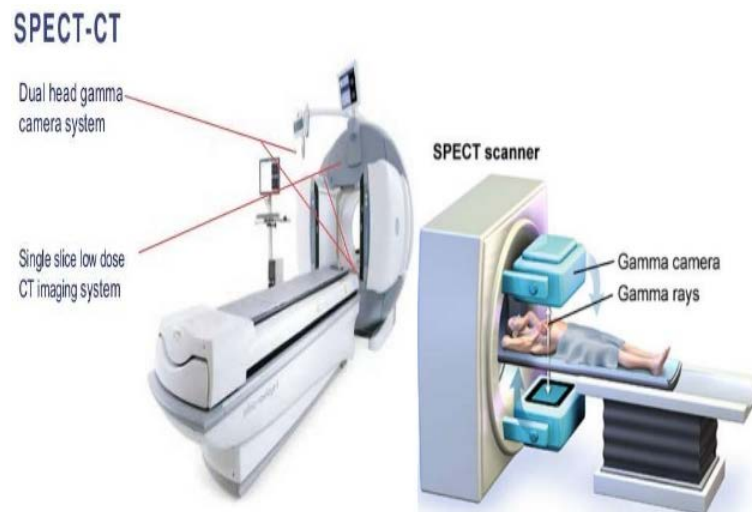


Figure 25. Principe d'une TEMP.

Un collimateur va permettre la sélection angulaire des photons et des détecteurs vont pouvoir recevoir les signaux gammas émis par le radioisotope (Figure 26). Ainsi la TEMP se différencie de la TEP par les radionucléides utilisés (^{99m}Tc , ^{111}In , ...).

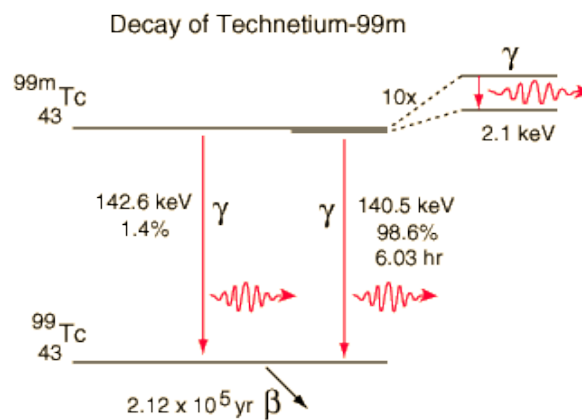


Figure 26. Exemple du ^{99m}Tc (demi-vie : 6h) se transformant en ^{99}Tc après émission gamma.

3.2.3.3 Radiotraceurs en imagerie de l'athérosclérose

Le développement et l'expansion de la TEP dépend en grande partie de la découverte de nouveaux radiotraceurs capables de cibler divers processus physiologiques ou pathologiques.

Alors que de nombreux traceurs sont développés dans le ciblage du processus inflammatoire (consommation augmentée de glucose par les cellules inflammatoires, récepteurs aux chimiokines ou interleukines, phagocytose, etc.) (Rogers and Tawakol 2011) lors du développement de l'athérosclérose (cf Partie I), d'autres en revanche ciblent des processus associés à l'athérome (développement de la chape fibreuse, hypoxie) (Folco, Sheikine *et al.* 2011) mais également à la progression de la plaque et sa rupture (angiogénèse, calcification, lésions dues aux complications) (Golestani, Jung *et al.* 2016) (**Tableau 6**).

La résolution spatiale de l'image est comprise entre 4 et 7 mm pour l'imagerie clinique (chez l'homme) et est inférieure à 1,5 mm en études précliniques (chez la souris ou le rat par exemple) (Pichler, Wehrl *et al.* 2008).

Processus ciblé	Cible moléculaire	Radiotracteur	Sujets	Artère ciblée	TRR	LNR
Endothélium	P-sélectine	⁶⁴ Cu-anti P-sélectine Ab	AM	Aorte	1,3	5,9
		⁶⁸ Ga-fucoïdan	AM	Aorte	5,1	1,7-2,4
Cellules inflammatoires	Métabolisme glucosidique	¹⁸ F-FDG	Hu-I	Carotide	1,5-2,2	1,1-1,2
	Récepteur de chimiokines	⁶⁴ Cu-DOTA- ν MIP-II	AM	Fémorale		3,4-3,7
		⁶⁴ Cu-DOTA-DAPTA	AM	Fémorale		2,9-4,4
	Récepteur manosidique	¹⁸ F-fluoro-D-mannose	AM/Hu-T	Carotide		2,3-4,8
	Récepteur SST	⁶⁸ GA-DOTATATE	Hu-I	Aorte/coronaire	1,4-3,7	1,2-1,5
	TSPO	¹¹ C-PK11195	Hu-I	Aorte-carotide	1,1-2,4	1,2-2,5
	Métabolisme de la choline	¹⁸ F- ¹¹ C-choline	Hu-I			1,9
	Phagocytose	⁶⁴ Cu-nanoparticules	AM	Aorte		
Néoangiogenèse	Intégrine	⁶⁸ Ga-NOTA-RGD	AM/Hu-I	Aorte-carotide		
		¹⁸ F-flotegatide	AM	Aorte	1,5-4,7	2,8-5,2
		¹⁸ F-galactoRGD	Hu-I	Carotide	2,0	1,7
	Récepteur VEGF	⁸⁹ Zr-bevacizumab	Hu-T	Carotide	2,1	
Hypoxie	Red-Ox	¹⁸ F-FMISO	AM	Aorte		2,5
Calcification	Chemisorption	¹⁸ F-fluoride	Hu-I	Coronaire	1,3-1,7	1,1

Tableau 5. Radiotraceurs récemment décrits dans l'imagerie moléculaire TEP de la plaque d'athérome. Ab = anticorps, AM = modèle animal, Hu-I = imagerie humaine, Hu-T = imagerie sur tissus humains, LNR = ratio lésion-sain, SST = somatostatine, TRR = ratio cible-tissu de référence, TSPO = protéine de translocation, VEGF = facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (adapté de Lee and Paeng 2015).

Des améliorations concernant la résolution spatiale mais aussi la correction du mouvement myocardique sont nécessaires dans le cas de l'imagerie des artères coronaires. La **Figure 27** présente un schéma récapitulatif d'une plaque d'athérome ainsi que les traceurs TEP et TEMP associés à leurs cibles moléculaires.

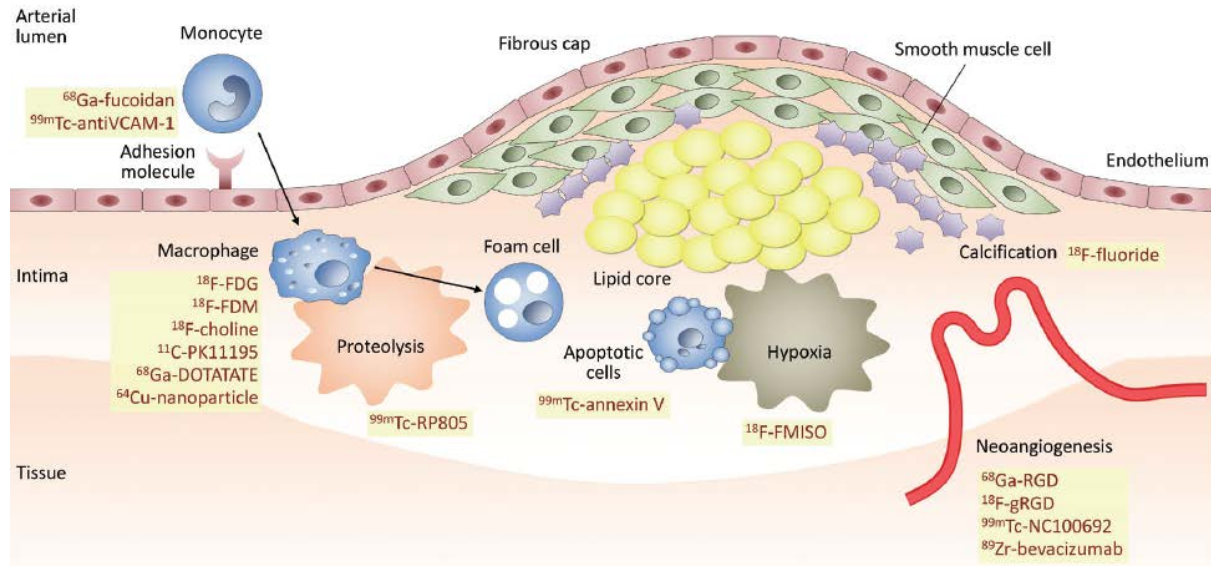


Figure 27. Plaque d'athérome et cibles moléculaires accompagnées des radiotraceurs associés (Lee and Paeng 2015).

Le 2-deoxy-2- ^{18}F -fluoro-D-glucose (^{18}F -FDG) est le radiotraceur de référence pour l'imagerie *in vivo* du cancer ; il a été utilisé pour évaluer l'athérosclérose (**Schéma 3**). Le déoxyglucose est un analogue du glucose qui entre en compétition avec ce dernier dans sa captation par les macrophages et autres cellules consommatrices de glucose (Davies, Rudd *et al.* 2004).

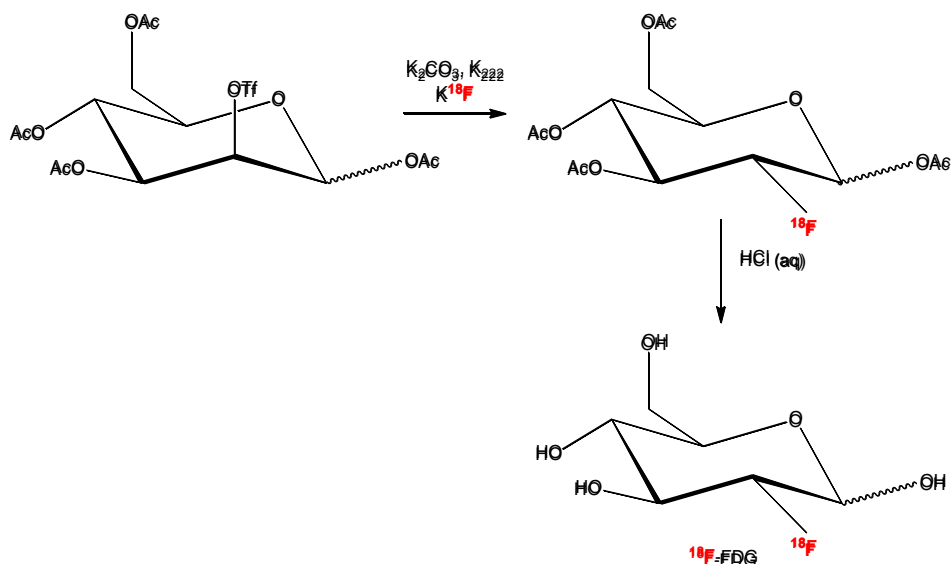


Schéma 3. Synthèse du ^{18}F -FDG.

La littérature concernant l'imagerie de l'athérosclérose utilisant le ^{18}F -FDG est hétérogène. Quand plusieurs études montrent l'accumulation de ^{18}F -FDG dans les plaques athérosclérotiques chez l'homme (Rudd, Warburton *et al.* 2002) (**Figure 28**) ou chez le lapin (Lederman, Raylman *et al.* 2001), d'autres n'obtiennent pas les mêmes images (Menezes, Kayani *et al.* 2010) (Myers, Rudd *et al.* 2012). Une étude a par ailleurs indiqué différents mécanismes de stimulation des macrophages (hypoxie), CML ou cellules endothéliales (activées par des cytokines) qui pourraient contribuer à une captation importante du ^{18}F -FDG dans les plaques athérosclérotiques (Folco, Sheikine *et al.* 2011).

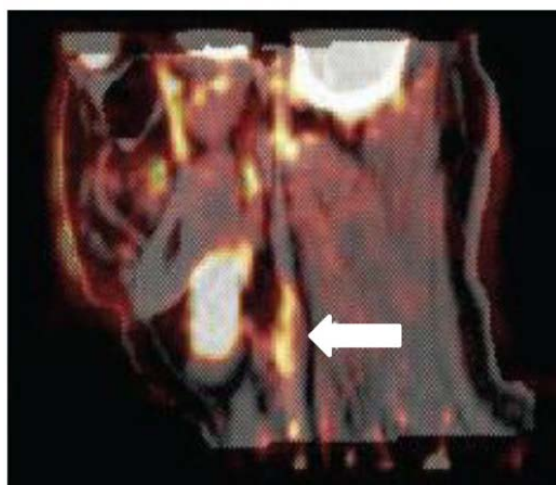


Figure 28. Imagerie d'un patient adulte avec accumulation (flèche blanche) au niveau d'une plaque carotidienne (Orbay, Hong *et al.* 2013).

L'utilisation du ^{18}F -FDG reste néanmoins dépendante de l'activité métabolique des cellules et leur appétence pour le glucose, or, les plaques avancées d'athérombose sont souvent composées de matériel inerte métaboliquement (lipides, hémoglobine, cellules mortes). Il est possible qu'une réponse immunitaire au niveau adventiciel (formation d'organes lymphoïdes tertiaires menant à une forte accumulation de lymphocytes B) puisse donner des signaux positifs en regard des plaques d'athérosclérose (Yin, Mohanta *et al.* 2016). Enfin, la principale limite du ^{18}F -FDG est sa forte captation par le myocarde qui est un grand consommateur de glucose. Il a été montré que cette captation pouvait être diminuée par administration de verapamil chez la souris (Gaeta, Fernandez *et al.* 2011). Le verapamil est un inhibiteur calcique. Par son action sur les mouvements de calcium au sein des cellules cardiaques, il diminue la conduction du nœud auriculo-ventriculaire qui entraîne une diminution de l'accumulation de ^{18}F -FDG comme montré par les auteurs.

Le ^{18}F -fluorure de sodium (Na^{18}F ou ^{18}F -fluorure) se lie avec l'hydroxyapatite par substitution de deux groupements hydroxyles pour former la fluoroapatite (Hawkins, Choi *et al.* 1992). Il a été montré que l'hydroxyapatite est le composé majoritaire de la calcification vasculaire ce qui fait du Na^{18}F un marqueur possible de la calcification au cours de l'athérogenèse (Lee, Morrisett *et al.* 2012). Des études ont en effet montré son accumulation sur des sténoses et scléroses aortiques de patients ainsi que dans des artères coronaires (**Figure 29**) (Dweck, Chow *et al.* 2012, Dweck, Jones *et al.* 2012). De plus, le Na^{18}F ne souffre pas de captation intensive par le myocarde et, contrairement aux analyses scanner qui montrent des dépôts macroscopiques, il se lie préférentiellement aux zones de microcalcifications (Irkle, Vesey *et al.* 2015) qui sont un élément clé dans la vulnérabilité des plaques (comme indiqué dans le chapitre précédent). Cependant, il reste à déterminer si l'identification de microcalcifications permet de prédire la possible survenue de complications cardiovasculaires.

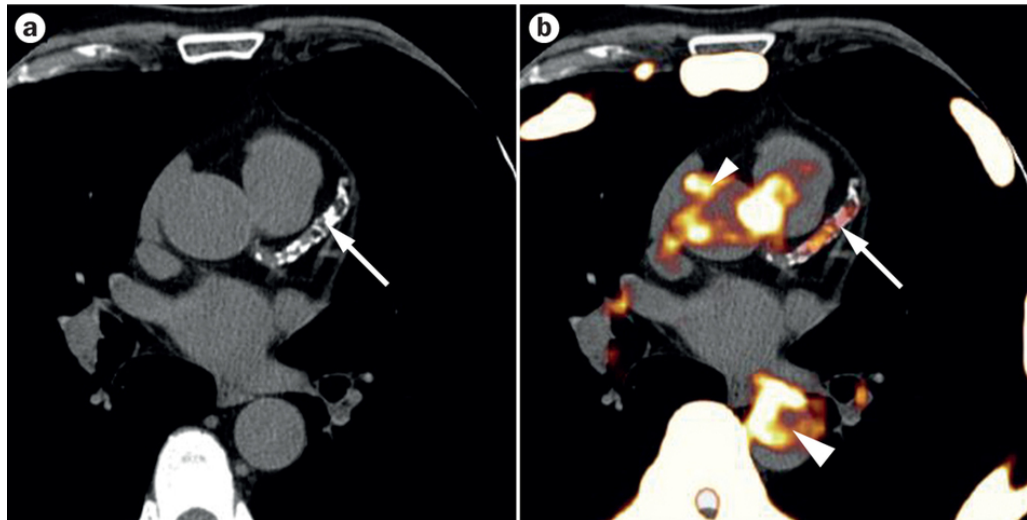


Figure 29. Imagerie d'une artère coronaire de patient. a) image CT montrant une calcification au niveau de l'aorte descendante (flèche blanche) b) fusion TEP/CT montrant une accumulation au niveau de l'aorte ascendante et descendante (flèches blanches) (Tarkin, Joshi *et al.* 2014).

Parmi les nombreux radiotraceurs proposés dans la littérature et utilisés chez l'homme ou ayant fait l'objet d'études cliniques, on peut noter :

- **⁶⁸Ga-DOTA-TATE** permettant la détection de macrophages, surexprimant les récepteurs somatostatine SSTR-2 au stade de la plaque vulnérable, sans captation parasite du myocarde (Mojtahedi, Alavi *et al.* 2015)
- **¹¹C-PK11195** ligand de la TSPO (Translocator Protein) qui co-localise avec un marquage CD68 (phagocytes) et PBR (fonction mitochondriale) au sein de plaques symptomatiques et asymptomatiques (Gaemperli, Shalhoub *et al.* 2012)
- **¹⁸F-fluoromisonidazole** et analogues permettant la détection de l'hypoxie caractéristique du cœur nécrotique (van der Valk, Sluimer *et al.* 2015)
- **⁶⁸Ga-Annexine A5** marqueur de l'apoptose très présente au sein des plaques d'athérome (Kietselaer, Reutelingsperger *et al.* 2004)

Par la diversité des radiotraceurs et la multitude de cibles moléculaires, l'imagerie nucléaire prend de plus en plus de place dans le diagnostic de l'athérosclérose. Dans ce travail de thèse, un nouveau radiotracer TEP ayant pour cible la Lp-PLA₂ a été développé.

4) Phospholipase A₂ associée aux lipoprotéines (Lp-PLA₂)

Les phospholipases sont l'une des premières classes d'enzymes dont l'activité a été étudiée et la superfamille des phospholipases A₂ a quant à elle été identifiée pour la première fois dans du venin de serpents au XIX^{ème} siècle (Dennis, Cao *et al.* 2011).

Type	Groupe	Sous-groupe	Poids moléculaire (kDa)	Résidus catalytiques
sPLA₂	GI	A, B	13-15	His/Asp
	GII	A, B, C, D, E, F	13-17	
	GIII		15-18	
	GV		14	
	GIX		14	
	GX		14	
	GXI	A, B	12-13	
	GXII	A, B	19	
	GXIII		<10	
	GXIV		13-19	
cPLA₂	GIV	A(α), B(β), C(γ), D(δ), E(ϵ), F(ζ)	60-114	Ser/Asp
iPLA₂	GVI	A(β), B(γ), C(δ), D(ϵ), E(ζ), F(η)	84-90	Ser/Asp
PAF-AH	GVII	A (Lp-PLA ₂), B (PAF-AH II)	40-45	Ser/His/Asp
	GVIII	A(α_1), B(α_2), β	26-40	
LPLA₂	GXV		45	Ser/His/Asp
AdPLA	GXVI		18	His/Cys

Tableau 6. Superfamille des phospholipases A₂ (Dennis, Cao *et al.* 2011).

L'un des changements majeurs dans ces découvertes a été celui des chercheurs Seilhamer et Kramer qui séparément, en 1988, annoncent la purification, le séquençage et le clonage de la première PLA₂ sécrétée humaine non pancréatique qui seront dorénavant appelées sPLA₂ (pour « secreted PLA₂ ») (Seilhamer, Pruzanski *et al.* 1989) (Kramer, Hession *et al.* 1989). Le groupe des PLA₂ cytosoliques (cPLA₂) sera découvert par la suite en 1991 (Sharp, White *et al.* 1991). Les PLA₂ seront alors classées en groupes et sous-groupes dont le système de numérotation repose sur la désignation des venins dans lesquels les PLA₂ avaient été auparavant découvertes (Dennis 1994) (**Tableau 6**).

C'est en 1995 que la PAF-AH humaine (pour Platelet Activating Factor AcetylHydrolase) sera clonée (Tjoelker, Wilder *et al.* 1995) ; cette enzyme plasmatique dont la fonction est l'hydrolyse des lipides oxydés sera appelée Lp-PLA₂. Dans cette partie, nous définirons les caractéristiques de la Lp-PLA₂ ainsi que son rôle dans l'athérosclérose. Enfin nous aborderons les stratégies mises en œuvre pour contrecarrer ses effets pro-oxydants et dans quelle mesure elle pourrait être une cible de choix pour l'imagerie de la plaque d'athérome vulnérable.

4.1 Biochimie, propriétés structurales et fonctionnelles

La Lp-PLA₂ (ou PAF-AH) est une protéine sécrétée indépendante de Ca²⁺ de 45 KDa appartenant à la superfamille des lipases à sérine qui circule dans le plasma sous sa forme active (Karabina and Ninio 2015). Cette enzyme est capable d'hydrolyser de manière efficace la chaîne *sn*-2 du PAF mais possède une activité restreinte sur les membranes de phospholipides naturellement présents dans les membranes cellulaires (McIntyre, Prescott *et al.* 2009). Cette protéine plasmatique a donc la faculté d'hydrolyser les résidus acétyles du PAF mais également la chaîne *sn*-2 de phospholipides oxydés produits lors de l'oxydation des LDL dans la formation de plaques d'athérome (**Schéma 4**) (Marathe, Prescott *et al.* 2001).

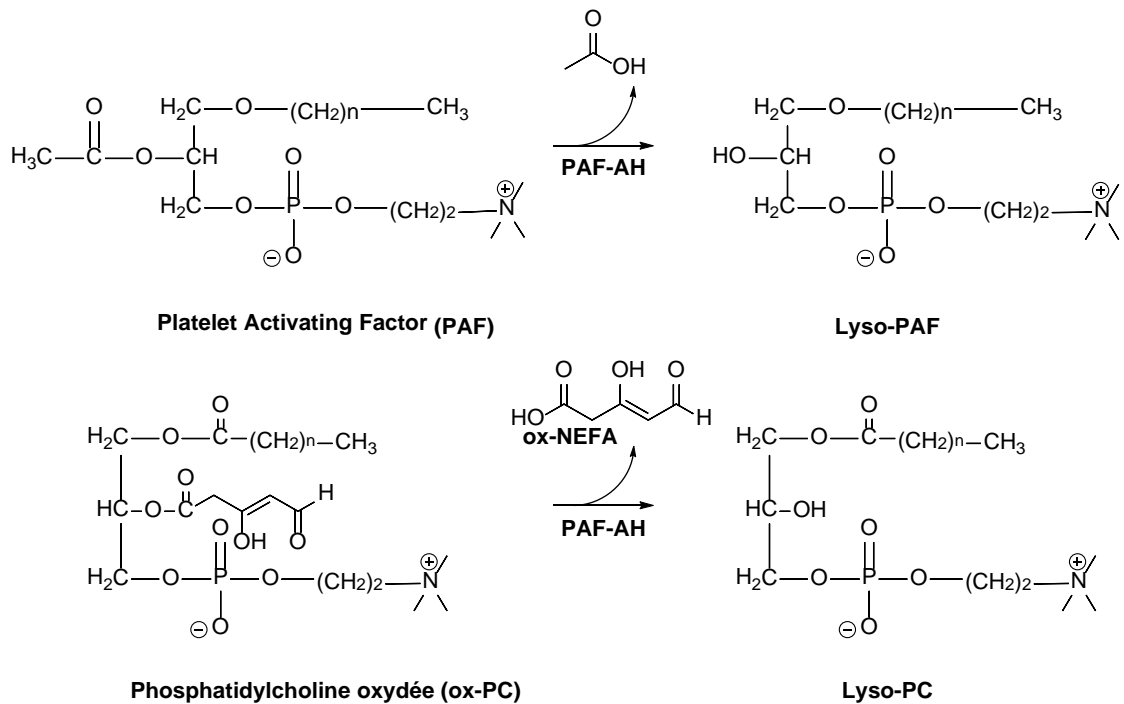


Schéma 4. Dégradation du PAF en Lyso-PAF et de la ox-PC en Lyso-PC par la PAF-AH. NEFA : Non Esterified Fatty Acids.

Le PAF (1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) est un phospholipide messenger synthétisé par de nombreuses cellules de l'organisme notamment les cellules sanguines et vasculaires telles que les cellules endothéliales, plaquettes, neutrophiles, monocytes et macrophages (Prescott, Zimmerman *et al.* 1990). Des niveaux élevés de PAF étant néfastes et responsables de nombreuses pathologies chez l'homme, la Lp-PLA₂ a été identifiée comme inactivatrice du PAF.



Figure 30 Structure de la Lp-PLA₂ avec en vert les feuillet β , en violet les hélices et en gris les boucles. Les domaines de liaison sont orientés vers le bas (Samanta and Bahnsen 2008).

La structure cristalline de la Lp-PLA₂ a démontré qu'elle possédait un repliement α - β hydrolase et contenait une unité catalytique formée par 3 acides aminés (Ser₂₇₆, His₃₅₁ et Asp₂₉₆) (Samanta and Bahnson 2008) (**Figure 30**).

Une propriété importante de la Lp-PLA₂ est son association aux lipoprotéines, incluant HDL et LDL, et dans une moindre mesure à la Lp(a) (Stafforini 2009). Dans le plasma humain, elle circule à 70-80% liée aux LDL et à 20-30% liée aux HDL. Une étude a par ailleurs montré qu'elle avait une préférence d'association avec les fractions de LDL les plus denses et les plus électronégatives (Gaubatz, Gillard *et al.* 2007). De plus, la Lp-PLA₂ étant capable de migrer entre les différentes lipoprotéines, il a été montré que sa distribution au sein des lipoprotéines serait éventuellement révélatrice de ses fonctions physiopathologiques chez l'homme (Gardner, Reichert *et al.* 2008). Par exemple, le groupe de Tsimihodimos *et al.* a décrit des distributions modifiées d'activité Lp-PLA₂ sur des HDL et LDL corrélées avec la sévérité de l'hypercholestérolémie. Dans certains cas, on peut même observer une élévation du niveau de Lp-PLA₂ associée aux VLDL riches en triglycérides et aux IDL (Tsimihodimos, Kakafika *et al.* 2003)

De nombreuses cellules inflammatoires impliquées dans l'athérosclérose sécrètent la Lp-PLA₂. On peut citer les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les mastocytes activés et les plaquettes activées (Tselepis and John Chapman 2002). Comme présenté auparavant, les monocytes et macrophages sont des acteurs clés de l'initiation et de la formation des plaques athérosclérotiques et la modulation de l'expression de Lp-PLA₂ par ces cellules serait liée à la vulnérabilité de la plaque.

4.4 Rôle de la Lp-PLA₂ dans l'athérosclérose et son intérêt en imagerie nucléaire

L'expression et la sécrétion exacerbée de la Lp-PLA₂ par les monocytes humains différenciés en macrophages sont des facteurs déterminants de la formation de lésions d'athérosclérose. Ainsi, la Lp-PLA₂ est considérée comme une enzyme clef dont le rôle dans la pathologie est très controversé.

Initialement, la Lp-PLA₂ était décrite comme ayant un rôle anti-inflammatoire notamment en inhibant l'inflammation dans les œdèmes (Tjoelker, Wilder *et al.* 1995).

Cependant, dans les modèles murins ou lapins, la majorité de la Lp-PLA₂ est associée aux HDL et même dans des modèles de cochons où la cholestérolémie est sensiblement la même que chez l'homme (De Keyzer, Karabina *et al.* 2009). Ainsi, une étude sur des souris ApoE^{-/-} (modèles d'athérosclérose) a montré, qu'avec une activité augmentée en Lp-PLA₂ (par transfert génique), une diminution du recrutement de macrophages ainsi que de l'accumulation de LDLox dans les vaisseaux pathologiques était observée due aux propriétés athéroprotectrices des HDL qui lient la Lp-PLA₂ dans ces modèles (Theilmeier, De Geest *et al.* 2000). Puisque chez l'homme, la Lp-PLA₂ est principalement associée aux LDL, les résultats issus de modèles animaux sont difficilement transposables. Comme indiqué précédemment, en inactivant le PAF et en hydrolysant les LDLox, elle agit en tant qu'enzyme anti-athérogène. Cependant, les produits formés lors de l'hydrolyse des LDLox tels que lyso-PC et ox-NEFA (composés pro-inflammatoires et pro-apoptotiques) sont des médiateurs caractéristiques du développement du cœur nécrotico-lipidique (**Figure 31**).

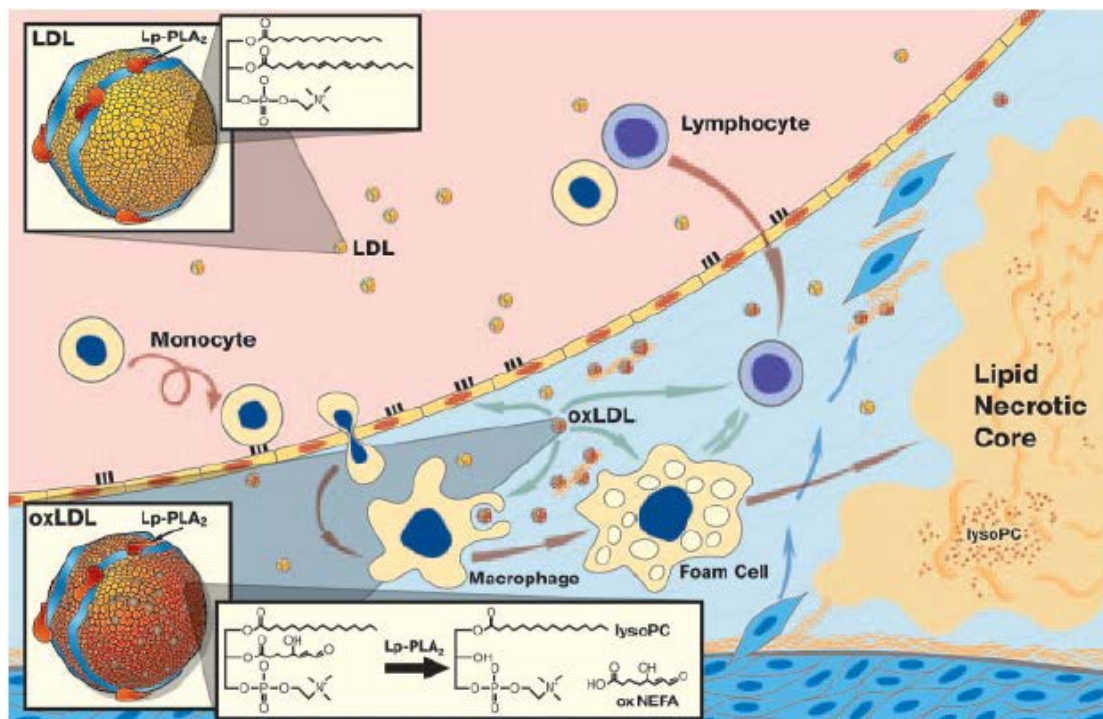


Figure 31. Rôle pro-athérogène de la Lp-PLA₂ dans l'athérosclérose par formation de lyso-PC et ox-NEFA (acides gras non estérifiés oxydés) (Zalewski and Macphee 2005).

En effet, il a été montré que la lyso-PC augmentait la perméabilité de la monocouche endothéliale de cellules qui par conséquent entraînerait une probable arrivée facilitée de LDL et monocytes (Yan, Chai *et al.* 2005). De plus, une étude chez le lapin a montré qu'un régime

supplémenté en acides gras non estérifiés oxydés augmentait la taille des lésions athérosclérotiques de 100% (Staprans, Pan *et al.* 2005).

La Lp-PLA₂ et plus particulièrement son taux plasmatique est un possible biomarqueur utile dans le diagnostic de l'athérosclérose. Bien que son rôle biologique dans l'athérogenèse soit encore débattu, les propriétés pro-athérogènes de la Lp-PLA₂ semblent l'emporter au cours de l'athérosclérose. Les études épidémiologiques ont montré que l'expression de la Lp-PLA₂ était élevée et corrélée dans des analyses *in vitro* et chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires (Rosenson and Hurt-Camejo 2012). Ces études ont permis de soulever l'éventualité d'un rôle prédominant pro-inflammatoire de l'enzyme dans l'athérogenèse. En générant des produits d'oxydation avancés, les chercheurs ont conclu qu'une inhibition de l'activité enzymatique de la Lp-PLA₂ pourrait être bénéfique pour la prévention et/ou le traitement de l'athérosclérose et de ses complications (Rosenson and Stafforini 2012). Il a été montré que les produits d'oxydation formés par la Lp-PLA₂ (lyso-PC) étaient capables d'augmenter la perméabilité membranaire (Lee, Birukov *et al.* 2012). Inhiber la Lp-PLA₂ permettrait de contrecarrer ces effets sur les cellules endothéliales et de diminuer notamment l'infiltration de LDL et de macrophages au sein de la plaque. Ainsi, l'inhibition de la Lp-PLA₂ est devenue un objectif thérapeutique majeur à la fin des années 2000 (**Figure 32**).

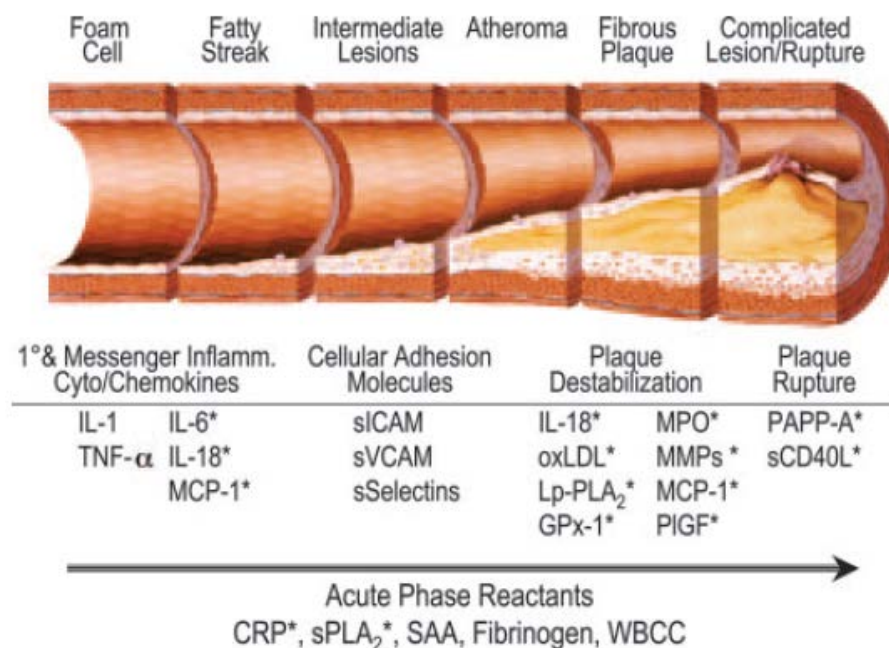


Figure 32. Biomarqueurs produits lors de l'athérogenèse (Koenig and Khuseyinova 2007).

De nombreux groupes comme GSK ont développé des inhibiteurs de la Lp-PLA₂ particulièrement sélectifs. Une partie de ce manuscrit sera consacrée à la découverte ainsi qu'au développement de ces inhibiteurs et notamment le Darapladib.

Dans ce travail de thèse, nous avons décidé de cibler la Lp-PLA₂ en imagerie médicale en utilisant le Darapladib. En effet, elle est majoritairement transportée par les lipoprotéines au sein de l'organisme (LDL pour l'homme et HDL pour la souris) et produite en grande partie par les monocytes/macrophages. L'athérogenèse se caractérise par une accumulation progressive de LDL et LDLox accompagnée du recrutement massif de monocytes/macrophages qui sont chargés de prendre en charge et d'éliminer ces LDLox. Ainsi, le Darapladib, qui est un inhibiteur sélectif de la Lp-PLA₂ n'en reste pas moins un excellent ligand de cette enzyme, qui permettrait de visualiser une accumulation de LDL mais également de macrophages au sein des plaques. Le Darapladib serait alors un radiotraceur de choix dans l'imagerie de l'athérosclérose en ciblant la Lp-PLA₂ produite à un moment clé du développement de la pathologie (quand la plaque est dite vulnérable, voir **Figure 33**).

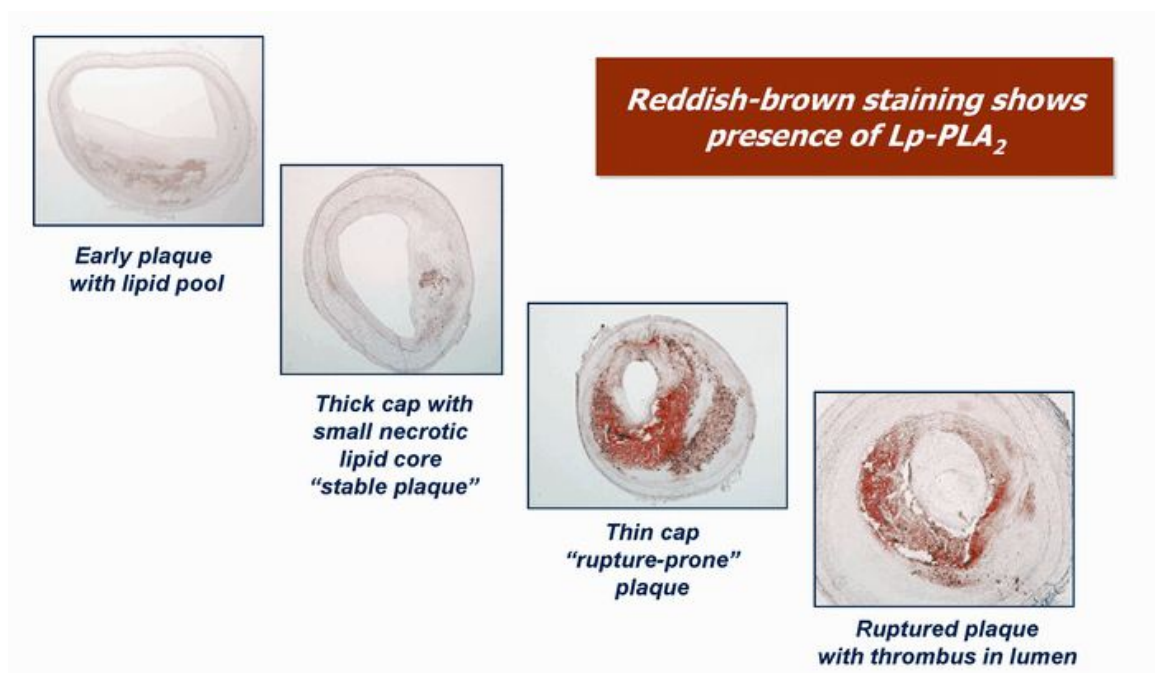


Figure 33. Clichés immunohistologiques montrant la présence de Lp-PLA₂ au sein de plaques coronariennes humaines (adapté de Kolodgie, Burke *et al.* 2006).

Chapitre II : Étude du Darapladib

1) Introduction

Comme discuté précédemment, les propriétés pro et anti-athérogènes de la Lp-PLA₂ sont sources de débats et divisent la communauté scientifique (Marathe, Pandit *et al.* 2014). La communauté scientifique a conclu au rôle pro-athérogène de la Lp-PLA₂ (Koenig, Twardella *et al.* 2006), ainsi, développer des inhibiteurs de cette enzyme est devenu une possible solution thérapeutique au développement des plaques d'athérome.

La première étude réalisée par GSK a permis de mettre en exergue le lien entre l'inhibition de la Lp-PLA₂ et le développement de l'athérosclérose (Macphee, Moores *et al.* 1999) montrant l'utilité de développer de telles molécules.

Il a été montré par exemple que chez le cochon, l'inhibition sélective de la Lp-PLA₂ avec le Darapladib réduisait le développement de l'athérosclérose par des mécanismes de diminution du recrutement de monocytes/macrophages, de l'expression de gènes pro-inflammatoires et du découplage de l'effet de l'hypercholestérolémie sur l'inflammation (Wilensky, Shi *et al.* 2008).

Dans cette partie, une revue de la littérature sera consacrée à la recherche autour des inhibiteurs de la Lp-PLA₂ et à la synthèse du Darapladib qui est le plus puissant inhibiteur développé à l'heure actuelle. Nous nous intéresserons ensuite à sa synthèse en nous appuyant sur les données de la littérature et principalement les travaux du groupe pharmaceutique GSK qui sont les pionniers en ce qui concerne l'inhibition de la Lp-PLA₂.

Le Darapladib a été développé par GSK dans une optique de thérapie afin de réduire l'incidence des complications associées aux maladies cardiovasculaires. Dans ces travaux, nous utilisons l'excellente affinité du Darapladib pour la Lp-PLA₂ afin de synthétiser un radiotracer pouvant être utilisé en imagerie TEP de l'athérosclérose. Il est ici important de souligner la nécessité de synthétiser le Darapladib représentant la référence froide (¹⁹F) dans notre étude. Son étude en HPLC (High Performance Liquid Chromatography) permettra le développement de méthodes de purification du ¹⁸F-Darapladib mais également de contrôle qualité après radiomarquage par co-injection des deux composés.

2) Revue bibliographique

2.1 Historique

Les lipases à sérine sont connues pour être inhibées par des β -lactones (Hadvary, Lengsfeld *et al.* 1988) (**Schéma 5**).

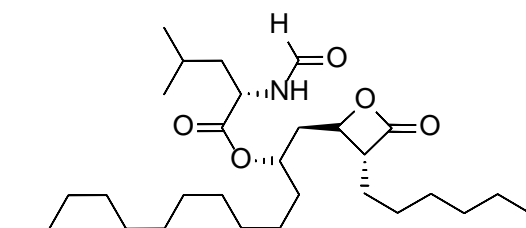


Schéma 5. Inhibiteur de lipases à sérine Tetrahydrolipstatin ou Orlistat.

Cependant, l'analogie avec les composés β -lactames n'avait pas été réalisée. Le groupe de Tew *et al.* a synthétisé 2 inhibiteurs (**Schéma 6**) de la Lp-PLA₂ sur la base de la structure de l'Orlistat et a montré qu'ils possédaient des K_i très modérés (>60 μ M) mais qu'ils seraient un excellent point de départ aux recherches concernant l'inhibition de la Lp-PLA₂ (Tew, Boyd *et al.* 1998).

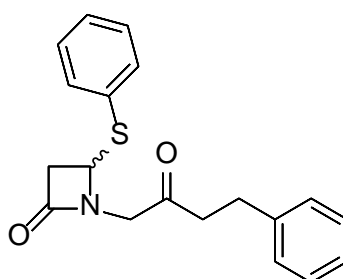


Schéma 6. Structure de la forme racémique de **SB-216477**.

Le groupe de Macphee *et al.* a légèrement modifié la structure pour arriver à des composés de types azétidinones possédant une bonne inhibition ($IC_{50} < 1000$ nM) mais dont les propriétés anti-oxydantes et anti-athérosclérotiques *in vivo* n'étaient pas suffisantes (Macphee, Moores *et al.* 1999) (**Schéma 7**).

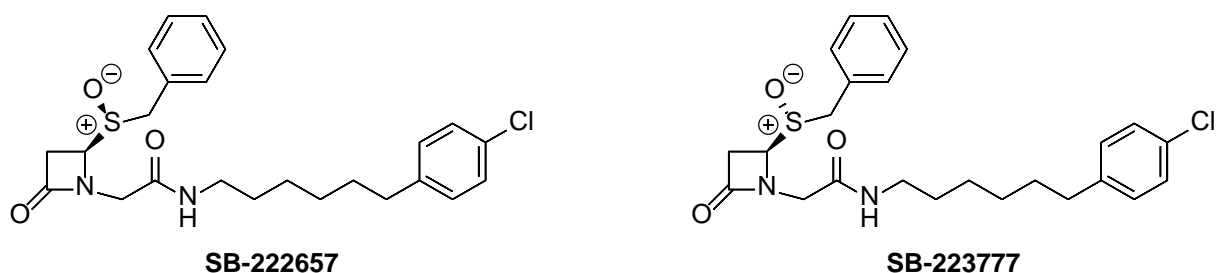


Schéma 7. Structure des diastéréoisomères **SB-222657** et **SB-223777**.

C'est entre les années 2000 et 2001 que GSK développe ses premiers inhibiteurs possédant une structure clé de type pyrimidinone. Les travaux notamment de Boyd *et al.* (Boyd, Flynn *et al.* 2000) ont permis de cibler deux composés analogues présentant les meilleures inhibitions et surtout dont l'action réversible envers la Lp-PLA₂ ont permis de poursuivre *in vivo* dans des modèles précliniques (**Schéma 8**).

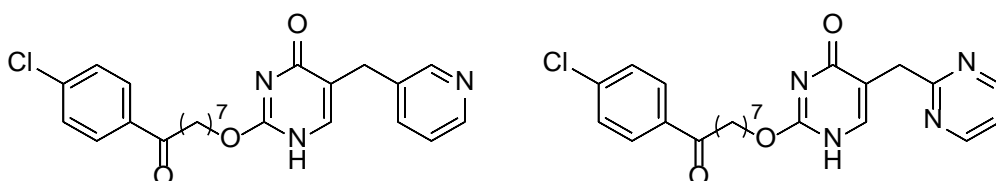


Schéma 8. Structure de deux inhibiteurs au noyau pyrimidinone à forte inhibition PAF-AH (<100nM).

C'est enfin en 2003, après plusieurs optimisations des substituants du noyau pyrimidinone, que GSK publie la découverte ainsi que la synthèse du Darapladib ou SB-480848 (**Schéma 9**) (Blackie, Bloomer *et al.* 2003).

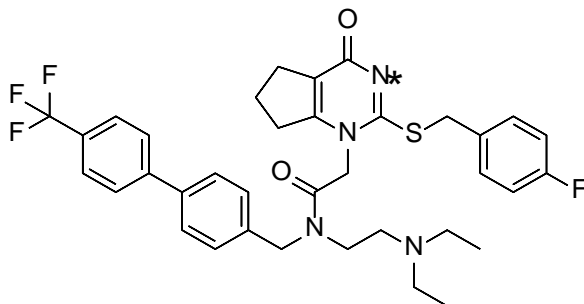


Schéma 9. Structure du Darapladib ou SB-480848 (IC₅₀ < 0.1 nM).

2.2 Études précliniques et cliniques

Le Darapladib a alors été engagé dans des études précliniques afin de tester sa stabilité et son métabolisme avec un marquage au ^{14}C (sur l'atome étoilé cf **Schéma 9**). Ces études effectuées chez le rat et le chien ont montré que seulement 4% de la dose (IV ou orale) était retrouvée dans la bile et les urines. La majorité du composé se retrouvait sous sa forme non absorbée dans les fèces (Dave, Nash *et al.* 2014). Des résultats similaires ont été par la suite obtenus dans une étude de 7 sujets sains où les profils de biodistribution ont été étudiés après prélèvements de plasmas, d'urines et de fèces (Dave, Nash *et al.* 2014). Le Darapladib est alors engagé dans des études cliniques.

La première se nomme STABILITY (STabilization of Atherosclerotic plaque By Initiation of darapLadIb TherapY) et compare le Darapladib à un placebo chez des patients atteints de maladie coronarienne. C'est la première étude clinique de phase III qui teste l'hypothèse qu'une inhibition directe de la Lp-PLA₂ pourrait réduire la mortalité cardiovasculaire, les infarctus du myocarde ou les AVC chez ces patients (**Figure 30**) (White, Held *et al.* 2010).

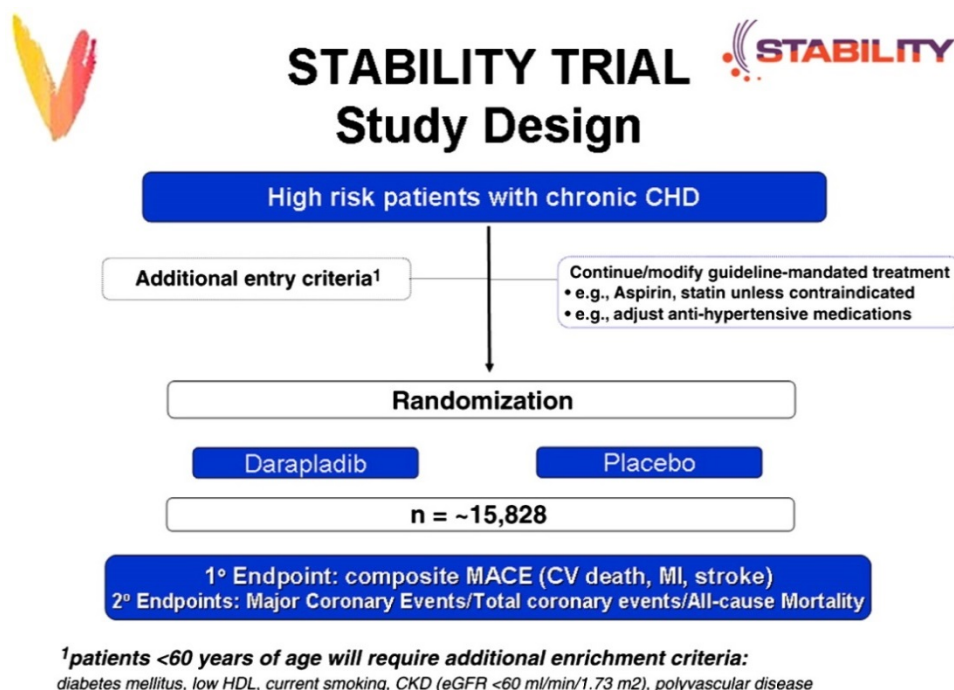


Figure 34. STABILITY (STabilization of Atherosclerotic plaque By Initiation of darapLadIb TherapY) study design. CHD, Pathologie chronique cardiaque; MACE, Évènements cardiovasculaires majeurs; CV, Cardiovasculaire; MI, Infarctus du myocarde; CKD, Néphropathie chronique ; eGFR, Filtration glomérulaire estimée (White, Held *et al.* 2010).

Dans cette étude randomisée, avec un nombre important de sujets (n= 15 800) impliquant des patients suivis pendant 3,7 années, le Darapladib n'a pas permis de réduire significativement la survenue d'évènements cardiovasculaires majeurs définis comme la mort cardiovasculaire, l'infarctus du myocarde et AVC (critères de jugement principaux) bien qu'une réduction significative des critères de jugement secondaires (évènements coronariens majeurs, mortalité toutes causes confondues) ait été observée signalant un possible effet de la thérapie (**Figure 31**) (Investigators, White *et al.* 2014). Il est important de noter que 96% des patients traités recevaient des statines qui sont des hypolipémiants connus pour réduire les niveaux de Lp-PLA₂ à hauteur de 35% (O'Donoghue, Morrow *et al.* 2006). Il est alors difficile d'imputer la négativité des résultats à un manque d'efficacité de la thérapie.

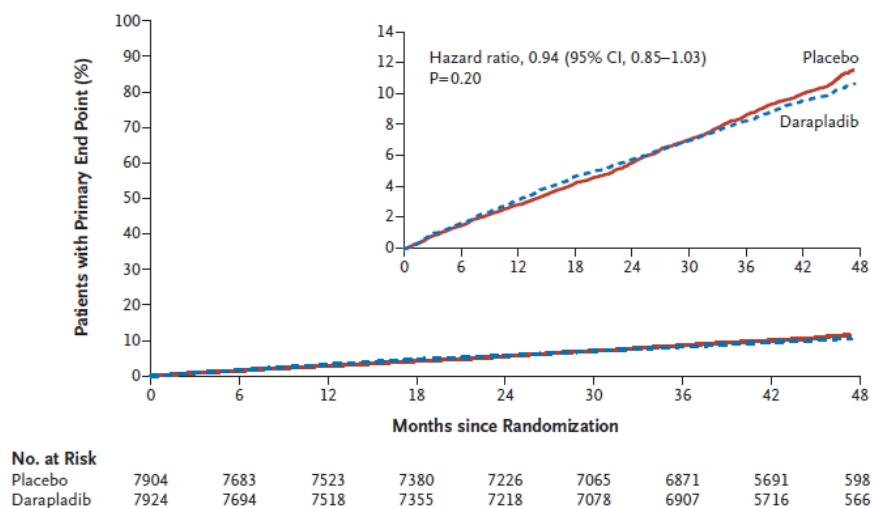


Figure 35. Courbes de Kaplan-Meier concernant les critères de jugement de type IM et AVC (Investigators, White *et al.* 2014).

La seconde étude, visant à tester le Darapladib chez l'homme, se nomme SOLID-TIMI 52 (Stabilization of Plaque Using Darapladib-Thrombolysis in Myocardial Infarction 52). Cette étude clinique de phase III a impliqué 13 026 patients stabilisés après des syndromes coronariens aigus et consistant en la prise randomisée de Darapladib ou de placebo (**Figure 36**) (O'Donoghue, Braunwald *et al.* 2014).

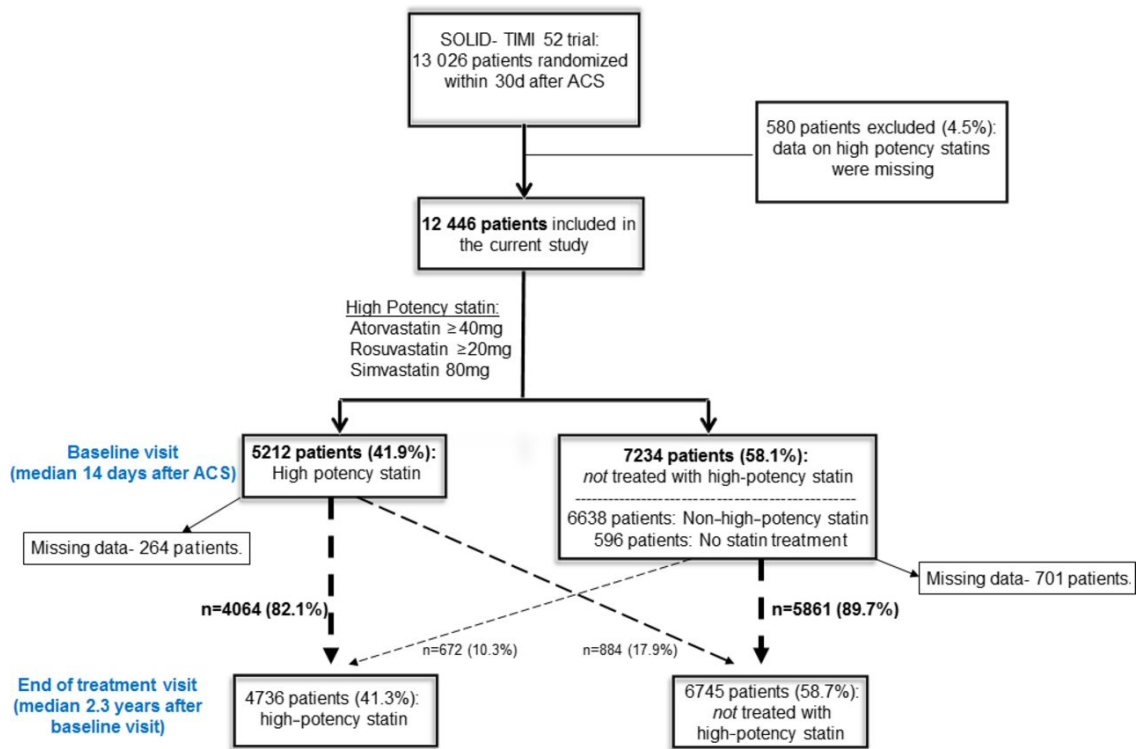


Figure 36. Étude SOLID-TIMI 52. ACS, syndrome coronarien aigu (Acute Coronary Syndrome) (Eisen, Cannon *et al.* 2017).

Après un suivi de 2,5 années, la prise de Darapladib par ces patients n'a pas permis de réduire la survenue d'évènements coronariens majeurs (**Figure 37**).

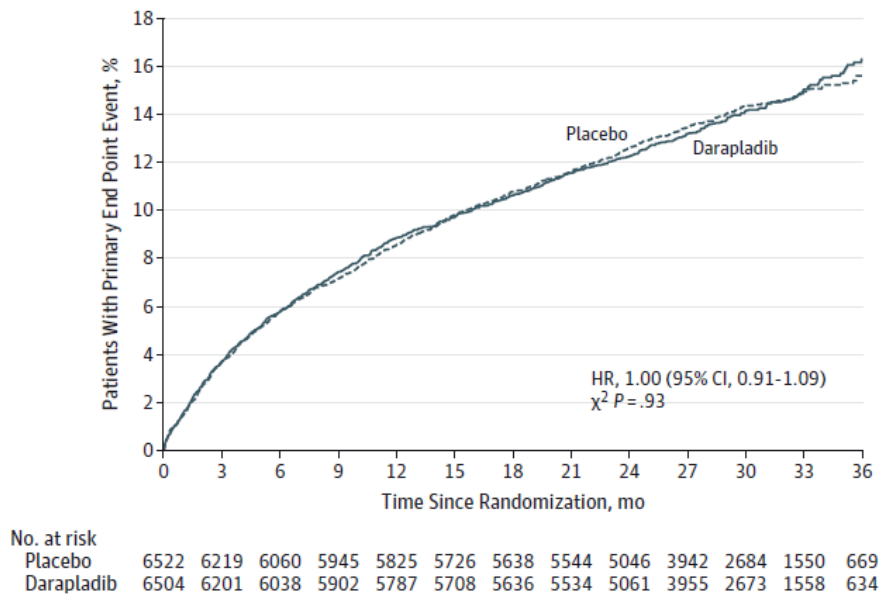


Figure 37. Courbes d'incidence cumulée de l'étude SOLID-TIMI 52 (O'Donoghue, Braunwald *et al.* 2014).

Le Darapladib est alors abandonné après le double échec en phase III. Cependant, le Darapladib possède une structure bien spécifique dont plusieurs bénéfices peuvent être tirés. Le Dr. Emmanuelle Jestin a émis l'hypothèse qu'en utilisant l'excellente affinité du Darapladib pour la Lp-PLA₂, il nous est possible de détourner l'utilisation thérapeutique de ce médicament vers un usage diagnostic. En effet, le Darapladib possède plusieurs positions fluorées qui peuvent être marquées par un atome radioactif (¹⁸F). Étant donnée la très forte inhibition du Darapladib envers la Lp-PLA₂, un marquage au ¹⁸F permet de conserver les propriétés physico-chimiques de la molécule tout en disposant d'un radiotracer sélectif. Nous pouvons alors utiliser ce composé en imagerie TEP de l'athérosclérose puisque la Lp-PLA₂ est présente au niveau des plaques d'athérome et que le Darapladib a déjà été étudié chez l'homme (sécurité, biodistribution, voie d'administration). Si une prise orale de Darapladib était plus aisée en thérapeutique, une injection IV de Darapladib marqué est suffisante en imagerie TEP. Cette utilisation a par ailleurs été brevetée par notre équipe accompagnée de l'usage de nombreux autres analogues du Darapladib en imagerie de l'athérosclérose.

Dans un premier temps, il nous a fallu synthétiser le Darapladib afin d'avoir une référence froide (¹⁹F) indispensable pour la suite du projet.

2) Synthèse du Darapladib

2.1 Stratégies de synthèse

Le Darapladib se divise en 4 groupes principaux (**Schéma 10**) :

- Le groupe 1 constitué par un noyau pyrimidone substitué sur l'azote $N1$
- Le groupe 2 formé par un fluorophényle lié au soufre de la thiouracile du groupe 1
- Le groupe 3 impliquant le trifluorométhylbiphényle
- Le groupe 4 représentant l'entité N,N -diéthylènediamine

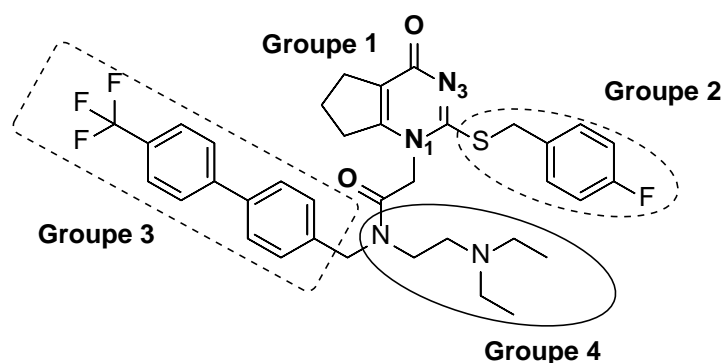


Schéma 10. Groupes constitutifs du Darapladib. Les groupes 1 et 2 sont les principaux acteurs de l'interaction avec la Lp-PLA₂ via la cétone et l'azote $N3$. Le groupe 3 renforce les interactions déjà présentes et le groupe 4 est extérieur à la poche enzyme-substrat.

Les différentes équipes qui se sont attelées à la synthèse du Darapladib et ses analogues ont adopté des approches différentes (**Schéma 11**) :

- une synthèse de type **convergente** permettant la substitution de l'azote $N1$ dans un premier temps puis la cyclisation de la pyrimidinone dans un second temps (Cardwell, Crawford *et al.* 2011, Nagano, Hsu *et al.* 2013, Wang, Xu *et al.* 2013)
- une synthèse de type **divergente** impliquant la synthèse séparée des groupes 1/2 et 3/4 assemblés par couplage peptidique pour former la liaison amide (Mulholland, Ross *et al.* 2007, Wang, Xu *et al.* 2011, Hickey, Ife *et al.* 2016)

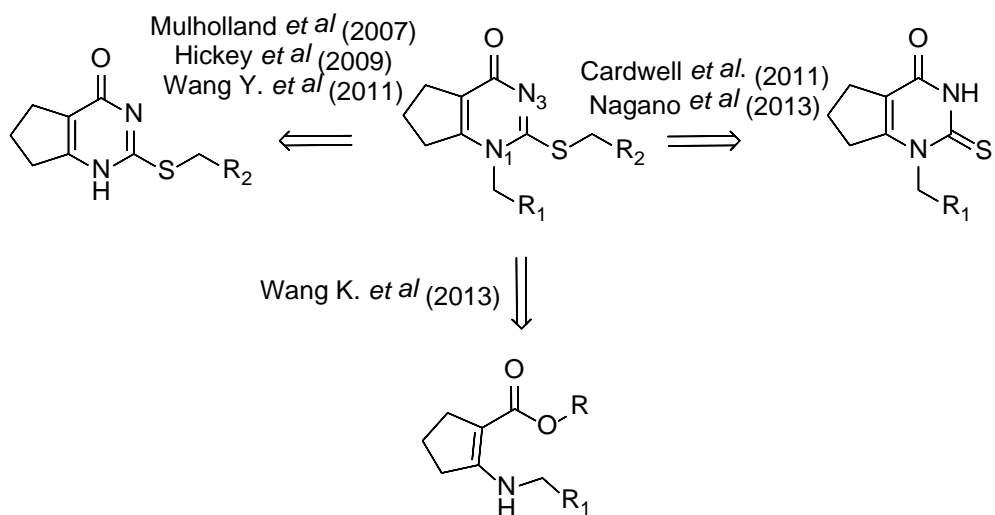


Schéma 11. Différentes approches concernant la synthèse du noyau pyrimidone du Darapladib incluant différentes approches concernant la N1-alkylation.

Dans ce travail de thèse nous avons voulu trouver la meilleure approche permettant d'obtenir le Darapladib et ses précurseurs. La synthèse divergente permet une fonctionnalisation bien plus aisée de la thiouracile et pour cette raison, la synthèse convergente du Darapladib ne sera pas abordée dans ce manuscrit. Le Darapladib peut être divisé en 2 fragments principaux : fragment du haut (A) et du bas (B) (**Schéma 12**).

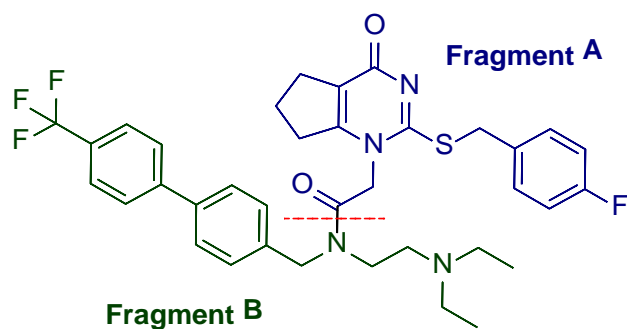


Schéma 12. Fragments A et B dans la stratégie divergente choisie pour la synthèse totale du Darapladib.

2.2 Synthèse du fragment A

2.2.1 Méthode de Cardwell

Afin d'accéder au fragment A, nous nous sommes tout d'abord reposés sur les résultats de Cardwell *et al.* (Cardwell, Crawford *et al.* 2011). Cette méthode permet d'alkyler la thiouracile sur la position *N1* avant d'effectuer la substitution sur le soufre (**Schéma 13**).

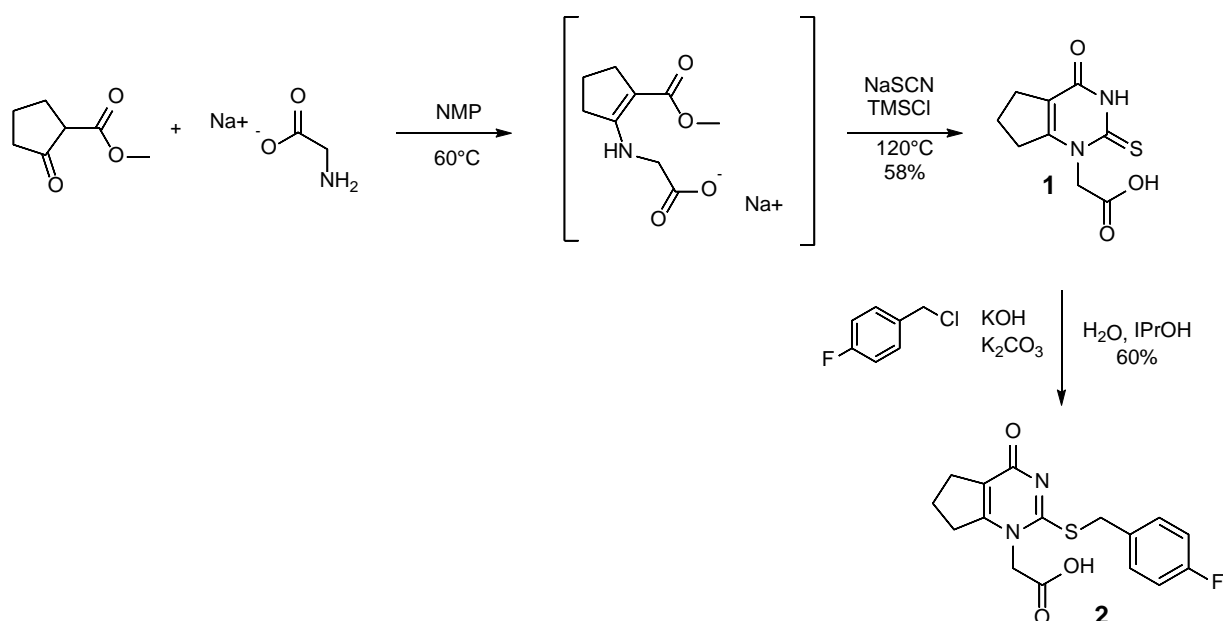
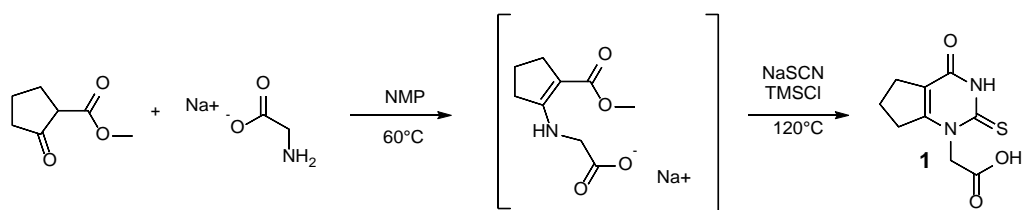


Schéma 13. Synthèse du fragment A via la méthode de Cardwell *et al.* (Cardwell, Crawford *et al.* 2011).

La première étape nécessite la condensation du sel de glycine sur le méthyl-2-cyclopentanecarboxylate. L'énamine formée n'est pas isolée et est engagée dans une étape de cyclisation avec le thiocyanate de sodium pour accéder à l'acide **1**. Ce dernier est obtenu par précipitation depuis le milieu réactionnel dans l'eau. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 7**.



Entrée	Solvant de précipitation	Rendement
1	H ₂ O	58%
2	H ₂ O	35%
3	H ₂ O	34%
4	H ₂ O	53%
5	H ₂ O	22%
6	H ₂ O puis DCM	13%
7	H ₂ O puis DCM	/

Tableau 7. Formation du composé **1**.

Un des points importants à soulever est la très grande variabilité des rendements. En effet, comme montré par Nagano *et al.* (Nagano, Hsu *et al.* 2013), qui n'ont obtenu qu'un rendement faible de 10%, cette première étape présente des limites de reproductibilité. En ce qui concerne l'entrée **6**, le produit d'intérêt n'a pas précipité après ajout d'eau et une tentative d'extraction au DCM a permis de faire précipiter, en partie, le composé souhaité. L'entrée **7** montre que ni l'eau ni le DCM n'ont fait précipiter la molécule **1**, ce qui ne nous permettait pas de l'obtenir avec une pureté suffisante pour la suite de la synthèse. En effet, par sa grande polarité et sa très faible solubilité dans les solvants d'extraction, il ne nous a pas été possible de trouver une méthode efficace de purification (CCM préparative, HPLC, colonne chromatographique). La seconde étape repose sur l'alkylation du soufre de la thiouracile. Après formation du carboxylate issu du composé **1** (KOH), la réaction est effectuée dans un mélange H₂O/iPrOH. Après substitution du soufre par le chlorure de fluorobenzyle, le milieu est ré-acidifié avec de l'acide formique permettant de faire précipiter le produit d'intérêt **2**

insoluble dans le solvant de réaction. Cependant, cette étape présente également une très faible reproductibilité. En effet, le composé **2** est très polaire (non purifiable sur SiO₂ phase normale) et soluble uniquement dans le DMSO et en partie dans le MeOH. Sur 10 tentatives, l'acide **2** attendu n'aura précipité que 4 fois à l'ajout d'acide formique nous permettant d'accéder au composé **2** d'intérêt avec des rendements allant de 5 à 60%. Une solution proposée et testée consiste en l'extraction du carboxylate formé avec H₂O que l'on fait re-précipiter en acide carboxylique par ré-acidification (HCl 1N) de la phase aqueuse. Cependant, sur 4 extractions, le produit se retrouve dans les deux phases et de manière plus générale ne présente pas la pureté nécessaire pour continuer la synthèse par rapport à la méthode de précipitation précédente. En définitive, suffisamment de composé **2** aura été obtenu pour continuer la synthèse mais au vu des faibles rendements et de la non reproductibilité des différentes étapes, une autre voie de synthèse a été alors envisagée.

2.2.2 Méthode de Hickey

Une seconde méthode abordée dans ce manuscrit s'est inspirée des travaux de Hickey *et al.* (Hickey, Ife *et al.* 2016). Cette stratégie s'oppose à celle présentée précédemment dans la mesure où la cyclisation formant le noyau pyrimidone se fait sans alkylation sur l'azote *N1*. Le soufre est d'abord substitué puis une alkylation sera réalisée sur l'azote (**Schéma 14**).

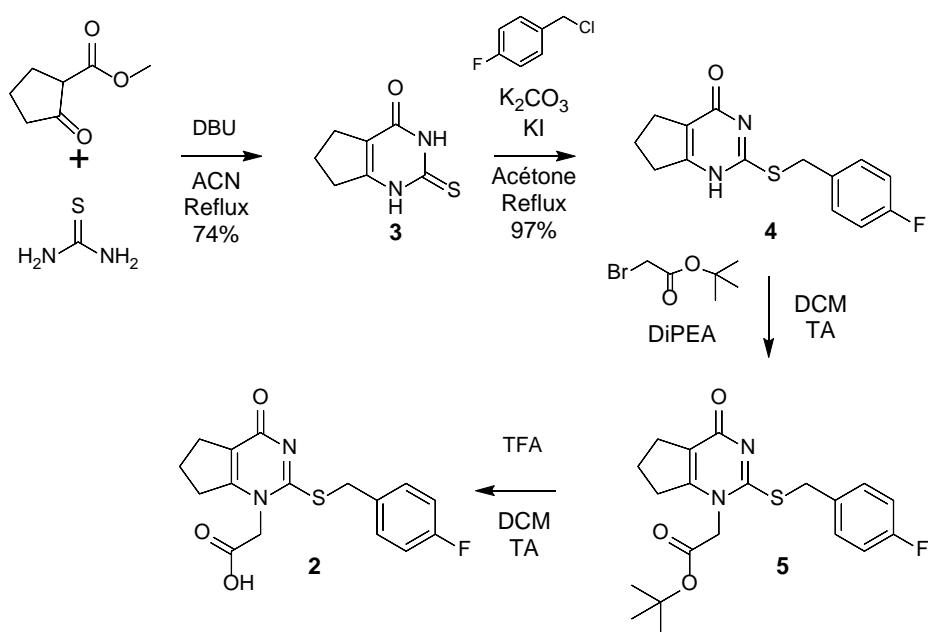
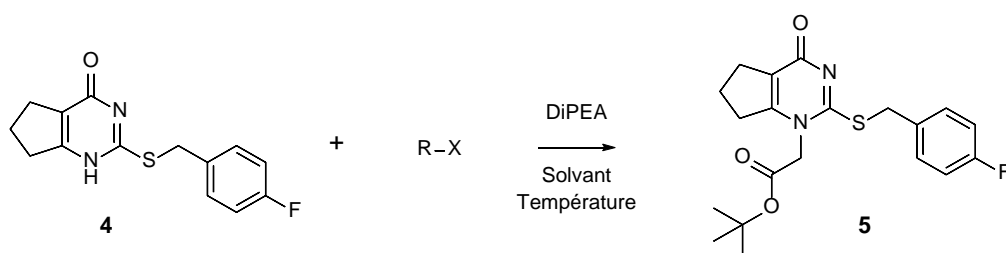


Schéma 14. Synthèse du fragment A via la méthode de Hickey *et al.*

Dans un premier temps, la double condensation de la thiourée sur le methyl-2-cyclopentanecarboxylate permet l'obtention du bicyclic pyrimidone **3** avec des rendements allant de 58 à 74% (n = 7). Dans un second temps, l'alkylation du soufre par le 4-fluorobenzylchlorure dans l'acétone a permis l'isolement par précipitation du produit **4** avec d'excellents rendements de 82 à 97% (n = 6). L'alkylation de l'amine **4** pour donner l'ester **5** a, quant à elle, présenté des rendements assez faibles surement dus au manque de sélectivité. Les résultats obtenus sont consignés dans le **Tableau 8**.



Entrée	R-X	Solvant	Température	Rendement
1		DCM	TA	10%
2		DCM	Reflux	25%
3		DCM	Reflux	12%
4		DCE	80°C	14%
5		DCE	80°C	13%

Tableau 8. Alkylation du composé **4** par la méthode de Hickey *et al.*

Une des premières remarques concernant cette alkylation est le faible rendement global. En travaillant dans le DCM à reflux (entrée **2**), nous avons réussi à améliorer le rendement jusqu'à 25%. En travaillant avec le tert-butyl iodoacétate (méthode de Hickey *et al.*) les rendements n'ont pas été améliorés (entrées **3** et **4**) et restent très modérés. De même,

en travaillant à des températures plus élevées (DCE à 80°C, entrées **4** et **5**), les rendements n'ont pas été augmentés et restent faibles (inférieurs à 15%). Ils peuvent être expliqués par la faible sélectivité de la réaction et des conditions réactionnelles choisies pour l'obtention du produit *NI*-alkylé. L'étape suivante d'hydrolyse de l'ester **5** en acide **6** est quant à elle très reproductible et permet la récupération du composé souhaité avec des rendements allant de 90 à 92% (n = 3).

Au vu des soucis de rendement de l'étape de *N*-alkylation, nous avons exploré d'autres conditions réactionnelles. Nous avons notamment étudié les méthodes d'Azad *et al.* (Azad, Jain *et al.* 2015) ainsi que celles de Wang Y. *et al.* (Wang, Xu *et al.* 2011). Les rendements annoncés sont excellents et tous supérieurs à 90% pour tous les exemples proposés. L'étape d'alkylation est réalisée dans le DMF ou l'ACN à des températures comprises entre 75 et 80°C. Via cette méthode, nous avons obtenu un composé avec un rendement de 96%. Cependant, ce produit n'était pas le même ester **5** que celui précédemment isolé. En effet, en CCM, les Rf du nouveau produit et de la molécule **5** étaient respectivement de 0.95 et 0.25 dans un mélange 40/60 Hex/EtOAc. Avant de rentrer dans l'explication de ce résultat, il est important de souligner la réactivité particulière de la thiouracile.

L'entité thiouracile présente dans la structure du Darapladib possède une réactivité face à l'alkylation bien spécifique. En effet, trois sites nucléophiles possibles sont disponibles et entraînent une compétition lors de sa fonctionnalisation (**Schéma 15**). Les différentes formes mésomères permettent de comprendre le degré de complexité concernant la régiosélectivité de son alkylation. Ainsi, les produits formés peuvent être issus de la *O*, *NI* ou *N3*-alkylation.

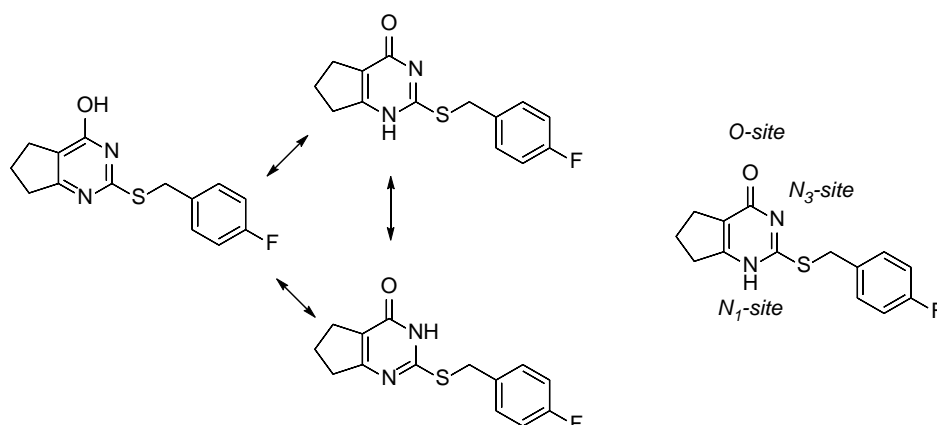


Schéma 15. Formes mésomères de **4** entraînant 3 sites possibles d'alkylation.

Dans notre cas, afin de caractériser les produits isolés issus des différentes voies, nous avons réalisé l'étude RMN des différents composés. La superposition des spectres ^1H et ^{13}C est présentée ci-dessous (**Figure 38**).

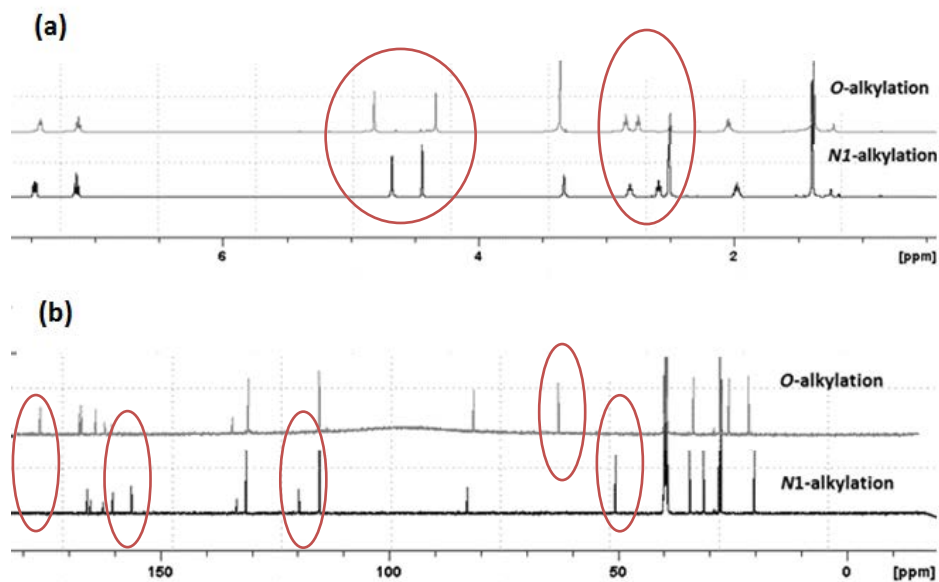


Figure 38. Spectres RMN ^1H (a) et ^{13}C (b) des esters obtenus. Les différences remarquables sont entourées en rouge. Le spectre supérieur provient du composé inconnu, celui inférieur est issu du composé **5**.

En effectuant une purification sur gel de silice minutieuse de l'expérience dans le DCM à reflux, il nous a été permis d'isoler 3 composés qui sont les 3 produits d'alkylation possibles avec des rendements après purification chromatographique de 7, 21 et 27% pour la O, N1 et N3-alkylation respectivement (**Schéma 16**).

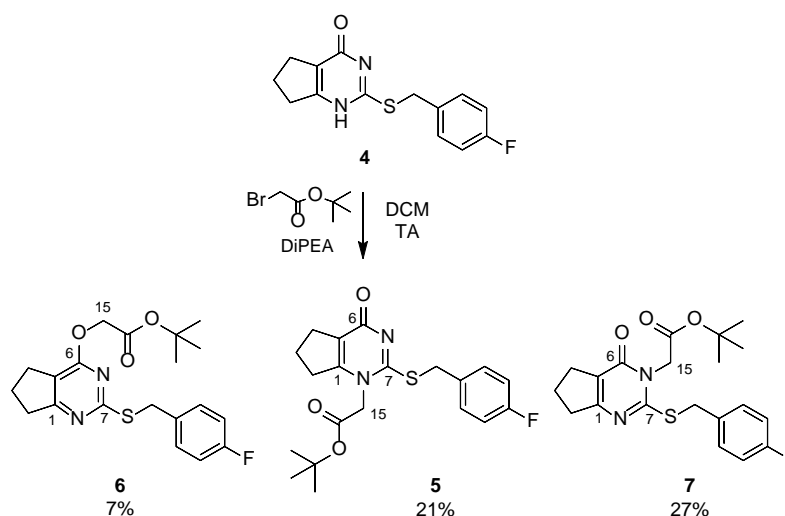
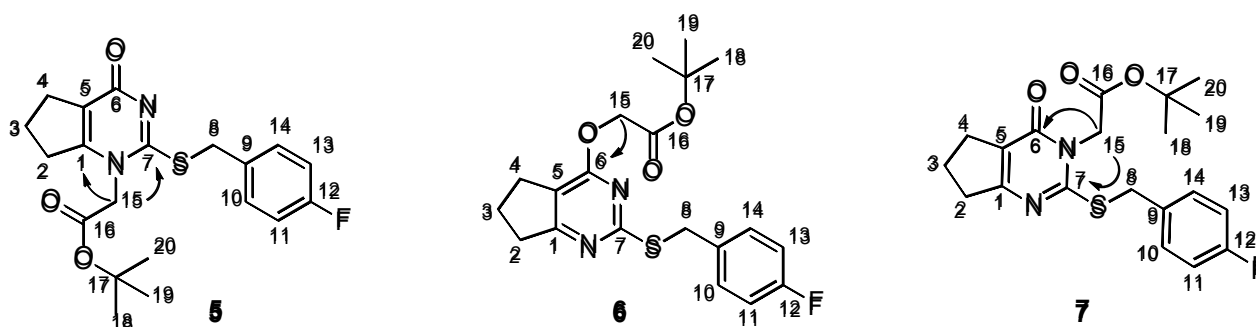


Schéma 16. Produits obtenus lors de l'alkylation de **4** selon Hickey *et al.* Les rendements indiqués sont issus des produits isolés après purification.

Ces analyses ont été complétées avec des expériences 2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Ces séquences permettent la génération de spectres RMN montrant la corrélation entre les protons et les carbones à 2 ou 3 liaisons de distance. Les expériences HMBC nous ont permis d'attribuer sans ambiguïté les 3 isomères **5**, **6**, **7** obtenus par la méthode de Hickey. Le carbonyle en α de l'ester a été attribué dans les isomères à 63 ppm ($O\text{-CH}_2$), 50 ppm ($N\text{I-CH}_2$) et 45 ppm ($N\text{3-CH}_2$) pour **5**, **6** et **7** respectivement. Les hydrogènes H_{15} ont montré des tâches de corrélation dans les spectres HMBC avec C_1 et C_7 pour l'isomère **5**, C_6 pour l'isomère **6** ainsi que C_6 et C_7 pour l'isomère **7** (**Figure 39**, **40**, **41** et **42**).

Ces expériences nous ont également permis de conclure que l'unique composé obtenu dans le DMF à 75 °C était le composé **6**.



Composé	H_{15}	C_1	C_5	C_6	C_7
5	4.51	156.2	119.6	165.2	160.3
6	4.82	176.2	115.1	164.0	167.6
7	4.65	159.0	118.4	159.0	160.6

Figure 39. Déplacements chimiques des signaux d'intérêt ^1H et ^{13}C pour l'attribution des composés **5**, **6** et **7**.

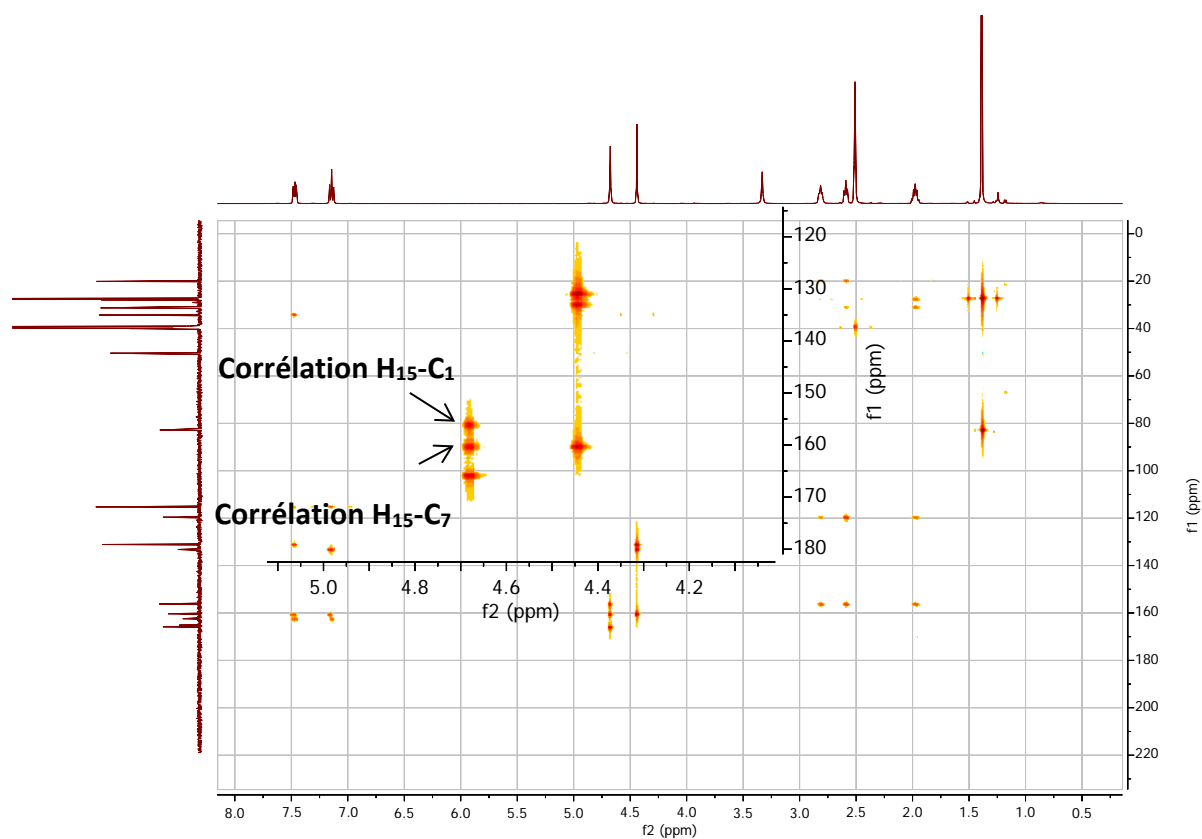


Figure 40. Spectre HMBC du composé **5** dans le DMSO- d_6 (25°C, 600 MHz – 150 MHz).

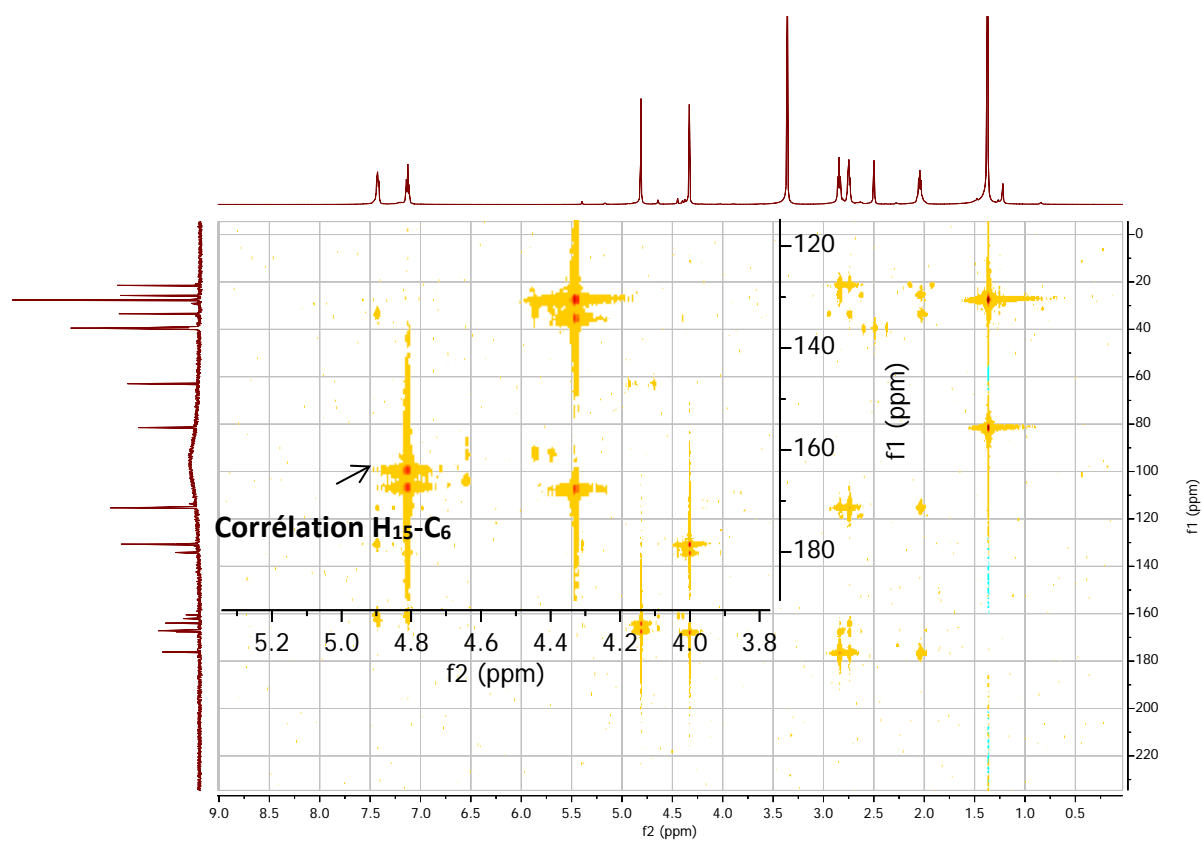


Figure 41. Spectre HMBC du composé **6** dans le DMSO- d_6 (25°C, 600 MHz – 150 MHz).

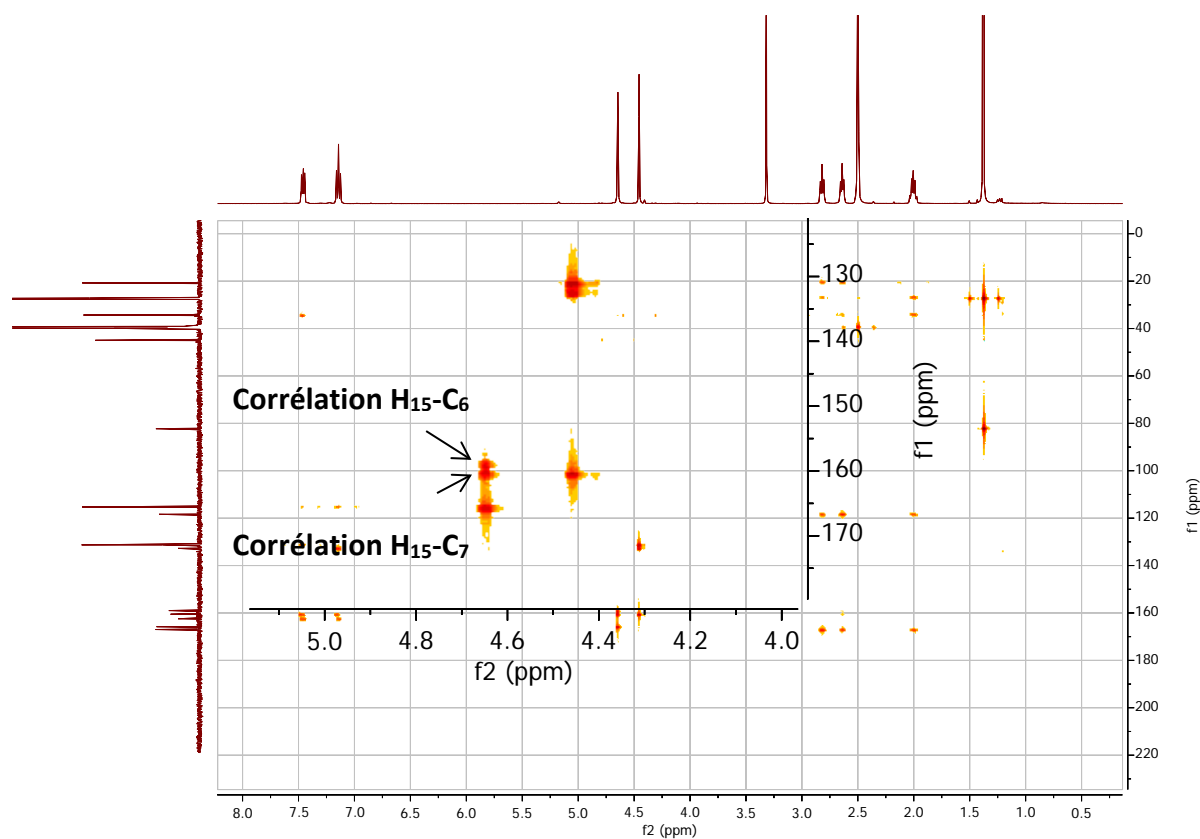
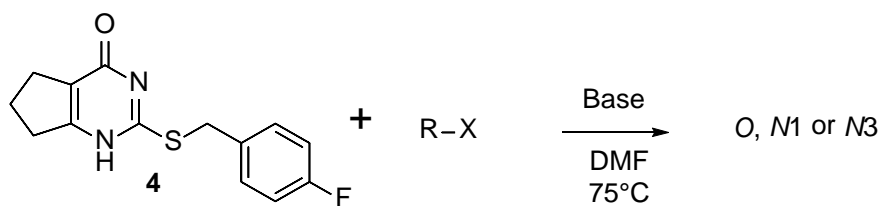


Figure 42. Spectre HMBC du composé **7** dans le DMSO- d_6 (25°C, 600 MHz – 150 MHz).

Afin de modifier la sélectivité de la réaction, nous avons effectué plusieurs tentatives d'optimisation concernant l'étape d'alkylation dans le DMF en changeant notamment la base et l'agent alkylant (**Tableau 9**).



Entrée	Base	R-X	O	NI	N3
1	K ₂ CO ₃		96(6)	0	0
2	DiPEA		95(6)	0	0
3	NMM		97(6)	0	0
4	K ₂ CO ₃		21(10)	0	0
5	K ₂ CO ₃		58(10)	0	0

Tableau 9. Méthodologie appliquée concernant l'alkylation dans le DMF.

Les résultats présentés dans le **Tableau 9** montrent que l'unique produit obtenu lors de l'alkylation de **4** dans le DMF est le produit **6** de *O*-alkylation. On peut même observer des rendements décroissants en passant d'un groupement partant de type halogène vers un triflate (entrées **3** à **5**) ce qui va à l'encontre de la réactivité connue des groupes partants (**Schéma 17**) (Singh 2004).

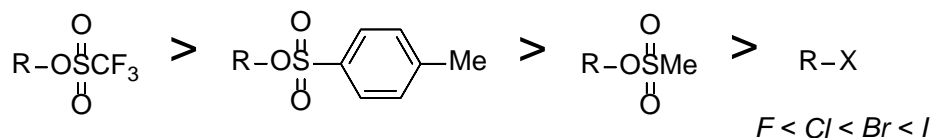


Schéma 17. Réactivité des groupes partants (Singh 2004).

Il ne nous a donc pas été possible de réaliser un quelconque déplacement de sélectivité. Il semblerait qu'un solvant polaire aprotique (DMF) favorise l'alkylation en *O* tandis que des solvants peu polaires aprotiques (DCM, DCE) permettent la formation de la *NI* et *N3* alkylation sans déplacement majoritaire de sélectivité.

En conclusion, ces résultats ont montré que plusieurs brevets de la littérature mais également des articles scientifiques (Azad, Jain *et al.* 2015) (Wang, Xu *et al.* 2011) ont proposé une méthode sélective d'obtention du composé **5**. Cependant, les expériences réalisées ont prouvé que, dans les conditions utilisées (DMF 75°C), c'est la molécule **6** qui a été synthétisée. Aux vues du faible rendement (25%) du composé **5** dans les conditions de Hickey *et al.*, nous nous sommes tournés vers une troisième voie décrite par GSK.

2.2.3 Méthode de Mulholland

La troisième et dernière voie que nous avons étudiée est celle décrite par Mulholland *et al.* (Mulholland, Ross *et al.* 2007). Cette méthode a été développée par GSK afin de pallier le manque important de sélectivité observé précédemment (**Schéma 18**).

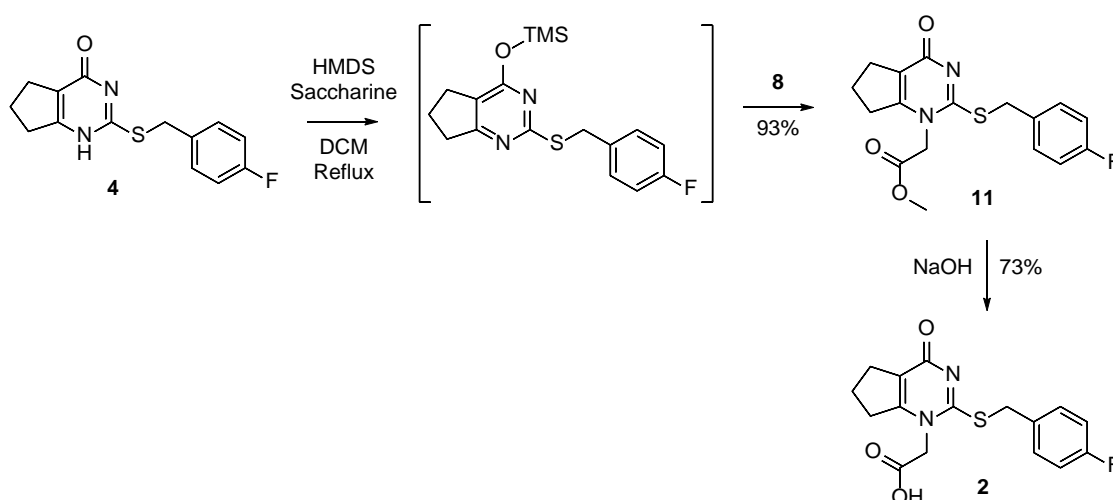


Schéma 18. Méthode sélective de Mulholland *et al.* afin d'accéder au composé **2**.

Cette méthode implique, dans un premier temps, la formation d'un éther de silyle non isolé. La formation de cet intermédiaire est judicieuse car elle permet de bloquer par encombrement stérique l'alkylation en positions *O* et *N3*. Cet éther est, dans un second temps, engagé dans une substitution sur la position *N1* avec le triflate **8**. La saponification avec NaOH, l'extraction acido-basique et enfin la ré-acidification avec HCl 5M permet la récupération du produit d'intérêt avec un rendement global de 73%. Le mécanisme supposé de cette réaction est proposé dans le **Schéma 19**. L'utilisation de saccharine permet d'activer l'azote du HMDS mais également de favoriser la forme énol de la cétone de la pyrimidinone.

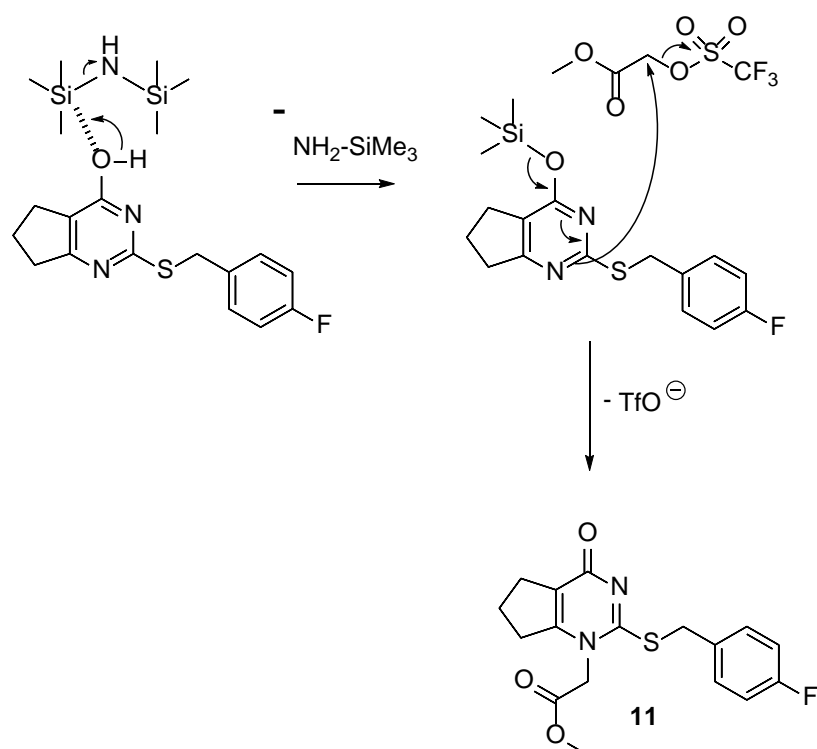
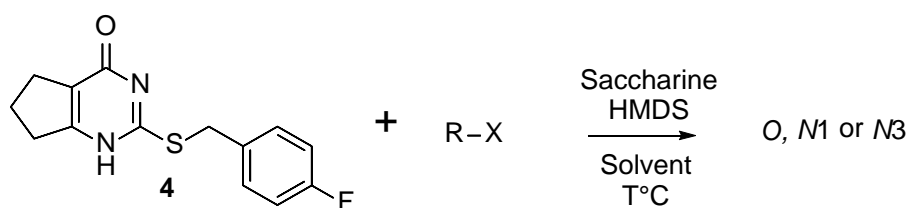


Schéma 19. Mécanisme proposé et supposé de formation de l'ester intermédiaire **11**.

Nous avons isolé l'ester **11** afin de comparer le rendement d'alkylation à ceux obtenus pas les précédentes voies de synthèse et nous avons obtenu ce composé avec un excellent rendement de 93% ($n = 3$). Cette méthode, décrite comme sélective, permet l'obtention unique du composé de *N1*-alkylation. Cependant, les triflates d'alcool étant généralement instables et sensibles à l'hygrométrie et à la température, nous avons décidé de moduler ces conditions réactionnelles (solvant, température, agent alkylant). Les résultats sont consignés dans le **Tableau 10**.



Entrée	Solvant/T°C	R-X	O	N1	N3
1	DCM/40°C		0	0	0
2	DCM/40°C		0	0	0
3	DCM/40°C		0	0	0
4	DCM/40°C		0	93(11)	0
5	DMF/75°C		26 (6)	0	26(7)

Tableau 10. Méthodologie concernant l'alkylation sélective de **4**.

Les résultats obtenus montrent une certaine intolérance à la variabilité fonctionnelle. En effet, l'ester souhaité **5** n'est formé qu'avec l'utilisation d'un triflate en groupe partant. Ni le brome, ni le changement d'ester (entrées **1** à **4**) n'ont permis d'accéder à la molécule d'intérêt. Le composé **4** est très peu soluble dans le DCM et c'est seulement à l'ajout de HMDS, par formation de l'éther d'énol, que le milieu réactionnel devient limpide. Afin de travailler dans des conditions permettant de solubiliser dès le départ le composé **4**, nous avons réalisé des expériences dans le DMF à 75°C (entrée **5**). Étonnamment, seuls les composés de *O* et *N3* alkylation ont été obtenus. Il est probable que les conditions trop rudes (75°C) entraîneraient une dégradation du HMDS, empêchant la formation de l'éther.

En conclusion de ces études, la méthode actuelle la plus sélective est particulièrement substrat-dépendante mais nous permet néanmoins d'obtenir l'acide **2** avec un très bon rendement. Le schéma général est présenté en **Schéma 20**.

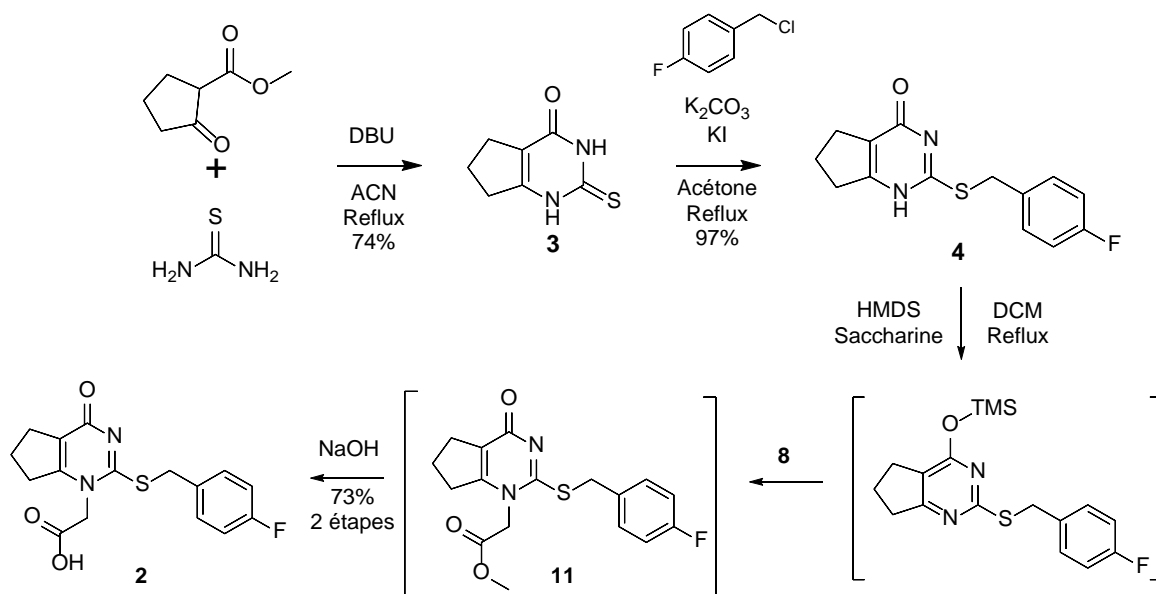


Schéma 20. Voie sélective de synthèse permettant d'accéder au fragment A.

2.3 Synthèse du fragment B

La synthèse du fragment B présente beaucoup moins de difficultés dans sa préparation car la littérature s'accorde sur les voies utilisées et les rendements proposés sont cohérents. (Schéma 21).

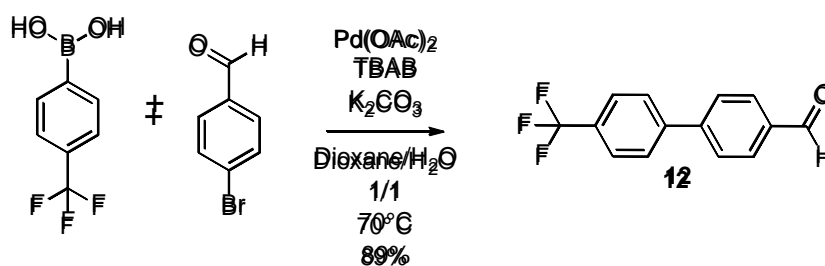


Schéma 21. Synthèse du composé **12**.

Une des méthodes les plus simples et efficaces consiste en un couplage de Suzuki-Miyaura (Schéma 22) entraînant la formation de l'aldéhyde **12** avec un bon rendement, de 89% ($n = 3$).

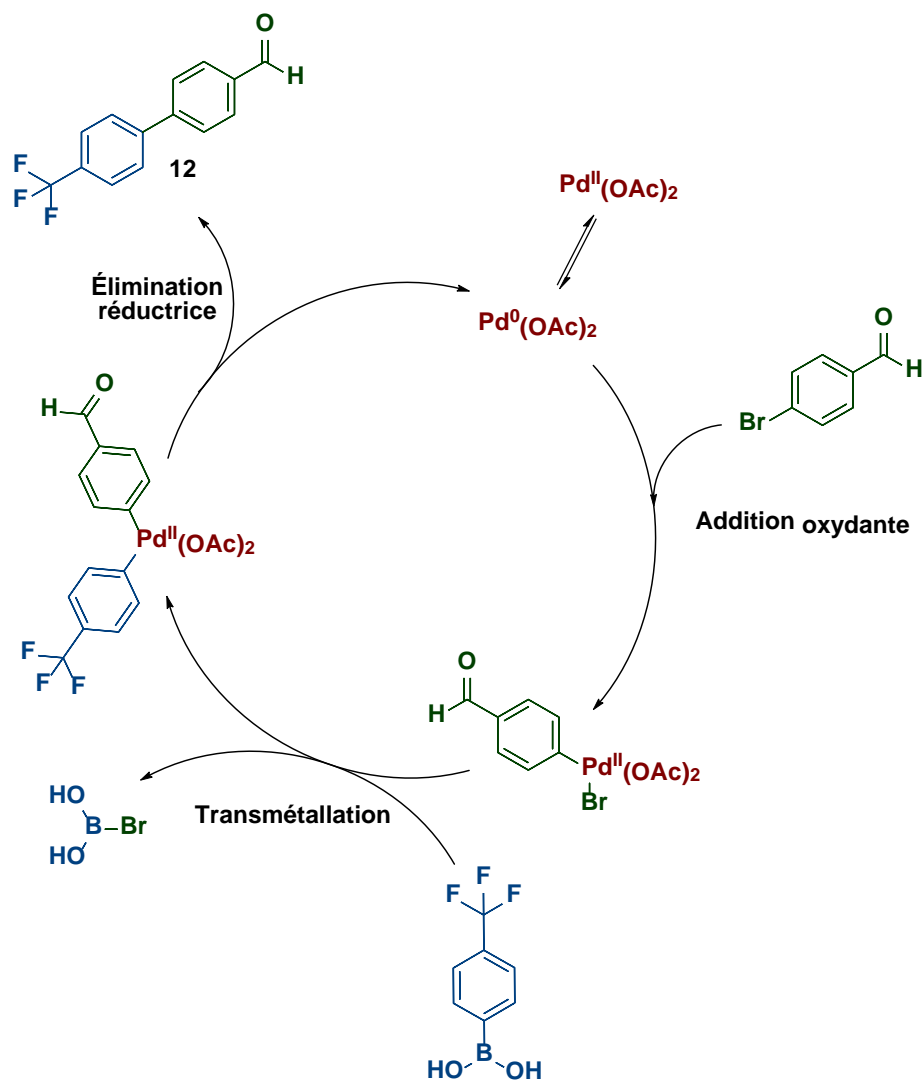
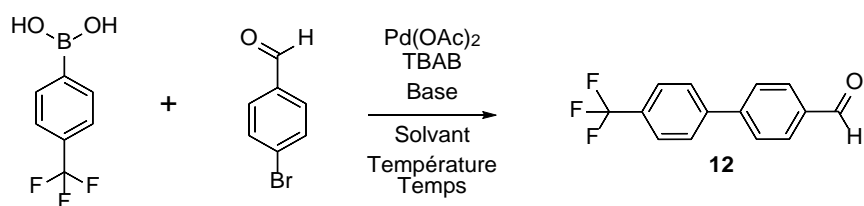


Schéma 22. Mécanisme supposé du couplage de Suzuki-Miyaura permettant l'obtention de **12** (Martin and Buchwald 2008).

Au cours de l'année 2016, le groupe de Li *et al.* (Li, Gelbaum *et al.* 2016) a publié des travaux sur une méthodologie développée autour du couplage de Suzuki-Miyaura. En effet, dans cet article, les auteurs travaillent dans l'eau à 150°C et forment les composés d'intérêt avec d'excellents rendements en peu de temps. En appliquant cette même méthodologie, nous avons réussi à augmenter les rendements mais surtout à s'abstenir de purifier la réaction sur gel de silice car l'extraction liquide-liquide est suffisante pour obtenir un produit de pureté satisfaisante (**Tableau 11**).



Entrée	Solvant	T (°C)	Purification	Temps	Base	Rendement
1	H ₂ O/Dioxane 1/1	70°C	Extraction/Colonne chromatographique	12h	K ₂ CO ₃	77%
2	H ₂ O/Dioxane 1/1	70°C	Extraction/Colonne chromatographique	12h	K ₂ CO ₃	89%
3	H ₂ O	150°C	Extraction	20 min	Na ₂ CO ₃	94%
4	H ₂ O	150°C	Extraction	20 min	Na ₂ CO ₃	96%

Tableau 11. Optimisation des conditions de couplage de Suzuki-Miyaura.

Les entrées **3** et **4** du **Tableau 11** montrent, qu'en 20 minutes à 150°C, le produit **12** est obtenu sans colonne chromatographique avec d'excellents rendements allant, jusqu'à 96% (n = 2). L'aldéhyde **12** est ensuite engagé dans une réaction d'amination réductrice pour obtenir l'amine **13** d'intérêt avec un rendement de 80%. Dans ce cas, l'utilisation d'un réducteur doux (ici le triacétoxyborohydrure de sodium) est importante afin de ne pas réduire *in situ* l'aldéhyde **12** en alcool avant que ce dernier n'ait réagi (**Schéma 23**).

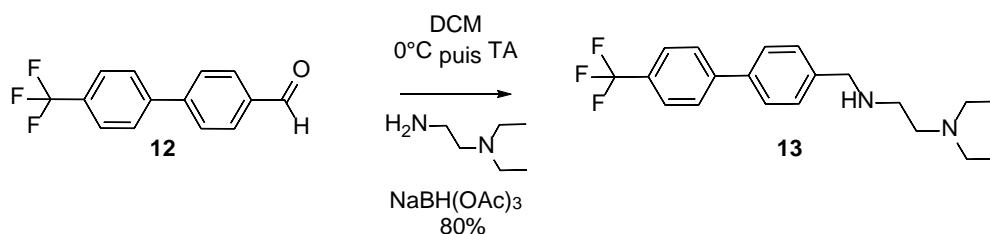


Schéma 23. Synthèse du composé **13**.

Cependant, la forte hygrométrie et la fragilité des hydrures nous ont poussés à étudier une voie annexe (**Schéma 24**). Cette nouvelle voie, bien que présentant une étape

supplémentaire, permet la formation de l'alcool **14** à 96% de rendement ($n = 3$) dans les conditions décrites précédemment. Ce composé est ensuite chloré par une méthode classique utilisant le chlorure de thionyle et formant l'halogénure **15** avec un très bon rendement de 91% ($n = 3$). Enfin, la substitution qui suit permet l'obtention de l'amine **13** d'intérêt avec un excellent rendement de 94% ($n = 3$).

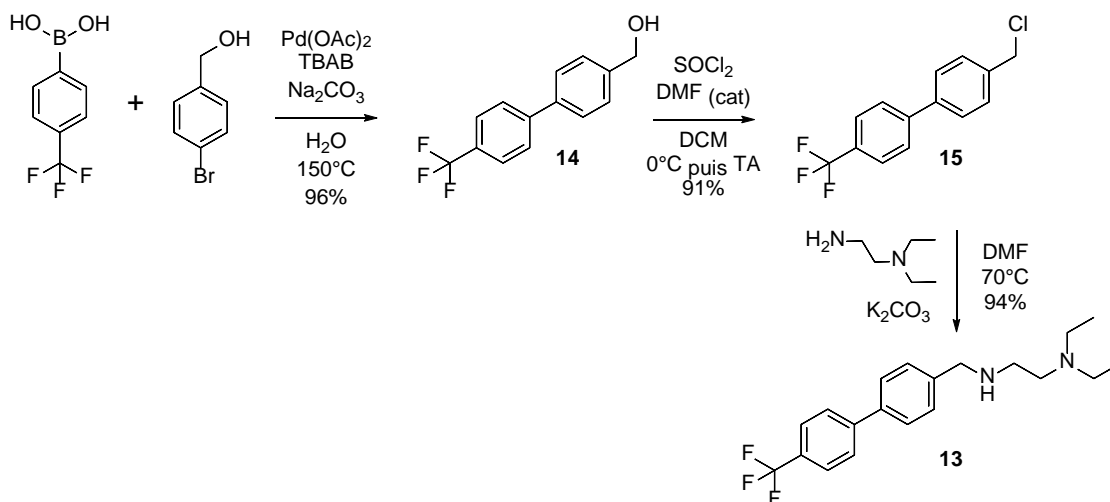


Schéma 24. Voie alternative à l'obtention de **13**.

En conclusion de la synthèse du fragment B, deux méthodes ont été développées. L'une présentant un rendement global de 77% sur 2 étapes et l'autre avec 82% de rendement global sur 3 étapes. La seconde voie nous autorisant à travailler sans hydrures et dans des conditions moins contraignantes, nous avons décidé de poursuivre avec ces conditions réactionnelles.

2.4 Couplage des fragments A et B

L'obtention du Darapladib s'effectue par un couplage peptidique entre les fragments A et B obtenus précédemment. Les sels d'oniums ont été développés afin de réaliser des réactions de couplages amine-acide carboxylique de manière efficace (Albericio, Bofill *et al.* 1998). Cependant, les oximes intermédiaires formés sont particulièrement explosifs (El-Faham and Albericio 2008) et une nouvelle classe de composés de type sels d'uroniums ont été synthétisés par le groupe d'El-Faham afin de rendre les synthèses de peptides plus sûres et efficaces en moins de 2 heures (El-Faham, Funosas *et al.* 2009). Le mécanisme supposé du

couplage par le COMU est proposé en **Schéma 25** avec présence d'un seul équivalent de DiPEA en tant que base encombrée.

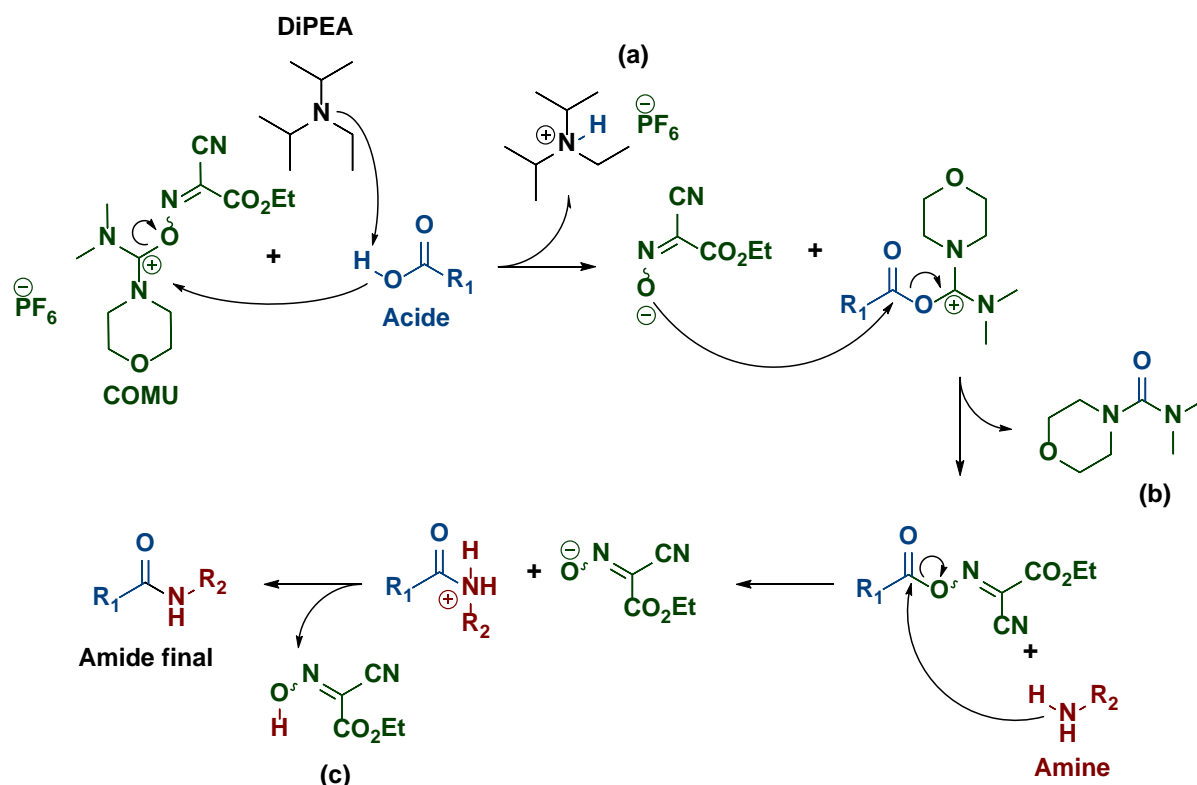


Schéma 25. Mécanisme supposé de formation d'un amide avec le COMU (Chandra, Roy *et al.* 2014).

Les deux fragments A et B ont donc été engagés dans une réaction de couplage peptidique (**Schéma 26**) et le Darapladib a été obtenu avec un rendement de 65% (n = 4).

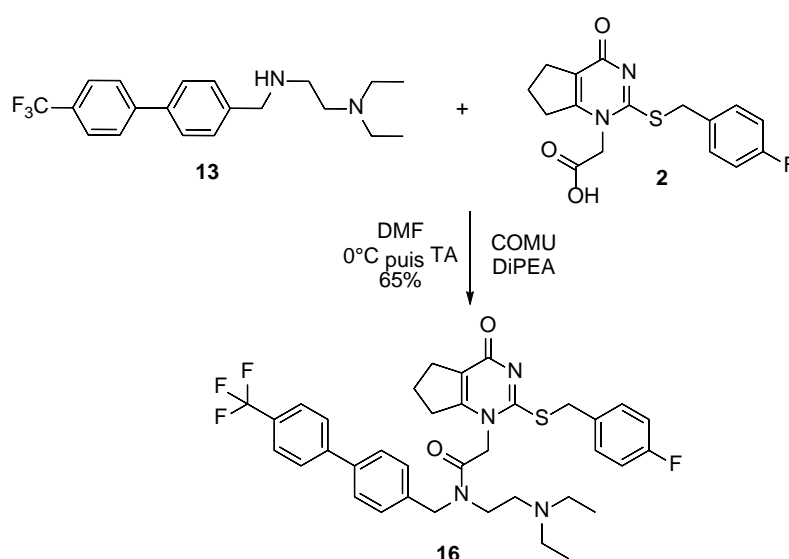
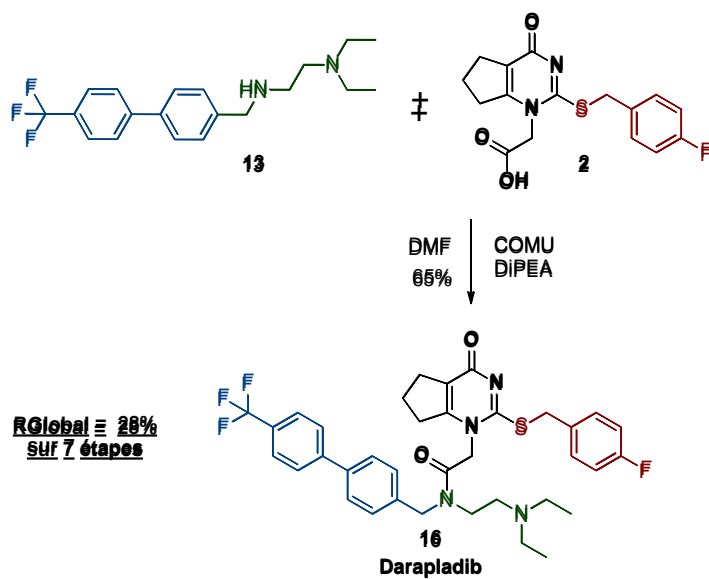
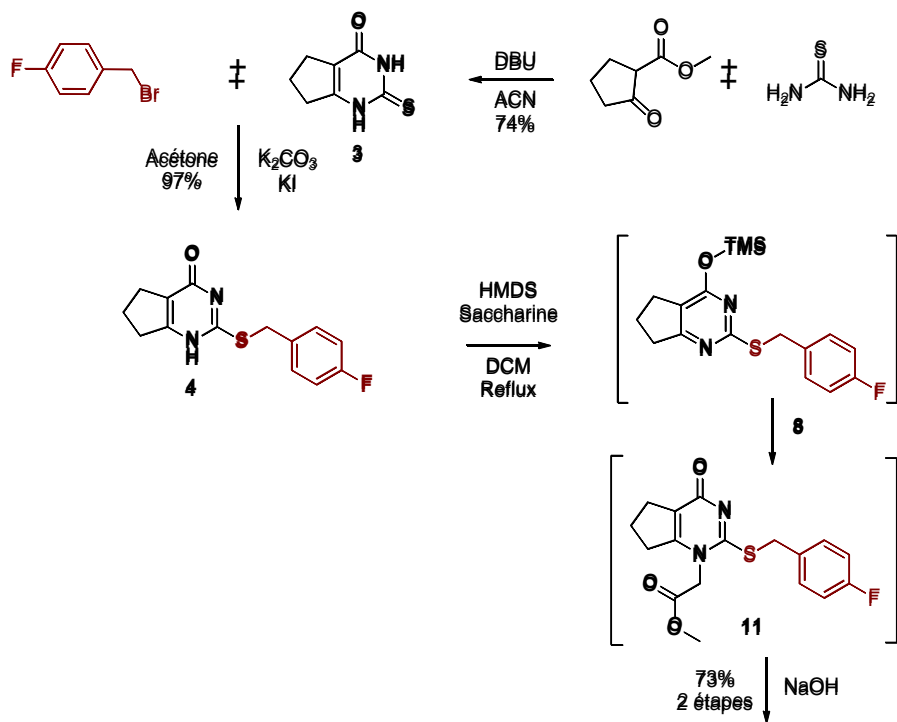
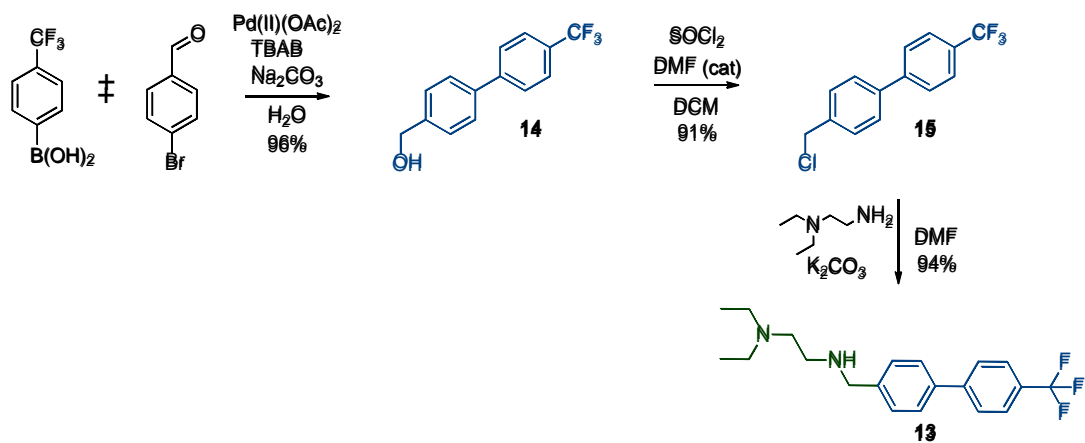


Schéma 26. Obtention du Darapladib **16** après couplage peptidique.

Il est important de noter que lors de l'extraction du produit final, les phases organiques doivent être lavées soigneusement afin d'éliminer complètement les impuretés **a**, **b** et **c** (cf **Schéma 25**). En effet, ces produits secondaires formés peuvent être problématiques notamment au cours de la purification sur gel de silice ou de la chromatographie préparative suivant l'extraction.

En conclusion de cette première partie, le Darapladib a été synthétisé avec un rendement global de 28% sur 7 étapes résumées ci-dessous (**Schéma 27**).



RGlobal \equiv 28%
sur 7 étapes

Schéma 27. Synthèse totale du Darapladib.

Chapitre III : Synthèse des précurseurs et radiomarquage du Darapladib et de ses analogues

1) Introduction

L'imagerie fonctionnelle moléculaire permet le diagnostic de pathologies telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires ou encore les neuropathologies... Dans ces travaux de thèse, l'imagerie choisie est la Tomographie par Emission de positons (TEP) qui est une des méthodes de diagnostic présentant une meilleure résolution d'image que la Tomographie par Emission MonoPhotonique TEMP ou plus couramment appelée scintigraphie (Phelps 2000). Le radio-isotope choisi pour cette étude, le fluor-18 ou ^{18}F , présente des avantages bien distincts en comparaison avec les autres radio-isotopes non métalliques de type ^{11}C , ^{13}N ou encore ^{15}O , également produits par un cyclotron. En effet, son profil d'émission de positons est constitué à 97% d'émission β^+ et il se désintègre en isotope stable ^{18}O . De plus, sa demi-vie de 109,8 minutes permet plus de liberté notamment en matière de transport de radiotraceurs et de synthèse (Preshlock, Tredwell *et al.* 2016).

Ces avantages ont amené les radiochimistes au développement de molécules radiopharmaceutiques et radioligands marqués au ^{18}F . De plus, l'incorporation de fluor dans la structure de molécules permet entre autres de procurer à ces composés une modulation de leur conformation et de leur propriétés électroniques mais également d'influencer leur polarité, lipophilie ou encore pKa. Dans ce chapitre, nous expliciterons les différentes méthodes de radiomarquage les plus utilisées et nous présenterons la synthèse du précurseur de marquage du Darapladib ainsi que son radiomarquage.

2) Revue Bibliographique

2.1 Fluor-18

Le Fluor-18, comme indiqué précédemment, est le radionucléide le plus utilisé en diagnostic de routine TEP. Sa production se fait avec un rendement élevé même sur des cyclotrons à faible énergie, garantissant son accessibilité. Son temps de demi-vie modéré (109.77 minutes) permet son transport vers des centres médicaux ne bénéficiant pas de cyclotron sur place.

Les chimistes peuvent avoir accès au ^{18}F en solution aqueuse ($[^{18}\text{F}]\text{F}^-$) ou sous forme gazeuse ($[^{18}\text{F}]\text{F}_2$) (**Tableau 12**).

Réaction nucléaire	$^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$
Cible	^{20}Ne (200 μmol of F_2)	$^{18}\text{O}_2$, Kr (50 μmol of F_2)	H_2^{18}O
Produit	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	$[^{18}\text{F}]\text{fluoride}$
Activité spécifique (GBq/ μmol)	0,04-0,40	0,35-2,00	4 x 10 ⁴

Tableau 12. Réactions nucléaires permettant la production de ^{18}F (Preshlock, Tredwell *et al.* 2016).

2.2 Échange isotopique

L'échange isotopique implique une substitution d'un atome de fluor-19 par un fluor-18. Par conséquent, le motif trifluorométhyle et en particulier sa présence dans un très grand nombre de molécules biologiquement actives représentent une opportunité pour la communauté scientifique. La chimie organique classique a vu un développement conséquent des stratégies de trifluorométhylation (Yale 1959, Nagib and MacMillan 2011). Cependant, les molécules polyfluorées compliquent de manière significative la radiofluoration nucléophile. Dans les conditions standards, la réaction est soumise à la dilution isotopique du composé marqué avec son analogue froid (^{19}F). De plus, des processus d'échanges entre les

liaisons C/¹⁹F et l'anion ¹⁸F présent dans le milieu réactionnel diminuent grandement l'activité spécifique des radiotraceurs TEP (Johnström and Stone-Elander 1996).

La radiofluoration nucléophile a peiné à devenir un protocole de référence avant le développement de la chimie supramoléculaire et des cryptates de potassium sélectifs (Irie, Fukushi *et al.* 1982). Les premières tentatives de développement de méthodologies de synthèse concernant le groupe [¹⁸F]CF₃ ou CF₂ impliquent l'incorporation de fluor-18 par échange isotopique (Ido T 1979, Kilbourn and Subramanian 1990, Satter, Martin *et al.* 1994, Ruhl, Rafique *et al.* 2014) (**Schéma 28**).

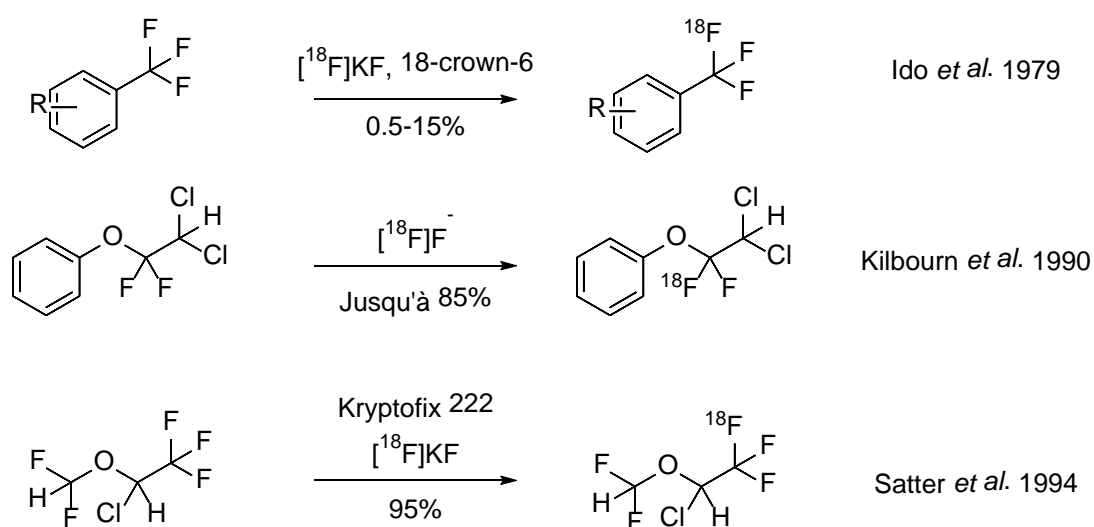


Schéma 28. Radiofluoration par échange isotopique avec source nucléophile de ¹⁸F (adapté de Lien and Riss 2014).

De manière plus récente, le groupe de Suehiro *et al.* (Suehiro, Yang *et al.* 2011) a réalisé la synthèse du [¹⁸F]TFMISO (considéré comme un outil de détection des tissus hypoxiques) par échange isotopique avec de bons rendements mais des activités spécifiques limitées.

En conclusion, l'entité trifluorométhyle a permis le radiomarquage de nombreux radiotraceurs par des méthodes directes ou indirectes. La principale limite de cette technique est la très faible activité spécifique et parfois les rendements pouvant être très faibles quand les molécules deviennent complexes. Cette stratégie n'a donc pas été envisagée concernant le radiomarquage du Darapladib pour lequel l'activité spécifique doit être la plus élevée possible.

2.3 Radiomarquage de composés aliphatiques ou vinyliques

La fluoruration aliphatique est probablement la méthode la plus souvent employée pour le marquage au ^{18}F et de nombreux radiotraceurs TEP utilisés en routine clinique sont synthétisés par cette voie. On peut citer entre autres le ^{18}F -FDG (2-[^{18}F]fluoro-2-deoxy-*D*-glucose) ou encore la ^{18}F -FLT (3'-deoxy-3'-[^{18}F]fluorothymidine) (**Schéma 29**).

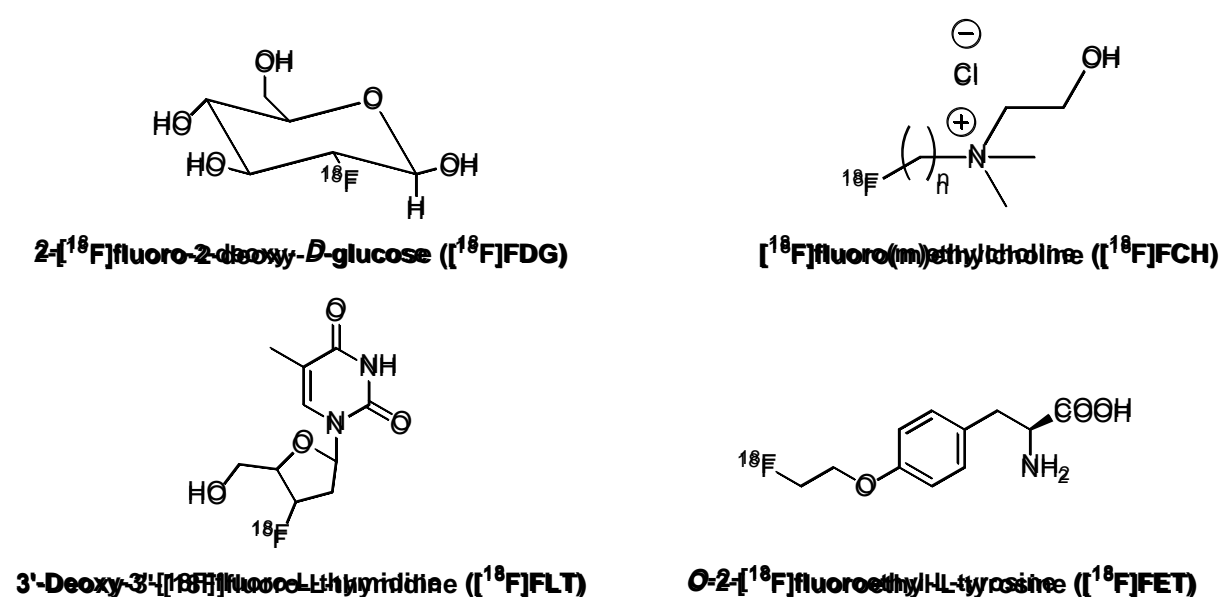


Schéma 29. Principaux radiotraceurs issus de radiofluoruration aliphatique utilisés en médecine nucléaire (adapté d'Ermerit 2014).

Dans les cas du FDG, de la FLT ou de la FCH, un alcool ou un proton est remplacé par un atome de fluor sans changer le squelette carboné de la molécule initiale. Dans le cas de la FET, l'introduction du radionucléide se fait par ajout d'une chaîne carbonée.

La fluoruration aliphatique nucléophile implique la substitution nucléophile d'un groupement partant par un fluorure-18. Le choix du groupement partant est une étape critique dans le design des précurseurs, notamment en ce qui concerne sa réactivité et sa stabilité dans les conditions standards de marquage (Zhang and Suzuki 2007). De plus, la position du groupement partant a également de l'importance avec par réactivité décroissante : benzylique primaire, aliphatique primaire et aliphatique secondaire (Coenen 2007). Si tous ces

paramètres sont pris en compte, la radiofluoration nucléophile aliphatique est efficace en termes de rendement radiochimique (RCY pour radiochemical yield). En outre, elle nécessite des températures modérées (100°C maximum en général) et a besoin de temps réactionnels plutôt courts (jusqu'à 15 minutes) (Pretze, Wuest *et al.* 2010).

Une autre méthode repose sur l'utilisation de sources électrophiles de fluor afin de réaliser un marquage vinylique. La radiofluoration vinylique électrophile la plus étudiée est sans conteste l'addition de $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ gazeux ou de $[^{18}\text{F}]\text{AcOF}$ pour isoler le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ (Ido, Wan *et al.* 1978). Des acides nucléiques ainsi que des nucléosides ont été radiomarqués de la sorte avec une excellente régiosélectivité pour la position 5 (**Schéma 30**) (Cole, Stewart *et al.* 2014). Cependant, la très haute réactivité des sources électrophiles de fluor-18 entraîne une chute dans les RCY et dans la sélectivité des réactions. De plus, ne disposant pas au CYROI des installations nécessaires, cette source de fluor ne sera pas utilisée au cours de cette thèse. Il est important également de souligner les difficultés de mesures de radioprotection à mettre en œuvre pour une utilisation de $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ gazeux rendant son usage limité et très contrôlé.

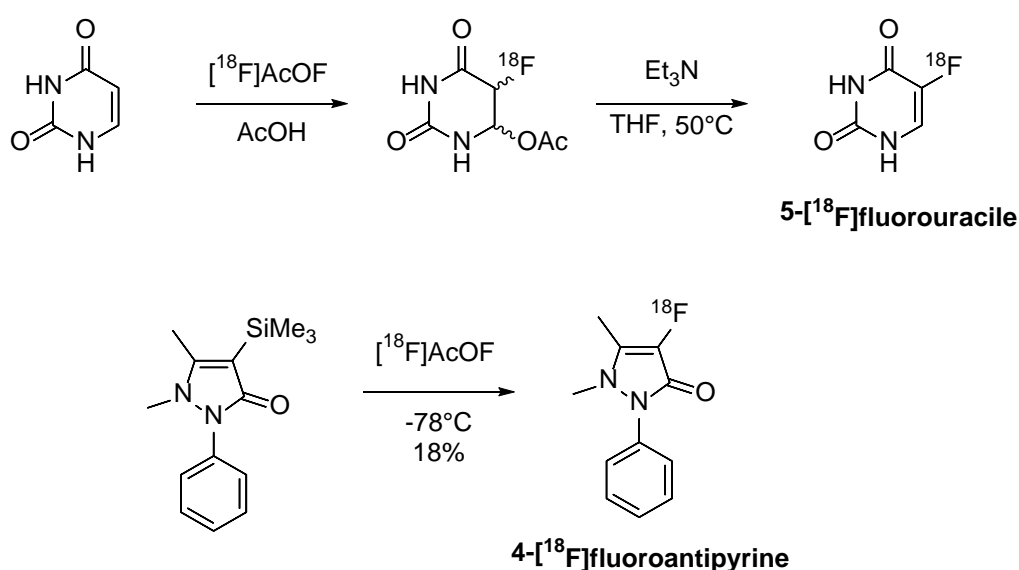


Schéma 30. Exemples de radiofluoration électrophile vinylique (adapté de Cole, Stewart *et al.* 2014).

2.4 Radiomarquage des arènes

2.4.1 Fluoration électrophile

La radiofluoration aromatique électrophile avec F_2 gazeux entraîne la formation de mélanges complexes due à la force oxydante du fluor (Cacace, Giacomello *et al.* 1980). Cependant, sa réactivité a été tempérée en utilisant des températures basses et par dilution dans le xéon afin de synthétiser des molécules complexes telles que la 6- $[^{18}F]$ fluoro-L-DOPA (Firnau, Chirakal *et al.* 1984). Dans ce cas, la fluoration est effectuée par SEAr. Afin de diminuer encore la réactivité de $[^{18}F]F_2$, la synthèse de la L-DOPA peut se faire dans des conditions électrophiles douces avec $[^{18}F]XeF_2$ ou $[^{18}F]AcOF$. Cependant, une faible régiosélectivité est observée et les régioisomères en positions 2 et 5 sont formés avec le composé d'intérêt en position 6 (**Schéma 31**).

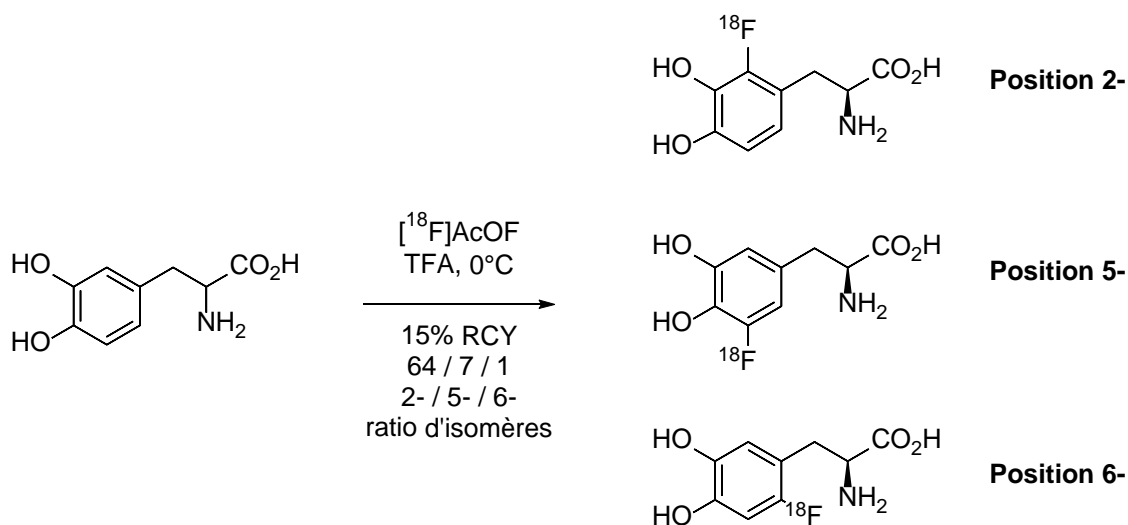


Schéma 31. Synthèse de la L-DOPA par SEAr (Adam, Grierson *et al.* 1986).

Une autre méthode est la fluoration de réactifs organométalliques. Par exemple, Coenen et Moerlein ont effectué une étude comparative d'une série d'organométalliques et ont trouvé des rendements décroissants de SEAr : $ArSnMe_3 > ArGeMe_3 > ArSiMe_3$ (Coenen and Moerlein 1987).

Une dernière méthode est l'utilisation du Selectfluor® (**Schéma 32**) pour la fluoration de stannanes ou d'esters boroniques aryliques en présence de complexes d'argent (Banks,

Mohialdin-Khaffaf *et al.* 1992, Furuya, Strom *et al.* 2009) ou de cuivre (Fier, Luo *et al.* 2013).

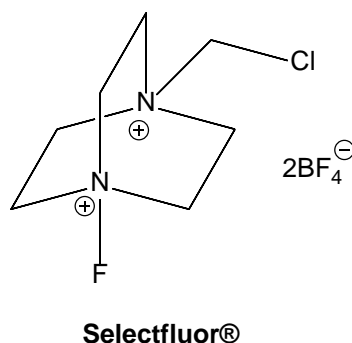


Schéma 32. Structure du Selectfluor®.

Cependant, des complexes plus riches en électrons et plus encombrés tels que (Me_3pyF^+) offrent de meilleurs rendements que ceux issus du Selectfluor® comme montré par les auteurs (Fier, Luo *et al.* 2013).

2.4.2 Fluoration nucléophile et via les métaux de transition

Les premières méthodes de radiofluoration nucléophile aromatique ont été développées dans les années 50-70 et sont présentées dans le **Schéma 33**.

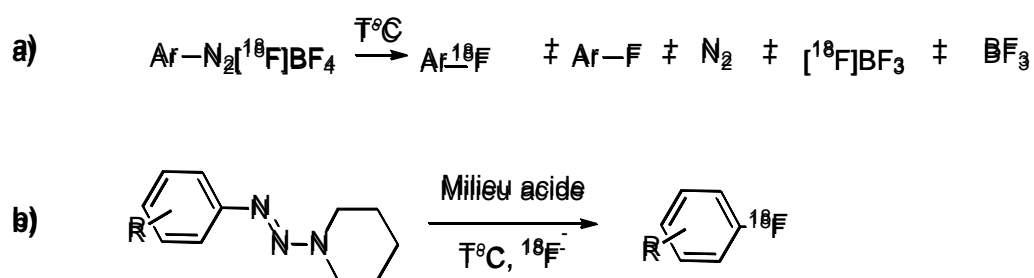


Schéma 33. Radiosynthèse de fluoro arènes par réactions de Balz-Schiemann (a) et Wallach (b) (Nozaki 1967, Tewson and Welch 1979).

Les réactions de fluorodéazotation thermique ainsi que la décomposition thermique de sels diazoniums permettent la formation de radiotraceurs fluorés aryliques. Cependant, les méthodologies de Balz-Schiemann et Wallach ne se sont pas étendues et ont été éclipsées par

le développement de radiofluorations qui impliquaient des groupes fonctionnels bien plus stables.

Une alternative à la fluorodéiazotation thermique consiste en l'utilisation de groupes dits secondaires. Cette pratique courante permet l'introduction de fluor-18 au sein de biomolécules complexes (**Schéma 34**).

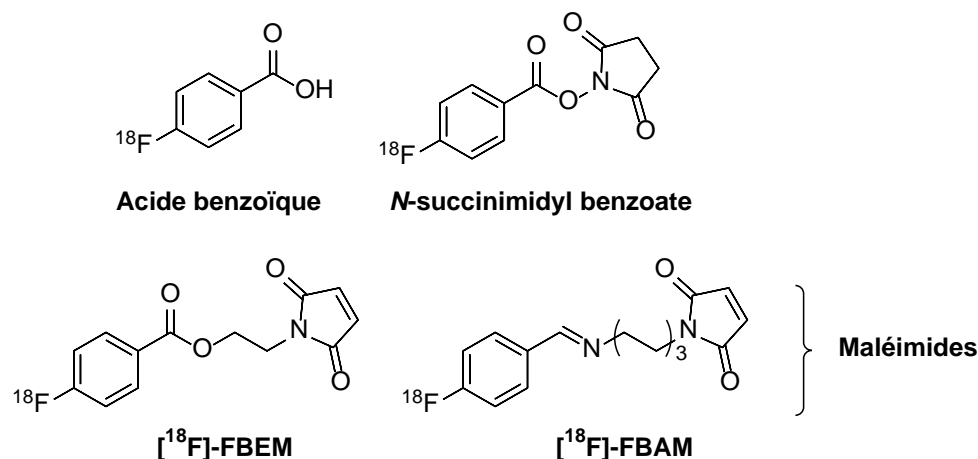


Schéma 34. Principaux groupes secondaires utilisés dans la radiofluoruration aromatique.

Pour ces composés, la S_NAr classique ne permet pas la radiofluoruration et leur sensibilité face aux conditions rudes de marquage peut être contournée par marquage d'un substrat qui sera ensuite couplé à la cible désirée. L'acide benzoïque (Sutcliffe-Goulden, O'Doherty *et al.* 2002) ainsi que le succinimidyle (Vaidyanathan and Zalutsky 1992) servent principalement au couplage avec des amines libres tandis que les maléimides (Kiesewetter, Jacobson *et al.* 2011) permettent la réaction avec une cystéine d'une protéine (contenant une fonction thiol).

Une méthode en pleine expansion à l'heure actuelle est la radiofluoruration passant par les composés issus de l'iode hypervalent.

On peut distinguer :

- les sels diaryliodoniums
- les ylures d'iodoniums

Les sels de diaryliodoniums réagissent avec le fluor-18 formant des fluoroarènes et iodoarènes (Pike and Aigbirhio 1995) issus de sels riches ou déficitaires en électrons. Ainsi

cette méthodologie offre un large panel de substrats. En effet, contrairement aux réactions S_NAr sur des groupements partants classiques (OTf, OTs, halogène...), les sels de diaryliodoniums ne nécessitent pas forcément la présence de groupes électro-attracteurs qui appauvrissent le noyau aromatique (**Schéma 35**).

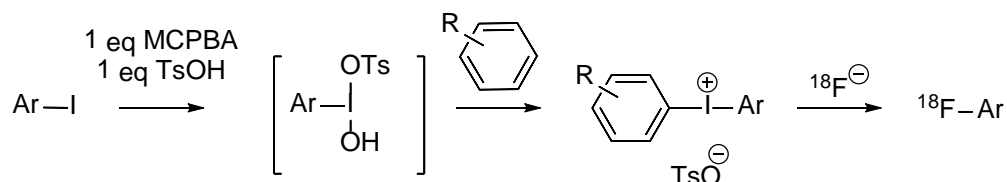


Schéma 35. Formation des sels d'aryliodonium et radiofluoration.

Les ylures d'iodoniums sont une classe de réactifs de l'iode hypervalent utilisés comme précurseurs de radiofluoration. Au même titre que les iodoniums, les ylures réagissent avec le fluor-18 et peuvent être préparés en faisant réagir le (diacétoxy)iodo)arène avec des composés dicarboxylés en conditions basiques (**Schéma 36**) (Cardinale and Ermert 2013).

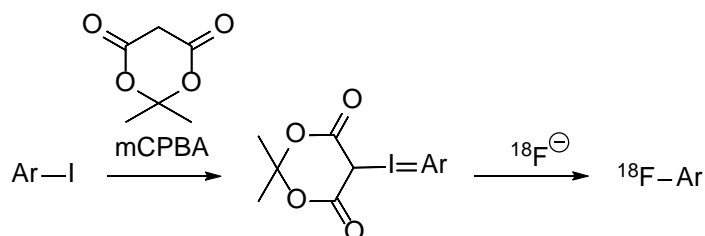


Schéma 36. Exemple de formation d'ylures d'iodoniums et radiofluoration.

Enfin, la dernière méthode présentée dans ce manuscrit repose sur la radiofluoration promue par les métaux de transitions. Parmi les différentes méthodologies, on peut citer :

- couplage au titane
- couplage au palladium
- couplage au nickel
- couplage au cuivre

Une nouvelle méthode utilisant des nanoparticules de TiO_2 a permis le marquage de multiples composés aromatiques sur des précurseurs tosylés (Sergeev, Morgia *et al.* 2015).

Dans le mécanisme proposé de la réaction par les auteurs, le catalyseur joue de multiples rôles. En effet, en plus de désolvater les ions et notamment le fluorure en augmentant sa nucléophilie, les auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle les nanoparticules seraient capables de se coordonner aux atomes d'oxygène du groupement sulfonyle (**Schéma 37**).

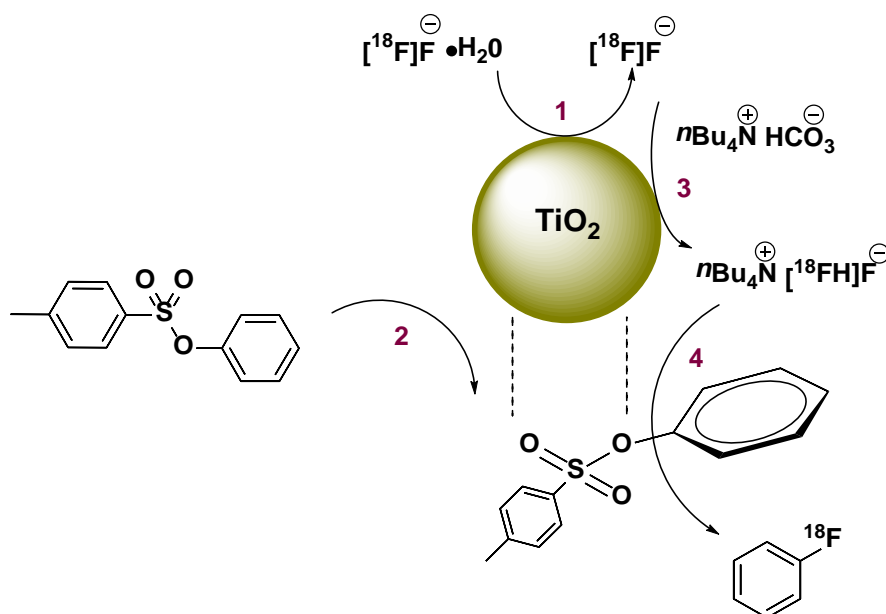


Schéma 37. Mécanisme supposé et proposé de la radiofluoration induite par le titane (adapté de Sergeev, Morgia *et al.* 2015).

Les catalyseurs au palladium sont utilisés dans des méthodologies impliquant des sources électrophiles de fluor. Le fluor électrophile possède des propriétés oxydantes et permet la formation de complexes de palladium à haute valence et de liaisons carbone-fluor. Le complexe $[\text{}^{18}\text{F}]\text{Pd}(\text{IV})\text{-F}$ offre une solution aux problèmes inhérents à l'utilisation de fluor-18 électrophile (faible activité spécifique) (**Schéma 38**) (Brandt, Lee *et al.* 2014).

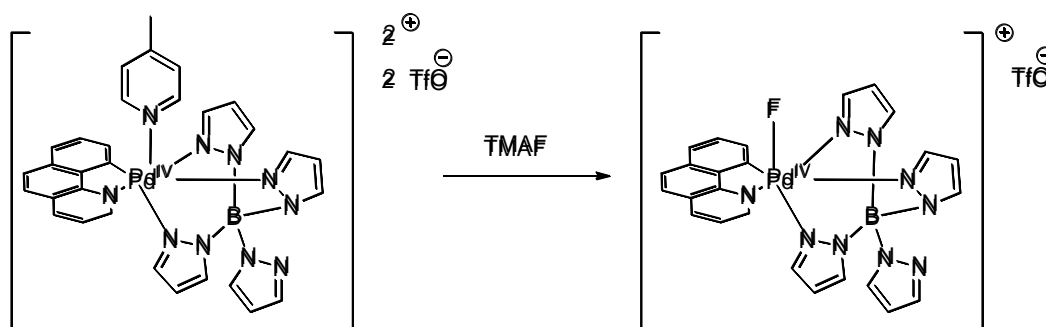


Schéma 38. Exemple de complexe de palladium permettant l'incorporation de fluor.

La radiofluoruration induite par des complexes organométalliques de nickel peut être réalisée avec des faibles activités (jusqu'à environ 20 MBq). Une série de composés radiomarqués a été synthétisée utilisant des complexes de Ni(II) (Ren, Wey *et al.* 2014) (**Schéma 39**)

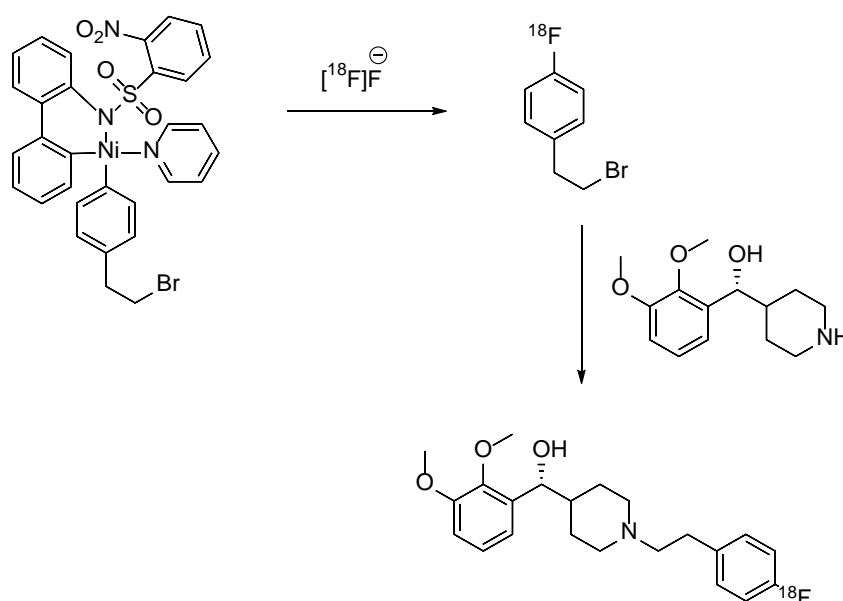


Schéma 39. Exemple de radiofluoruration en présence de complexe de nickel.

Cependant, les complexes de palladium et de nickel sont onéreux et un équivalent de complexe est nécessaire. Il a donc fallu développer de nouveaux complexes à base de métaux plus abordables. Le cuivre représente une solution de choix par son faible coût et sa réactivité similaire aux complexes présentés précédemment (**Schéma 40**).

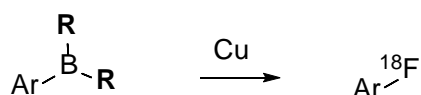


Schéma 40. Marquage de boronates aromatiques induit par un complexe de cuivre.

L'étendue remarquable de la réaction de Chan-Lam induite par le cuivre(II) à partir d'acides boroniques et ses dérivées avec divers hétéronucléophiles mais également la capacité des aryltrifluoroborates et des esters de boronate à être fluorés par KF en présence de

Cu(OTf)₂ ont servi de point d'ancrage au développement de ce marquage (**Schéma 41**) (Ye and Sanford 2013).

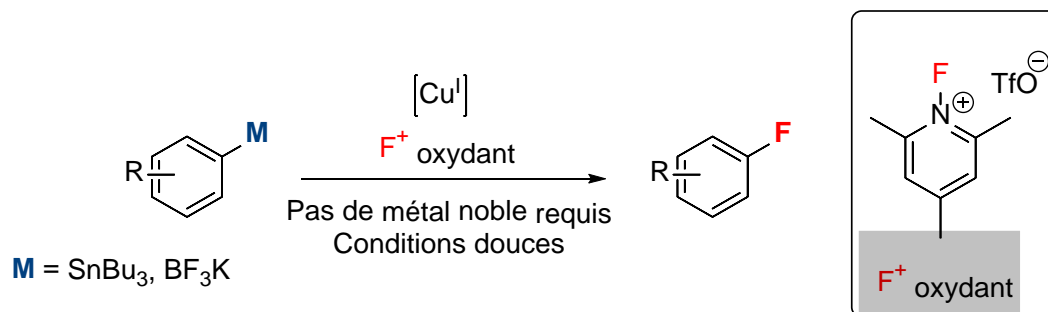


Schéma 35. Fluoruration d'aryl stannanes et d'aryl trifluoroboranes (Ye and Sanford 2013).

En 2014, Gouverneur *et al.* proposent une méthode de radiofluoration permettant le marquage de substrats issus d'ester de boronates (hétéro)aromatiques (**Schéma 42**) (Tredwell, Preshlock *et al.* 2014).

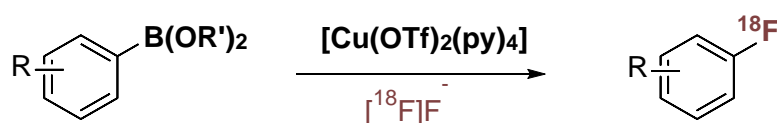


Schéma 42. Radiofluoration d'esters de boronate induite par le cuivre (Tredwell, Preshlock *et al.* 2014).

L'équipe de Sanford *et al.* a ensuite généralisé sa méthode de fluoruration au radiomarquage en 2015 avec de nombreux exemples à partir d'acides boroniques (Mossine, Brooks *et al.* 2015). Dans ces travaux, le complexe de cuivre utilisé est le Cu(OTf)₂ et la pyridine est ajoutée, permettant de former le complexe *in situ* et de promouvoir la radiofluoration. Enfin, en 2016, l'équipe de Gouverneur *et al.* montre la radiosynthèse de 8 radiotraceurs utilisés en TEP par marquage d'esters de boronate (Preshlock, Calderwood *et al.* 2016).

3) Synthèse des précurseurs

Afin de radiomarquer le Darapladib, nous avons voulu emprunter la voie la plus performante de radiomarquage. A l'heure actuelle, la méthodologie de l'iode hypervalent ayant fait ses preuves notamment dans la diversité des substrats, nous nous sommes donc engagés dans cette synthèse.

3.1 Voie de l'iode hypervalent

Au cours de ce travail de thèse, un article particulièrement intéressant a été publié dans la revue *Nature* et démontre le potentiel d'ylures spirocycliques (Rotstein, Stephenson *et al.* 2014).

Dans leur méthodologie (**Schéma 43**), les auteurs proposent une voie one-pot permettant de former l'ylure directement à partir du composé iodé ou bien une méthode en deux étapes nécessitant l'oxydation de l'iode puis la formation de l'ylure d'intérêt.

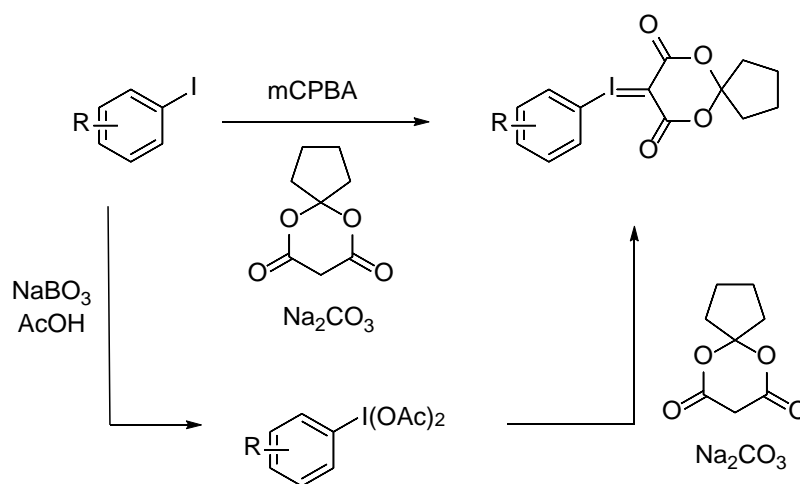


Schéma 43. Voies de synthèse envisagées par Rotstein *et al.* (Rotstein, Stephenson *et al.* 2014).

Afin d'entreprendre cette voie, il nous a donc fallu synthétiser la version iodée du Darapladib substituant ainsi le fluor originellement présent dans la structure. En suivant la

méthode de Cardwell *et al.* (Cardwell, Crawford *et al.* 2011), nous avons entrepris la synthèse du Darapladib iodé (**Schéma 44**).

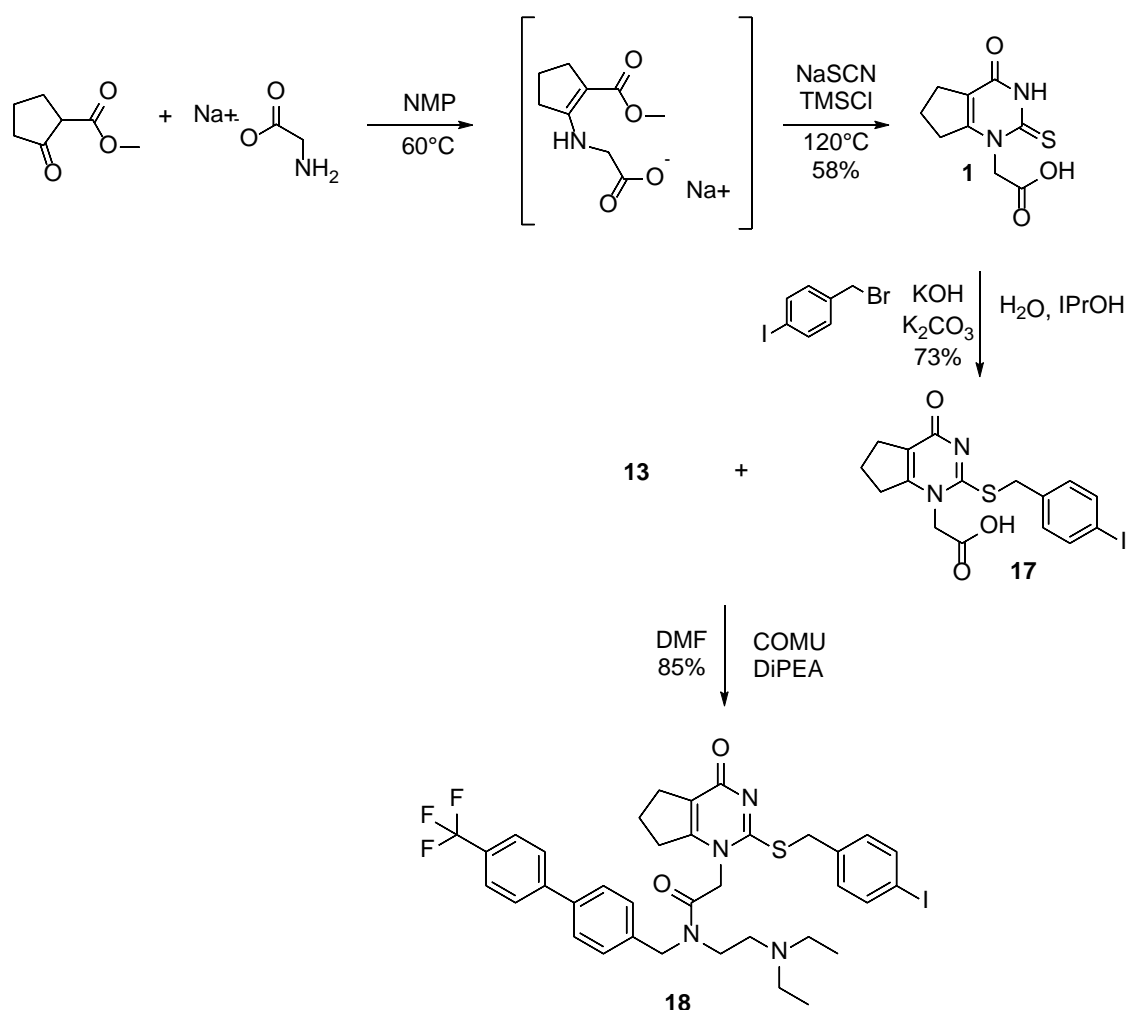


Schéma 44. Synthèse de l'intermédiaire **18**.

En suivant cette voie de synthèse, nous avons obtenu, après substitution du 4-iodobenzylbromure sur le soufre du composé **1**, l'acide **17** avec des rendements allant jusqu'à 73% (n = 2). Le couplage peptidique suivant avec l'amine **13** nous a permis de récupérer le composé **18** avec des rendements allant de 75 à 85% (n = 4). Au vu des commentaires des auteurs indiquant la voie one-pot comme la plus performante, nous avons décidé de préparer l'ylure d'intérêt présentant les meilleurs rendements de radiomarquage à partir du composé **18** (**Schéma 45**).

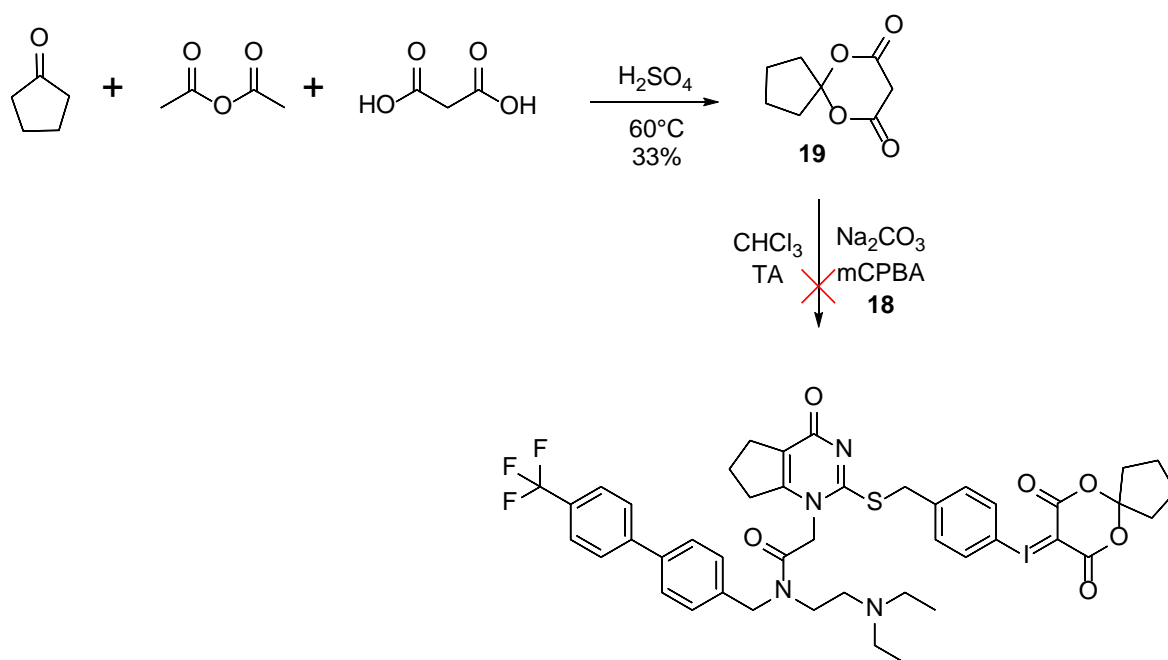


Schéma 45. Tentative de synthèse de l'ylure précurseur de marquage du Darapladib.

La première étape nous a permis d'obtenir le composé dicarboxylé **19** avec 33% de rendement ($n = 2$). Des rendements plutôt faibles comparés aux 56% annoncés par les auteurs qui peuvent être expliqués par la méthode de purification (recristallisation) pouvant être optimisée. En effet, nous avons travaillé sur des quantités maximum de 1g et une synthèse à plus grande échelle aurait éventuellement permis d'améliorer ce rendement. Cependant, les 3 tentatives de formation de l'ylure à partir des composé **18** et **19** n'ont pas abouti et uniquement le produit de départ **18** était visualisé en contrôle CCM. Au vu de ces difficultés, nous avons décidé de coupler le composé **19** à l'intermédiaire iodé **17** et de réaliser le couplage peptidique dans un second temps (**Schéma 46**).

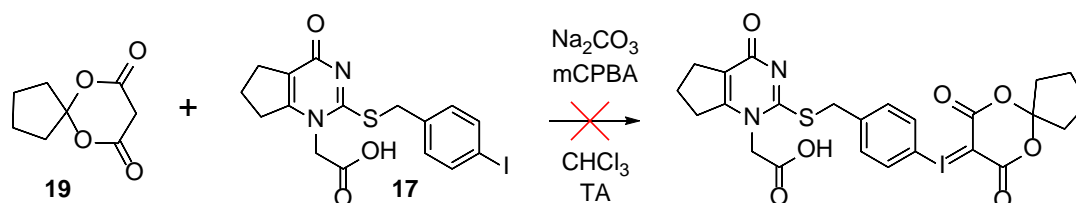


Schéma 46. Tentatives de couplage des composés **17** et **19**.

Malheureusement, l'acide étant très difficile à manipuler et notamment à purifier, nous n'avons pas réussi à isoler le produit d'intérêt avec les méthodes disponibles au laboratoire.

Nous avons alors entrepris la synthèse de l'ylure en deux étapes nécessitant la formation au préalable d'entités diacétoxyiodo (**Schéma 47**).

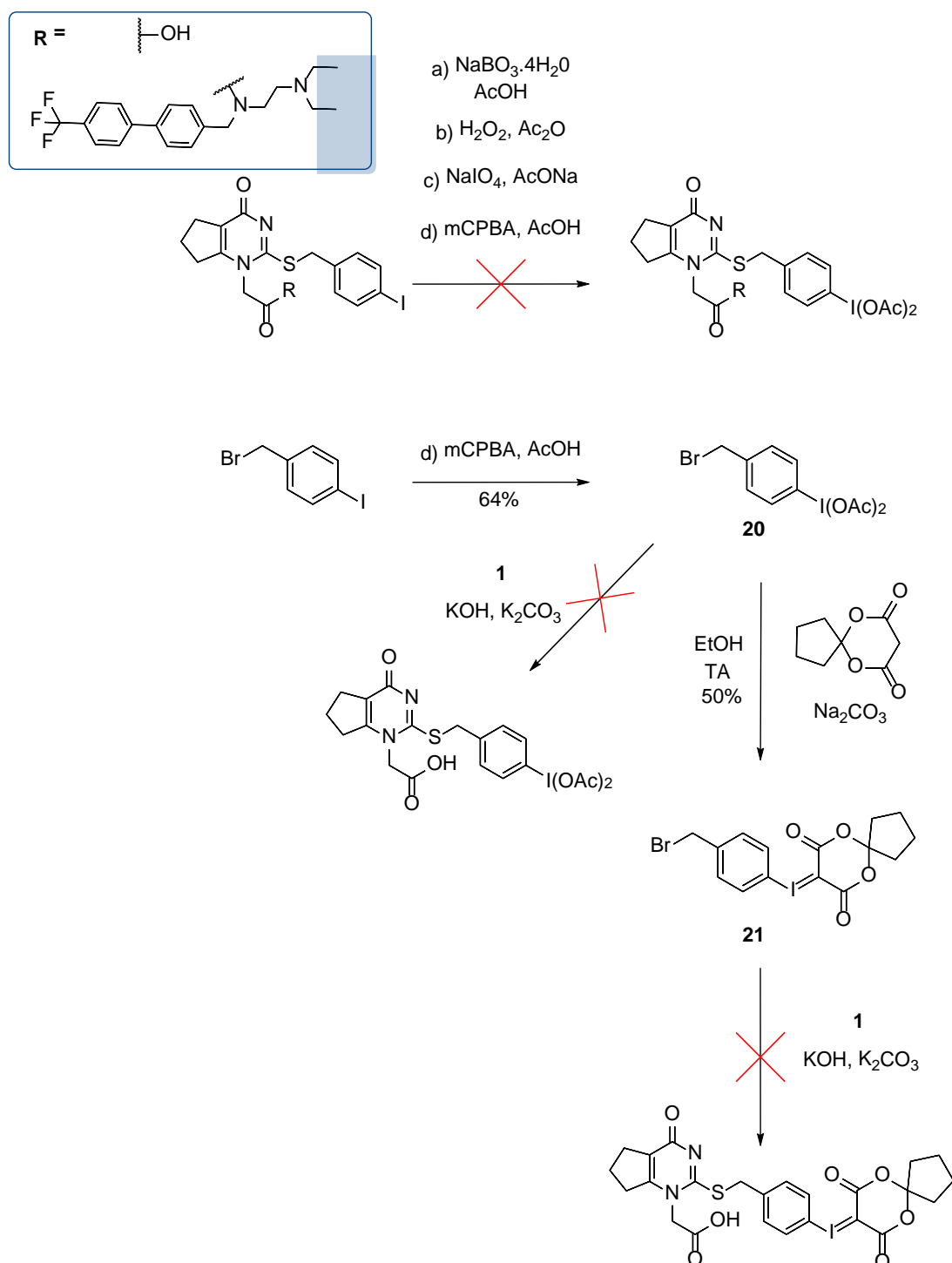


Schéma 47. Tentatives de formation de l'ylure sur deux étapes.

Comme le montre le Schéma 47, les composés **17** et **18** n'ont pas réussi à être oxydés après 4 différentes méthodes testées. En revanche, le 4-iodobenzylbromide a été oxydé en diacétoxyiodobenzyl bromide **20** avec mCPBA à 64% de rendement. Cependant, la tentative de couplage avec **1** n'ayant pas fonctionné, nous avons synthétisé prématurément l'ylure **21** (50%, n = 3) qui n'a pas réussi à être couplé au composé **1**. En effet, nous avons remarqué que l'ylure **21** était peu stable et nécessitait de nombreuses précautions de stockage et de manipulation (lumière, température, hygrométrie). De plus, sa purification s'est montrée complexe puisqu'il avait tendance à se dégrader sur SiO₂ (CCM, colonne chromatographique).

Après les nombreuses difficultés rencontrées, nous avons décidé d'étudier une dernière voie utilisant l'iode hypervalent et plus particulièrement les diaryliodoniums. Ces composés peuvent être obtenus par 2 méthodes présentées dans le Schéma 48.

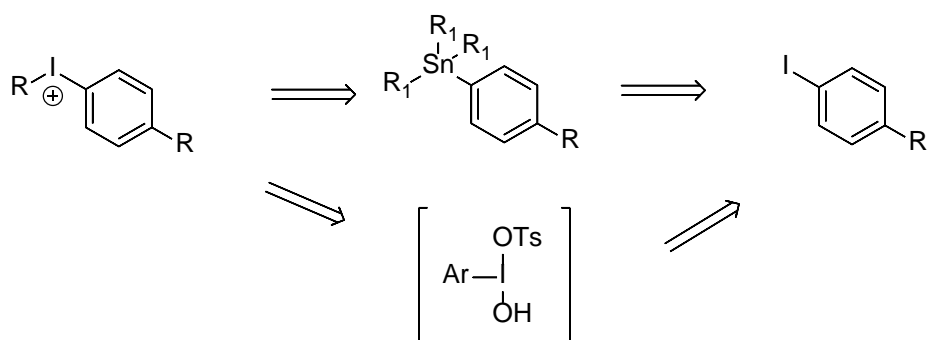


Schéma 48. Rétrosynthèse possible de sels d'aryliodoniums (Reed, Launay *et al.* 2012, Seidl, Sundalam *et al.* 2016).

La méthode nécessitant la formation d'un intermédiaire non isolé tosylé est à exclure car nous n'avons pas réussi à former de diacétoxyiodo arènes issus des molécules **17** et **18**. Nous avons donc décidé d'emprunter la voie de l'étain. En effet, nous disposons des composés **17** et **18** iodés qui peuvent, par couplage au palladium, former les composés stannylés souhaités. Différentes méthodes ont été employées (Sn₂Bu₆, LiCl, Pd(PPh₃)₄ ; Sn₂Bu₆, LiCl, Pd(PPh₃)₄ ; n-BuLi, SnBu₃Cl ; DiPEA, Sn₂Bu₆, Pd(dba)₂) (**Schéma 49**).

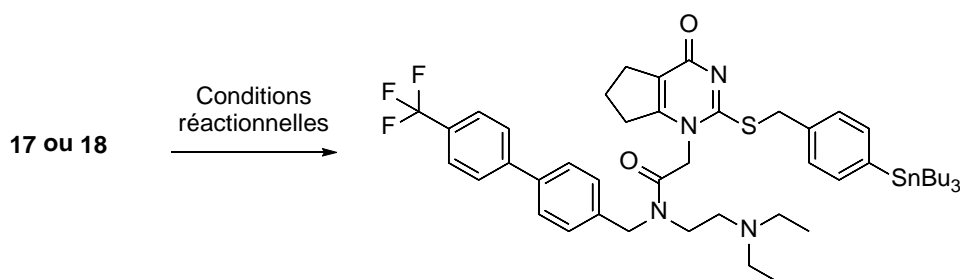


Schéma 49. Tentatives de stannylation des composés **17** et **18**.

Toutefois, aucune tentative n'a permis d'aboutir au composé stannylé d'intérêt. En effet, uniquement du produit de départ était récupéré (en particulier pour le composé **18**). Le composé **17** étant très difficile à suivre en CCM ou HPLC, il nous a été difficile de tirer des conclusions. Cependant, la littérature abondante et récente en méthodologie de marquage aromatique et notamment les groupes de Gouverneur et Sanford nous a offert d'autres possibilités de précurseurs à développer.

3.2 Voie des boronates

Les esters de boronate et acides boroniques ont été particulièrement étudiés notamment par les groupes de Sanford et Gouverneur (Mossine, Brooks *et al.* 2015, Preshlock, Calderwood *et al.* 2016). Même si la méthode décrite par le groupe de Sanford était à froid, elle a montré son efficacité en fonctionnant tant avec les acides boroniques que les boronates (Ye, Schimler *et al.* 2013). Son groupe a par ailleurs publié des travaux de radiomarquage utilisant le même complexe de cuivre peu de temps après (Mossine, Brooks *et al.* 2015).

Nous avons alors décidé de synthétiser le fragment A qui possèdera la fonction boronate (**Schéma 50**). Le fragment B reste inchangé dans le cas de la synthèse du précurseur du Darapladib.

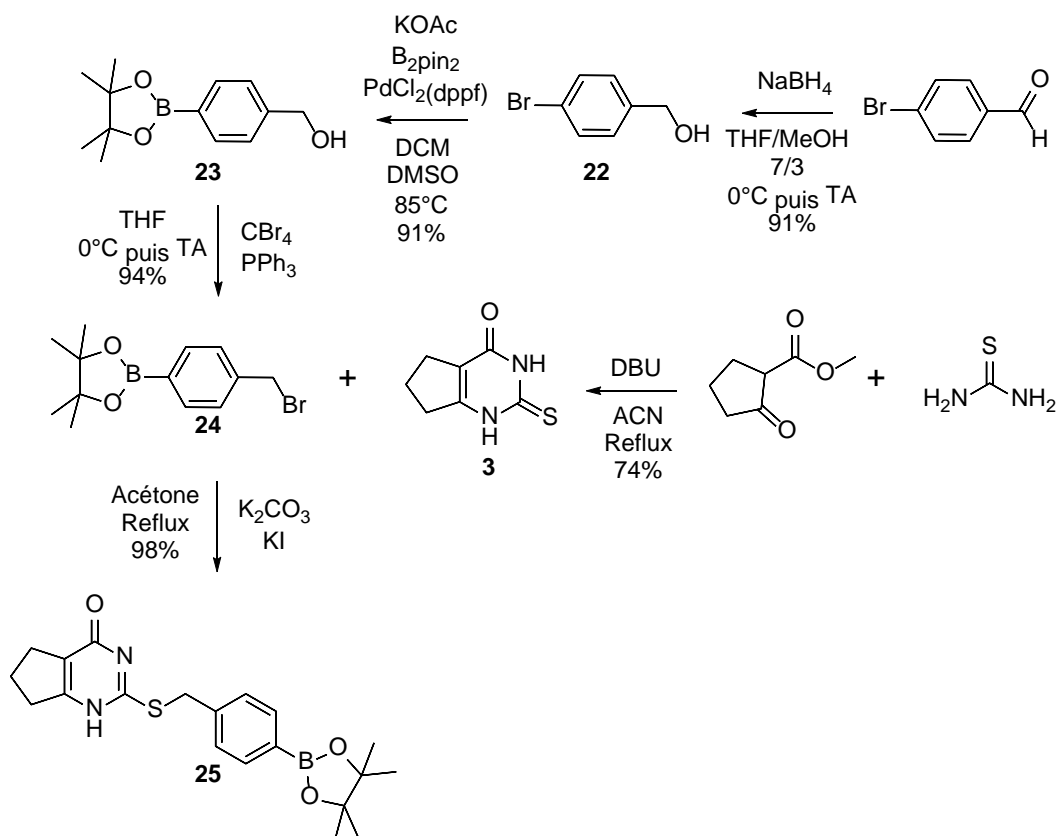


Schéma 50. Synthèse de l'intermédiaire **25**.

Dans un premier temps, le bromobenzaldéhyde est réduit en alcool **22** correspondant avec un rendement de 91% qui sera transformé en ester de bore **24** à 91% de rendement. L'alcool sera alors modifié en groupe partant halogéné de type brome pour former l'ester de bore **24** (94%) qui sera à son tour engagé dans une substitution avec le soufre de la thiouracile **3** pour donner l'amine **25** avec un rendement de 98%. Arrivés à cette étape, nous avons entrepris l'alkylation sélective (via HMDS) présentée précédemment (**Schéma 51**).

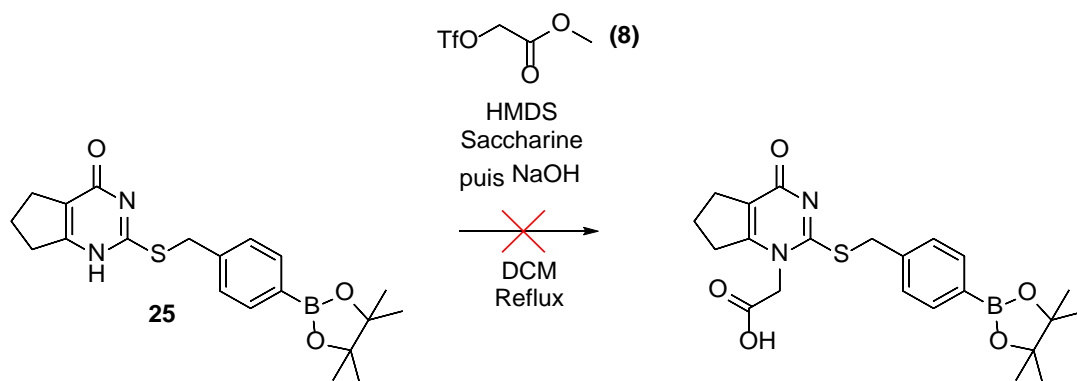


Schéma 51. Alkylation sélective à partir du composé **25**.

Cependant, le produit souhaité n'est pas isolé et lorsque nous effectuons la RMN de l'hypothétique acide formé brut, aucun signal n'est reconnaissable. Il est fort probable que les conditions d'hydrolyse de l'ester méthylique mais également celles de l'extraction acido-basique soient trop rudes pour l'ester de boronate. Nous avons alors été contraints de réaliser l'alkylation de **25** par la méthode non sélective de Hickey *et al.* (Hickey, Ife *et al.* 2016) (**Schéma 52**).

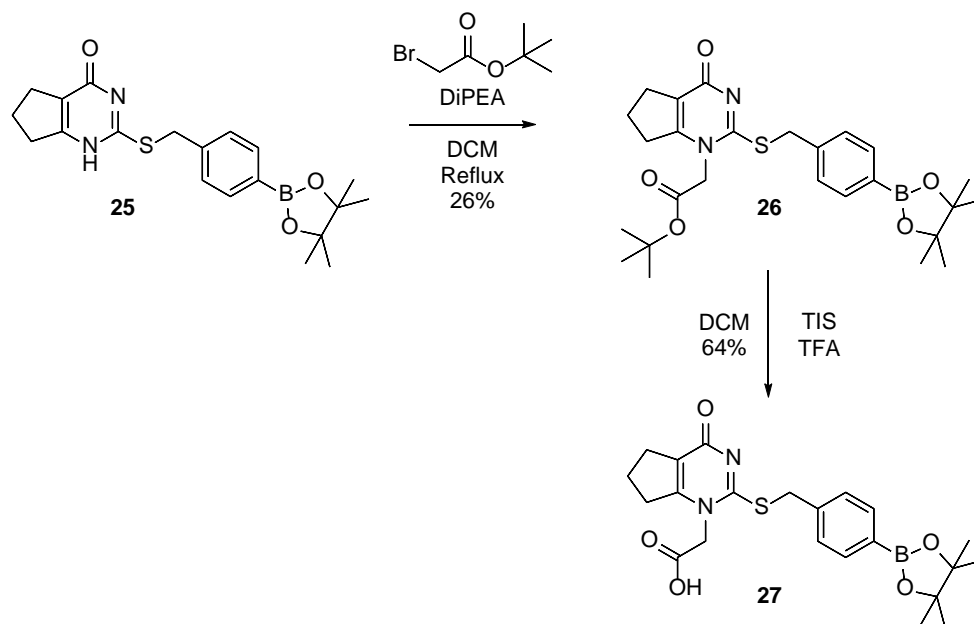


Schéma 52. Synthèse du fragment A (composé **27**).

L'amine **25** est donc engagée dans l'alkylation non sélective et l'ester souhaité **26** est obtenu avec un rendement moyen de 26% mais suffisant pour continuer notre synthèse. Afin d'obtenir l'acide **27** d'intérêt nous avons travaillé dans les conditions usuelles décrites précédemment. Cependant, nous obtenions un mélange de produits après cristallisation contenant l'ester de départ **26** ainsi que l'acide souhaité **27**. Nous avons alors décidé d'utiliser un piègeur de carbocation afin de favoriser la formation de l'acide **27** (**Schéma 53**). Après utilisation du TIS (Triisopropylsilane), nous avons réussi à obtenir l'acide d'intérêt avec 64% de rendement.

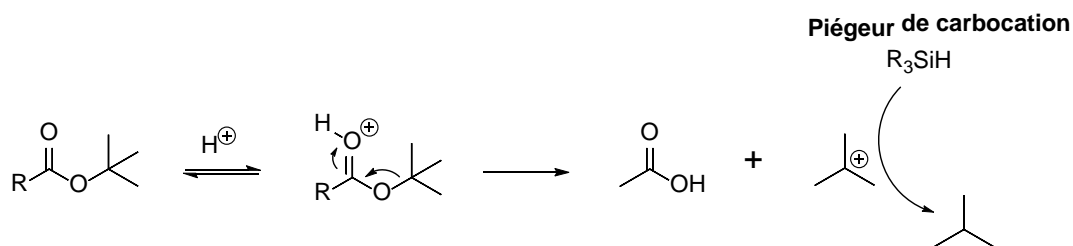


Schéma 53. Hydrolyse acide d'un ester tert-butyle

Le couplage peptidique réalisé par la suite nous a permis d'obtenir le précurseur de marquage du Darapladib **28** avec un rendement de 70% (**Schéma 54**).

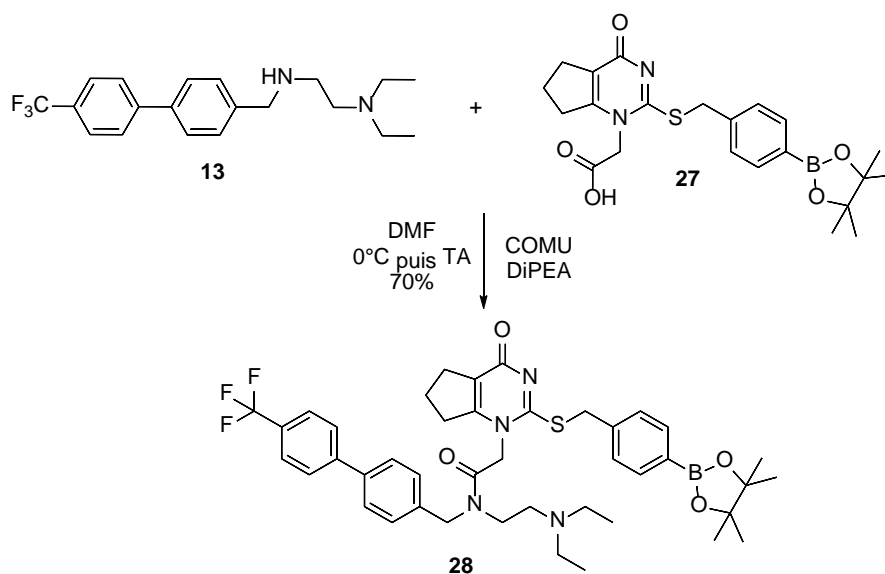


Schéma 54. Synthèse du précurseur **28**.

La synthèse du composé **28** est résumée dans le schéma ci-dessous (**Schéma 55**). Ce dernier est obtenu sur 11 étapes avec un rendement moyen de 5% dû au faible rendement de l'hydrolyse ainsi que de l'alkylation non sélective (conditions de Hickey *et al*).

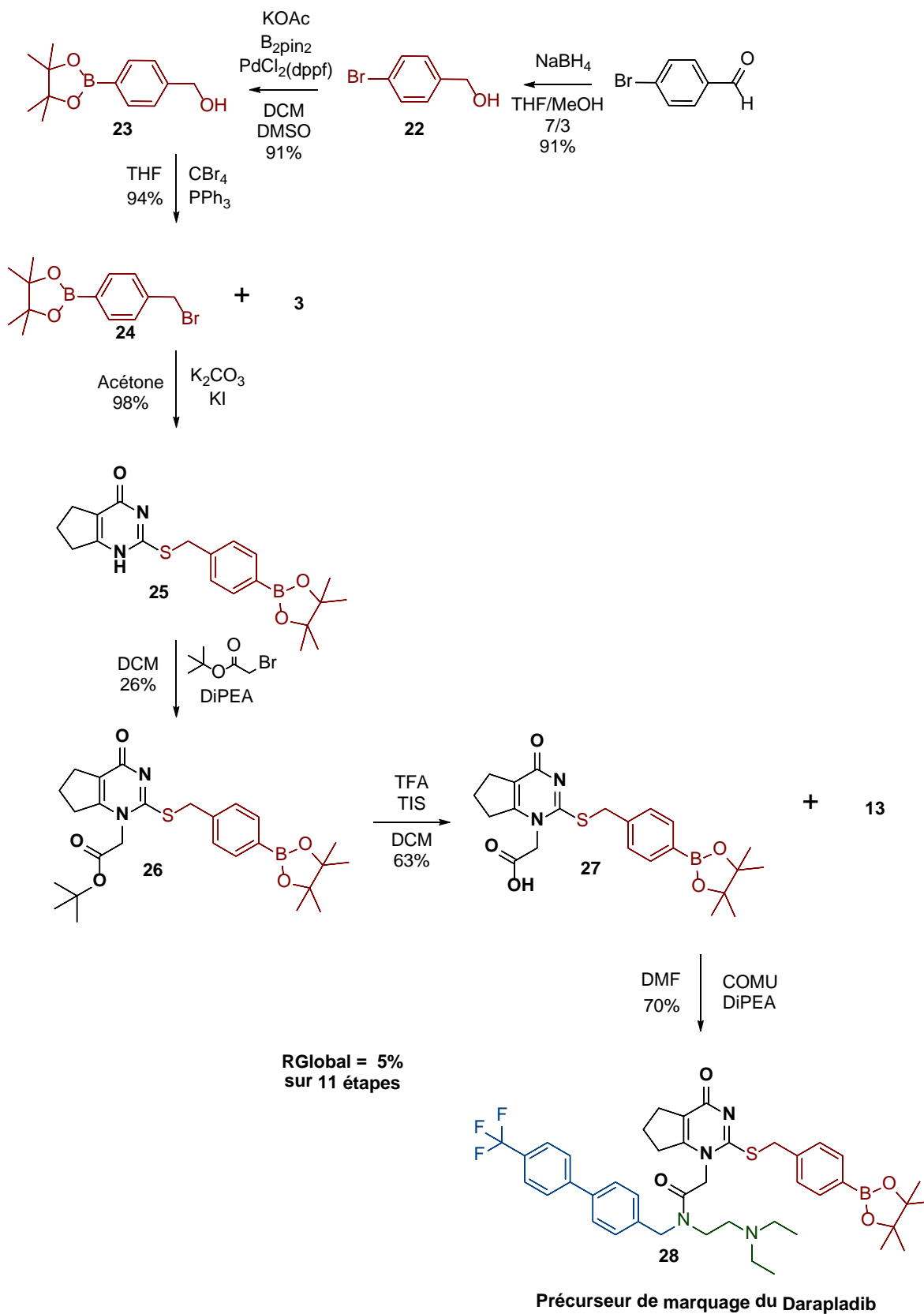


Schéma 55. Synthèse totale du précurseur de marquage du Darapladib **28**.

3) Étude des analogues structuraux

Au cours de nos travaux, nous avons synthétisé de nombreux composés analogues du Darapladib et non décrits dans la littérature. Afin d'explorer toutes les possibilités s'offrant à nous, nous avons étudié ces molécules en regardant notamment leur capacité à inhiber la Lp-PLA₂.

Comme indiqué précédemment, les travaux de Hickey *et al.* montrent que lors de l'étape non sélective d'alkylation du composé **4**, 3 produits sont formés (Cf **Schéma 16**). Les auteurs annonçaient la synthèse d'analogues en *NI* alkylation (notamment dans le DMF) mais ont obtenu les molécules alkylées en *O*. Nous nous sommes alors tournés vers l'analyse de ces composés afin de voir leur possible influence sur l'activité Lp-PLA₂.

Les équipes de Woolford et Liu *et al.* (Liu, Chen *et al.* 2016, Woolford, Pero *et al.* 2016) ont montré que l'entité thiouracile et en particulier le carbonyle formait des liaisons hydrogènes avec la Leu153, la Phe274 et la Gln352 de la Lp-PLA₂. Le groupe fluorophényle interagit avec la Leu107, la Leu159, l'Ala355 et la Phe357 dans le site actif de l'enzyme. Le groupe 4 (Cf **Schéma 10**) contribue à l'affinité avec l'enzyme par des interactions lipophiles avec la Phe125 tandis que le groupe 3 engage des interactions π - π qui augmentent l'affinité déjà importante envers la Lp-PLA₂. Cependant, dans le cas des composés en *O*-alkylation, l'oxygène du carbonyle est moins disponible pour interagir dans la poche enzyme-substrat. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de comparer les capacités des composés **5**, **6** et **7** mais également celle des régioisomères du Darapladib **30** et **32** (**Schéma 56**) à inhiber la Lp-PLA₂. Les régioisomères du Darapladib ont été synthétisés et sont présentés ci-dessous. La grande difficulté de manipulation des acides **29** et **31** et plus particulièrement leur faible solubilité pour effectuer les tests d'affinité nous a contraint à les exclure des expérimentations.

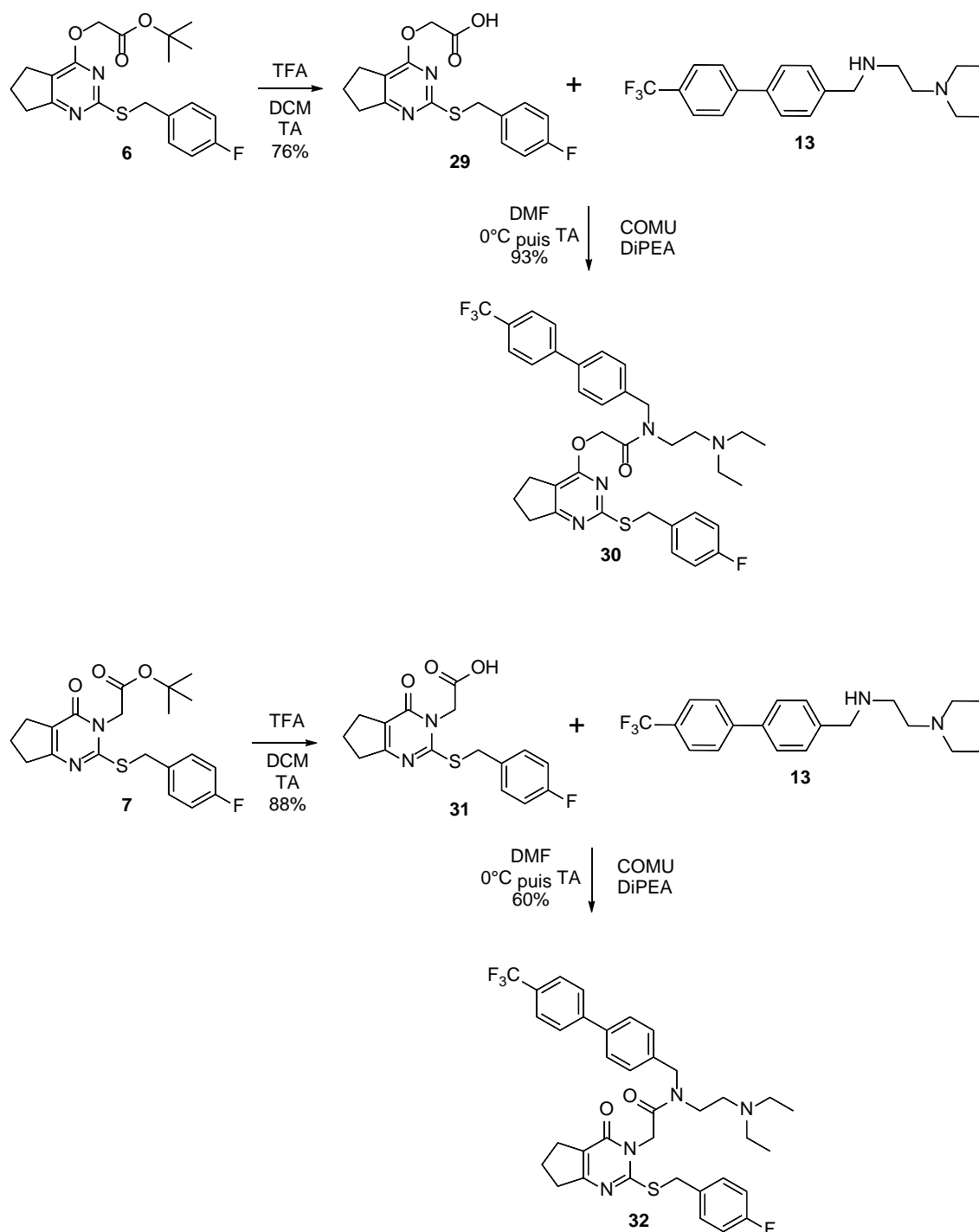


Schéma 56. Synthèse des régioisomères en position *N3* (**7** et **32**) et *O* (**6** et **30**) du Darapladib.

Les esters **6** et **7** ont été hydrolysés avec des rendements respectifs de 76 et 88%. Les acides **29** et **31** ainsi obtenus ont alors été tout deux engagés dans des couplages peptidiques avec l'amine **13** nous permettant d'obtenir les régioisomères *O*-Darapladib **30** et *N3*-Darapladib **32** à 93 et 60% de rendement. Nous avons alors regardé la capacité des composés **5**, **6**, **7**, **16**, **30** et **32** à inhiber la Lp-PLA₂. Les résultats sont présentés dans la **Figure 43**.

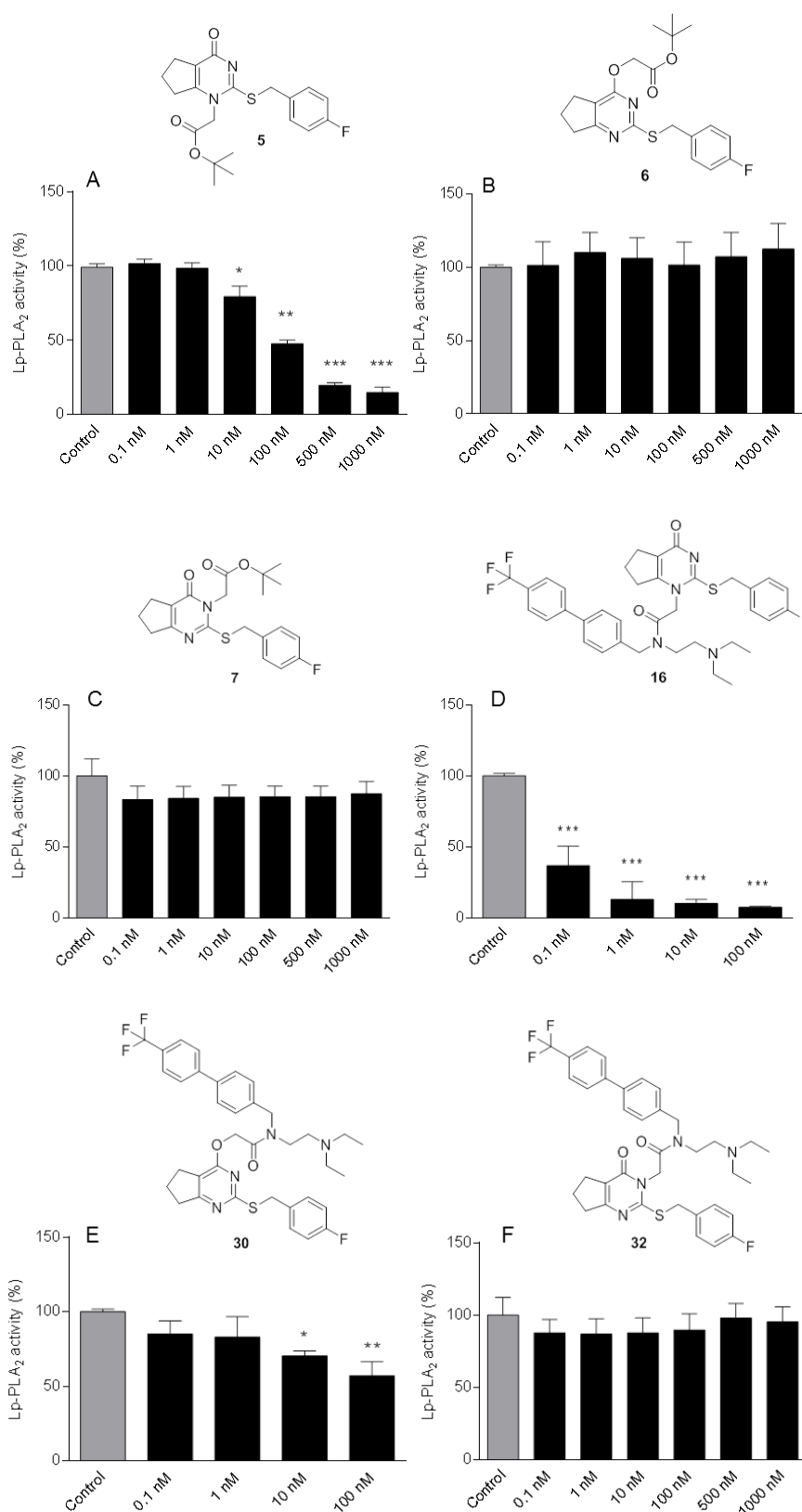


Figure 43. Test d'activité Lp-PLA₂ A : *NI*-Ester (**5**), B : *O*-Ester (**6**), C : *N3*-Ester (**7**), D : Darapladib (**16**), E : *O*-Darapladib (**30**), F : *N3*-Darapladib (**32**). Les données sont exprimées en moyennes \pm SEM (Standard Error of the Mean) de 3 expériences indépendantes effectuées en triplicat. L'évaluation statistique a été réalisée en utilisant les tests d'ANOVA et de Tukey (PRISM). Les différences significatives ont été considérées pour des valeurs de *p* inférieures à 0,05. **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,005 en comparaison au contrôle.

Nous pouvons d'ores et déjà remarquer la très forte inhibition du Darapladib ($IC_{50} < 0,1 \text{ nM}$). Le composé **5** représentant les groupes 1 et 2 présente une très bonne inhibition de la Lp-PLA₂ ($IC_{50} = 52 \pm 4 \text{ nM}$) ce qui nous amène à considérer le marquage de ce composé car plus aisé à synthétiser que le précurseur **27**. Les composés de *O*-alkylation et *N3*-alkylation **6**, **7**, **30** et **32** possèdent une très faible (voire nulle) inhibition pour la Lp-PLA₂. Ceci est en corrélation avec nos hypothèses amenant les groupes 1 et 2 comme principaux acteurs de l'interaction inhibiteur-enzyme. Étonnamment, le composé **30** présente une faible inhibition tandis que le **32** n'en présente aucune. Des études plus poussées, notamment de modélisation moléculaire de nos composés au sein du site actif de l'enzyme, pourront nous permettre de comprendre les mécanismes de reconnaissance enzyme-ligands et les différences observées entre **30** et **32**.

Néanmoins, ces résultats nous permettent de disposer de plusieurs molécules pertinentes à tester en radiomarquage mais également en imagerie. En effet, le composé **5** possède une très bonne inhibition pour la PAF-AH. Il serait donc un possible radiotraceur qui présenterait plusieurs avantages en comparaison avec le Darapladib. En effet, la réduction significative du nombre d'étapes de synthèse permet plus facilement d'accéder au précurseur. De plus, le radiomarquage d'une molécule moins complexe pourrait augmenter les rendements de marquage. D'un autre côté, les composés **6**, **7** et **32** possèdent une inhibition nulle ce qui en ferait de très bons contrôles négatifs. D'autre part le composé **30** possède une inhibition bien moins élevée que le Darapladib ou que le composé **5** ($>100 \text{ nM}$) mais resterait intéressant à tester au vu des ambiguïtés de la littérature en ce qui concerne l'alkylation de la thiouracile (certains groupes ont probablement synthétisé les composés en *O*-alkylation) (Wang, Xu *et al.* 2011, Azad, Jain *et al.* 2015). Pour des contraintes temporelles, nous avons décidé de nous focaliser sur les composés **5**, **6** et **30**. La synthèse des précurseurs des composés **6** et **30** est présentée ci-dessous (**Schéma 57**).

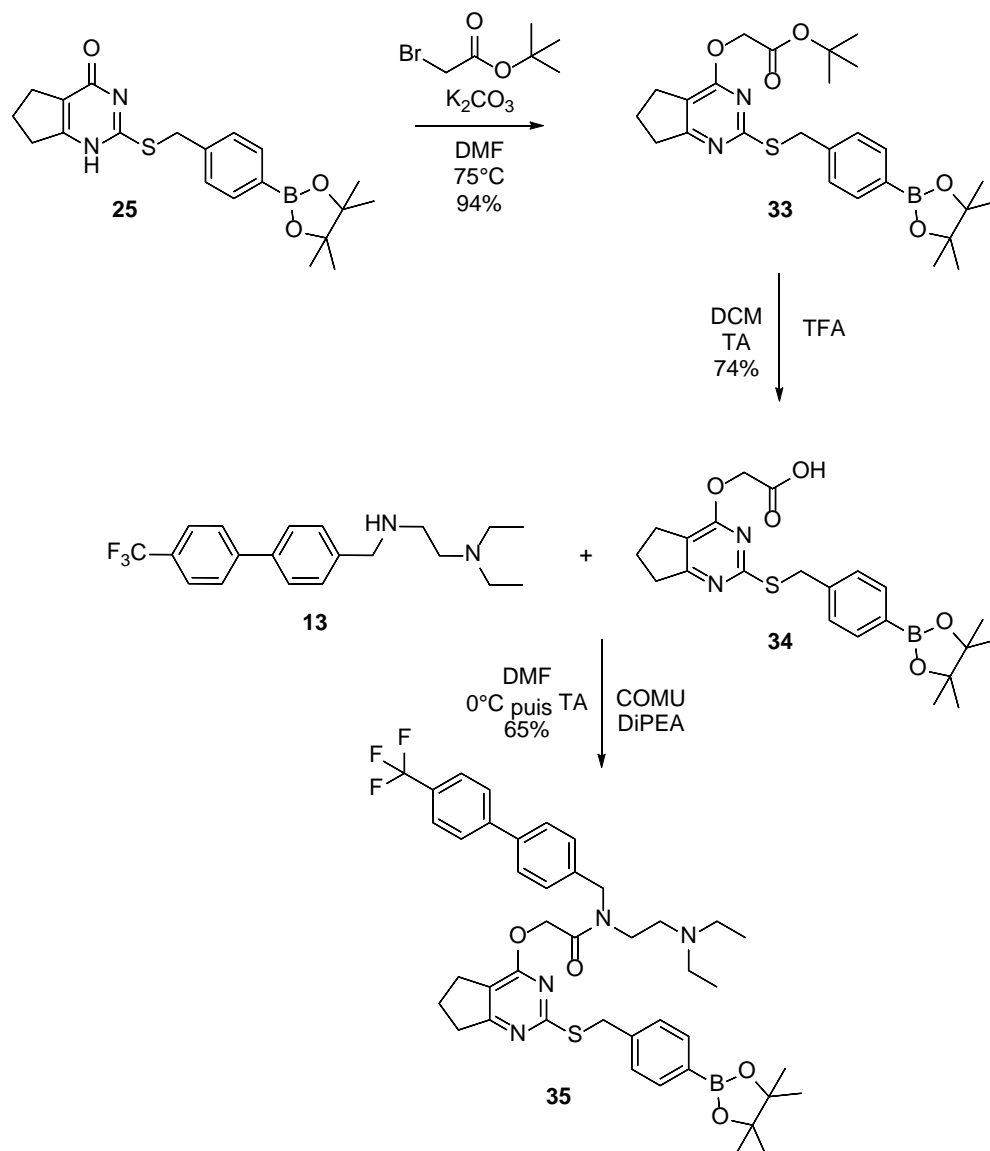


Schéma 57. Synthèse des précurseurs **33** et **35** régioisomères *O* du Darapladib.

L'alkylation sélective de **25** par le tert-butylbromoacétate sur la position *O* permet l'obtention du précurseur **33** avec un excellent rendement de 94% ($n = 3$). Son hydrolyse consécutive permet la récupération de l'acide **34** à 74% de rendement ($n = 2$). Enfin, le couplage peptidique entre **34** et **13** amène à la formation du précurseur **35** avec un rendement de 65% ($n = 3$).

4) Radiomarquages

L'un des objectifs de ce travail de thèse a été de synthétiser un radiotraceur capable de cibler les plaques d'athérome susceptibles à la rupture (vulnérables). Après avoir synthétisé les références froides et précurseurs de radiomarquage, nous nous sommes alors tournés vers la radiofluoration du Darapladib en nous appuyant sur les méthodes décrites précédemment concernant le marquage aromatique induit par le cuivre sur des composés de type boronate.

4.1 Radiomarquage du Darapladib

La méthodologie que nous avons décidé d'adopter est décrite dans le **Schéma 58**.

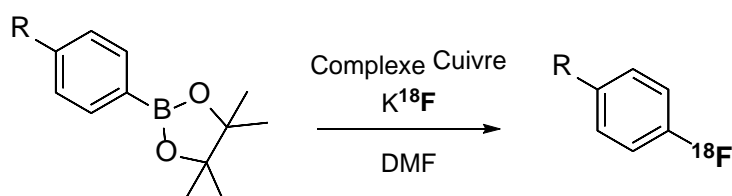


Schéma 58. Radiofluoration induite par le cuivre.

Afin de réaliser cette radiofluoration, nous avons mis au point une méthode HPLC permettant la purification du composé marqué et surtout séparant le précurseur du produit marqué et des impuretés issues du cuivre. La référence froide (Darapladib) ainsi que le radiotraceur (¹⁸F-Darapladib) possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques. Déterminer un temps de rétention pour le Darapladib nous permet de purifier le composé marqué. Parmi toutes les conditions testées, ce sont celles qui permettaient d'isoler le pic du Darapladib de celui du précurseur qui ont été conservées, à savoir un débit de 1 mL/min dans un mélange 50/50 ACN/Tampon NH₄OAc pH 6.

Après avoir déterminé les conditions optimales, nous avons engagé le précurseur dans l'étape de radiosynthèse. Nous avons travaillé sur un module GE TracerLab FX-FN automatisé (**Figure 44**).

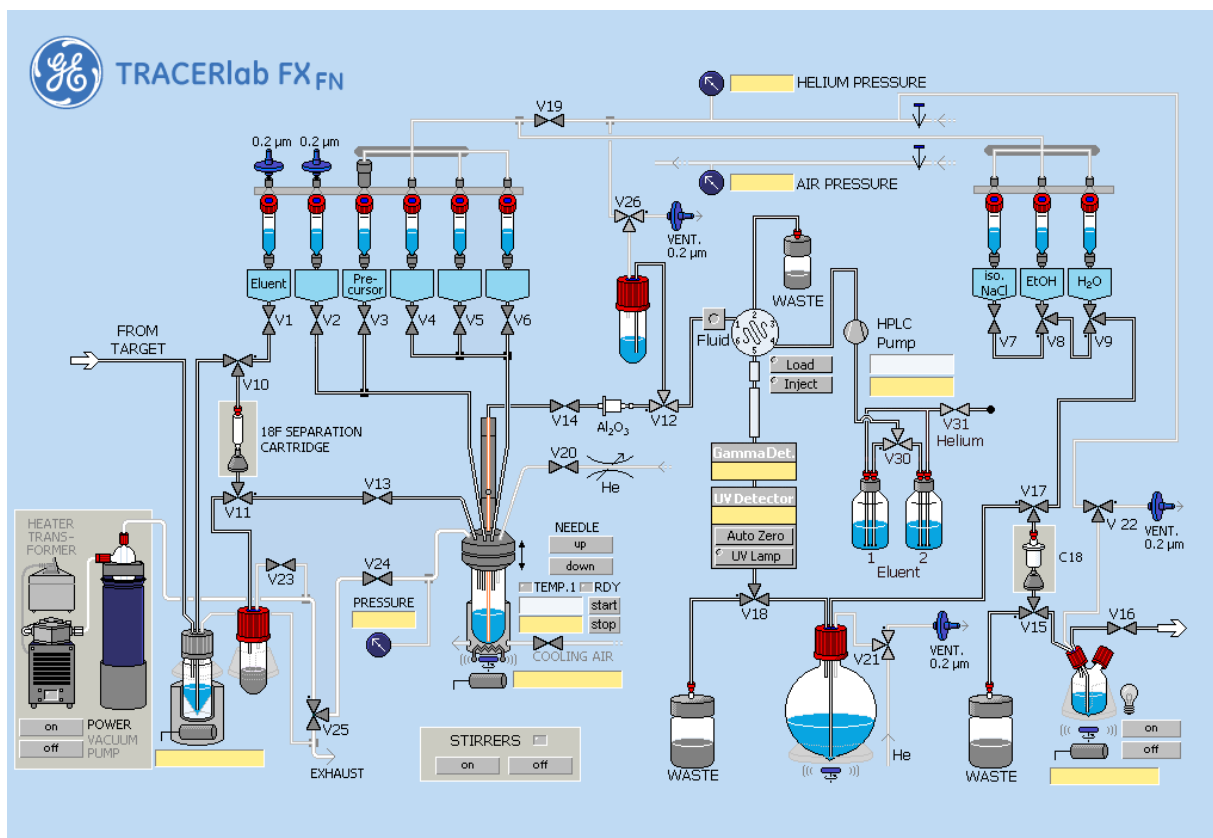


Figure 44. Module GE Tracerlab FX-FN pour la préparation de ^{18}F -Darapladib (voir détails en partie expérimentale).

Nous avons tout d'abord travaillé dans les conditions décrites par Sanford *et al.* (Mossine, Brooks *et al.* 2015). Le mécanisme supposé de cette radiofluoration est proposé dans le **Schéma 59**. Dans leurs travaux de 2013 (Ye, Schimler *et al.* 2013), l'équipe du Pr. Sanford a expliqué la formation de la liaison carbone-fluor par la présence d'un complexe de cuivre III hautement réactif et par lequel l'élimination réductrice s'effectue bien plus aisément. Cependant, d'autres études mécanistiques plus poussées sont nécessaires afin de décrire plus précisément le mécanisme de radiofluoration induite par le cuivre.

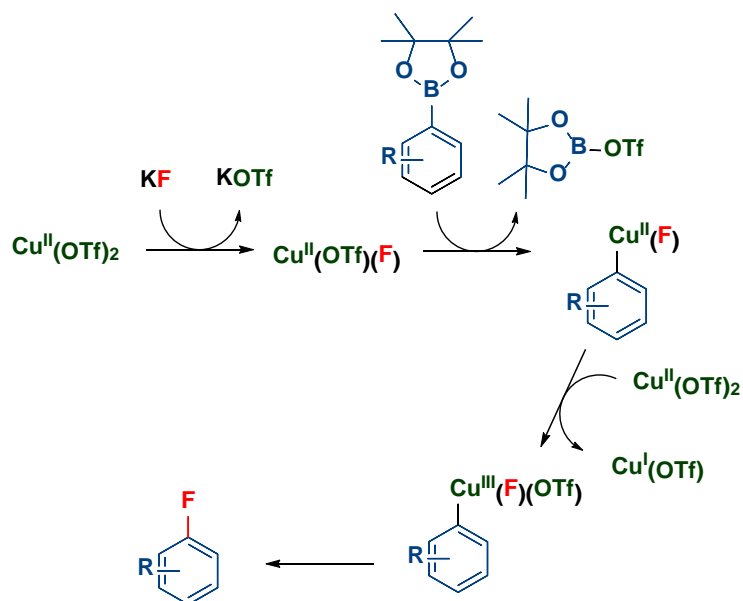


Schéma 59. Mécanisme supposé de fluoration induite par le cuivre (adapté de Ye, Schimler *et al.* 2013). Après trans-métallation, le cuivre(II) doit être oxydé en cuivre(III) beaucoup plus réactif pour effectuer l'élimination réductrice.

Le schéma général de radiomarquage est présenté en **Figure 45**.

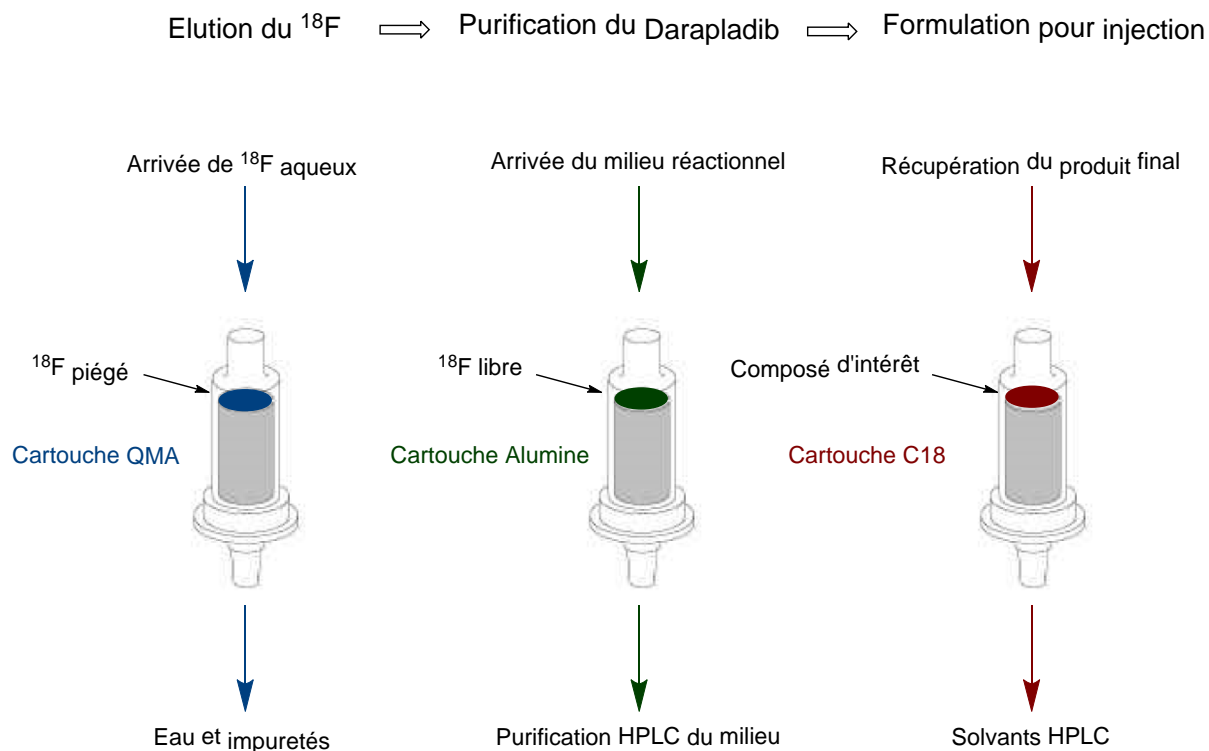
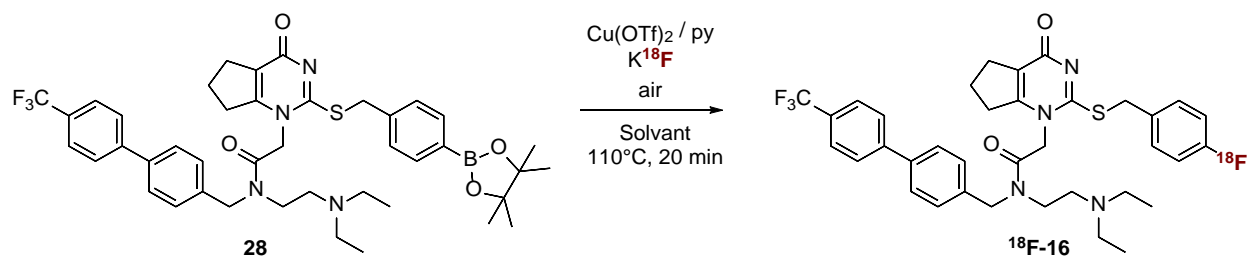


Figure 45. Schéma général de radiomarquage et utilisation des cartouches de séparation (QMA, Alumine, C18).

Dans un premier temps, il est essentiel de séparer le fluor-18 arrivant du cyclotron de l'eau et autres impuretés. Une première étape de séparation est alors nécessaire et se fait par le biais d'une cartouche QMA (Quaternary Methyl Ammonium) échangeuse d'anions permettant de piéger le fluor-18 qui est ensuite récupéré avec une solution d'élution contenant du KOTf et du K₂CO₃ (5 mg/50 µg dans 550 µL d'H₂O). Lorsque la réaction est terminée dans le réacteur, le milieu réactionnel est envoyé sur une seconde cartouche d'alumine permettant de piéger le fluor-18 libre n'ayant pas réagi. Ce qui n'est pas retenu par cette cartouche est alors injecté en HPLC préparative pour purification. A l'issue de cette étape, le pic d'intérêt est récupéré et le produit est obtenu dans un mélange 50/50 ACN/NH₄OAc pH6 correspondant à nos conditions HPLC. Une dilution est alors nécessaire dans 60 mL d'eau afin de diluer le composé et de réduire la proportion d'ACN au minimum. En effet, si cette proportion est trop importante, le composé d'intérêt (soluble dans ce solvant) ne sera pas retenu par la prochaine cartouche C18 nécessaire à l'isolation du composé.

La formulation est une étape essentielle permettant d'obtenir un radiotraceur dans une solution (habituellement de sérum physiologique NaCl 0,9%, pH 7,4) injectable à l'animal ou à l'homme. Cette formulation s'effectue par le passage sur une cartouche greffée C18 retenant le composé marqué. La cartouche est tout d'abord rincée avec du sérum physiologique afin de la nettoyer et d'éliminer les traces résiduelles de solvants organiques. Le composé d'intérêt est alors élué avec un mélange sérum physiologique/EtOH. La proportion d'EtOH doit être inférieure à 5% afin de pouvoir réaliser par la suite les injections *in vivo*. Les résultats de marquage du Darapladib sont présentés dans le **Tableau 14**.

La présence d'air est essentielle pour la réaction et notamment en ce qui concerne la réactivité du cuivre. La présence de dioxygène permet la réoxydation du cuivre I en cuivre II. L'équipe de Sanford *et al.* a montré que des complexes de cuivre I ne permettaient pas de réaliser cette radiofluoruration (Mossine, Brooks *et al.* 2015). Ainsi, de l'air a été injecté dans le réacteur 4 fois au cours de la réaction. Il est important de noter que dans les conditions décrites par Sanford *et al.* , le fluor-18 est élué avec une solution aqueuse KOTf/K₂CO₃ (5 mg/50 µg dans 550 µL d'H₂O). Une étape primordiale de l'expérience est donc l'évaporation azéotropique de l'eau (ACN) permettant de travailler dans des conditions anhydres indispensables au bon déroulement du radiomarquage.



Entrée	Solvant	Départ (MBq)	Activité avant formulation (MBq) [a]	Activité après formulation (MBq) [a]	RCY [b]
1	DMF	37000	257	75	<1%
2	NMP	40000	379	236	1%
3	NMP / n-BuOH	58000	2310	1200	6%
4	NMP / n-BuOH	52000	1979	1128	5%
5	NMP / n-BuOH	40000	/	381	1%
6	NMP / n-BuOH	56000	/	150	<1%
7	NMP / n-BuOH	35000	307	168	<1%

Tableau 13. Activités des radiomarquages du Darapladib [a] activité mesurée par l'activimètre interne de l'enceinte blindée MIP [b] RCY calculé avec une activité corrigée par la décroissance.

Les premières activités obtenues étaient très faibles (**entrée 1**) en travaillant dans les conditions décrites (DMF) et ne permettaient pas d'obtenir suffisamment d'activité pour continuer l'étude en imagerie. En réalisant le radiomarquage dans la NMP (**entrée 2**) nous n'avons pas réussi à améliorer les rendements de manière significative.

En 2017, Zichler *et al.* (Zichler, Kolks *et al.* 2017) proposent une radiofluoruration améliorée induite par le cuivre qui substitue notamment l'évaporation azéotropique de l'eau présente par l'éluion de fluor-18 piégé dans la QMA par du n-BuOH. Dans ce même article,

les auteurs montrent également des meilleurs rendements pour la NMP en comparaison avec le DMF avec 30% de n-BuOH (par rapport au volume du réacteur total). Plusieurs tests d'élution avec le n-BuOH ont été réalisés mais n'ont pas offert de rendements satisfaisants (inférieurs à 20% de l'activité de départ). Nous avons alors décidé de conserver nos conditions d'élution (550 μ L d'une solution aqueuse de KOTf/K₂CO₃ (5 mg/50 μ g)) donnant 95% de rendement. Le précurseur **28** est dissout dans un mélange de NMP/n-BuOH (0,6/0,3) et est ajouté au réacteur contenant le ¹⁸F⁻ obtenu par séchage azéotropique avec de l'ACN.

De manière intéressante, les deux premiers essais (**entrées 3 et 4**) ont permis de radiomarquer le Darapladib (composé **¹⁸F-16**) à 6 et 5% respectivement (**Figure 46**). Jusque-là, les formulations étaient réalisées de manière semi-automatique afin d'étudier précisément où se situaient les pertes de rendement. En effet, l'utilisation des pinces télescopiques de la MIP permettent le fractionnement des étapes de formulation et les mesures d'activités grâce à l'activimètre interne de l'enceinte blindée. Nous avons remarqué que le décrochage du radiotracer de la C18 se faisait avec un rendement faible en manuel (perte de 30%).

Les **entrées 5 et 6** montrent nos tentatives de formulation automatisée (décrochage avec 0,5 / 9,5 mL EtOH/sérum physiologique) qui n'ont pas permis d'améliorer les rendements. Ces chutes de rendements peuvent avoir plusieurs explications. Une dégradation de notre source de cuivre (sensible à l'humidité) ou encore la présence d'eau au sein de nos solvants (NMP, nBuOH, pyridine) sont des hypothèses non négligeables. Il est probable qu'une distillation le jour même du nBuOH ou encore de la pyridine permette d'améliorer ces rendements. Étant donné les faibles activités obtenues (**entrées 5, 6 et 7**), nous avons été contraints de modifier l'étape de formulation. Pour ce faire, le composé d'intérêt est élué de la C18 avec 100% d'EtOH (1,5 mL). Cette solution est ensuite évaporée à sec à 60°C puis le composé est ensuite dissout dans notre solution de formulation type (5% d'EtOH dans du sérum physiologique) dont le volume sera ajusté afin d'avoir l'activité nécessaire lors de la préparation des différentes seringues d'injection. Malgré ces modifications de protocole, les rendements obtenus restent faibles et l'élucidation de cette perte de RCY devra être menée (cuivre, solvants anhydres) afin de pouvoir synthétiser le ¹⁸F-Darapladib avec de meilleurs rendements.

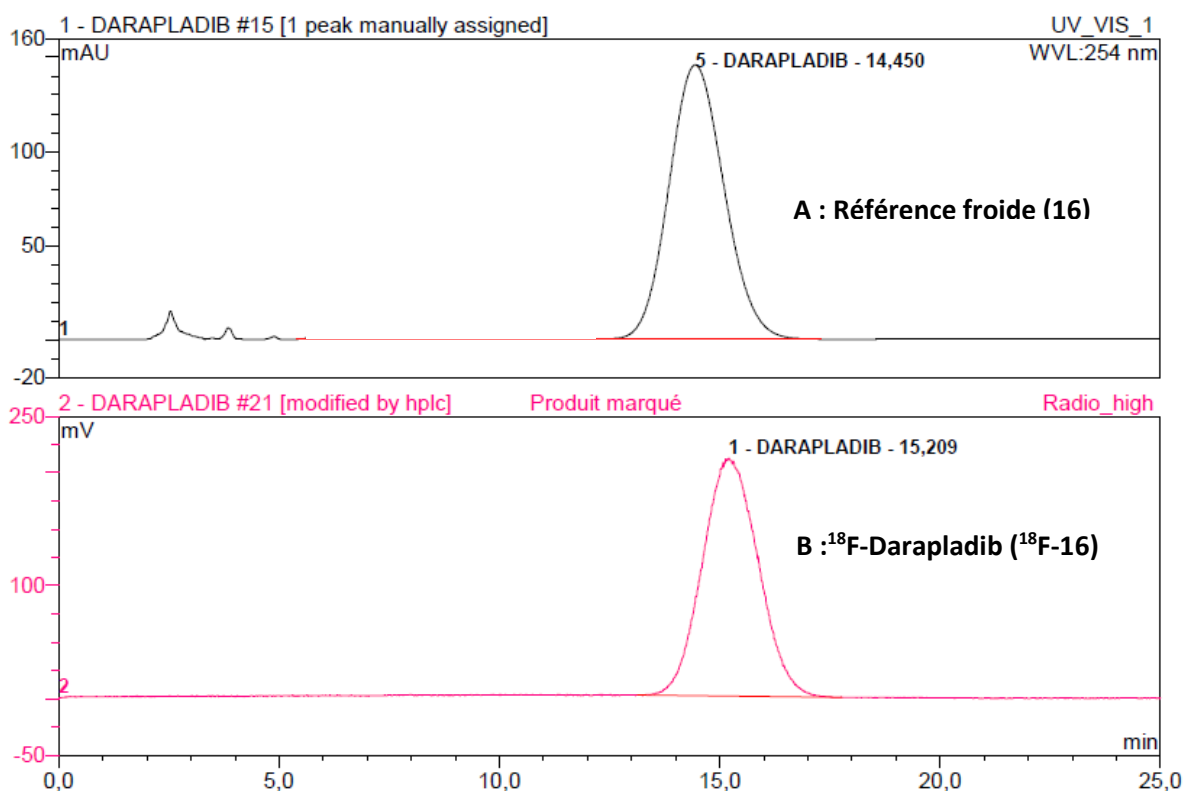


Figure 46. Profils HPLC analytique (UPLC Dionex Ultimate 3000 ; colonne : Gemini C₁₈ 250 × 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex), elution isocratique : NH₄OAc 0.1M (pH 6)/MeCN ; débit : 1 or 1.5 ml/min; température ambiante). **A.** Profil UV du Darapladib froid ; **B :** Profil radio ¹⁸F-Darapladib. Il est à noter que la différence entre les temps de rétention correspond au décalage des mesures entre les deux détecteurs UV et radio.

Le produit ¹⁸F-16 est obtenu avec une pureté radiochimique de plus de 98% (n = 11). Il est cependant important de vérifier la possible dégradation du produit dans la solution d'injection mais également dans du plasma humain où le composé se retrouve en interaction avec de nombreuses molécules et notamment les protéines. Nous avons donc réalisé des études de stabilité (**Figure 47**).

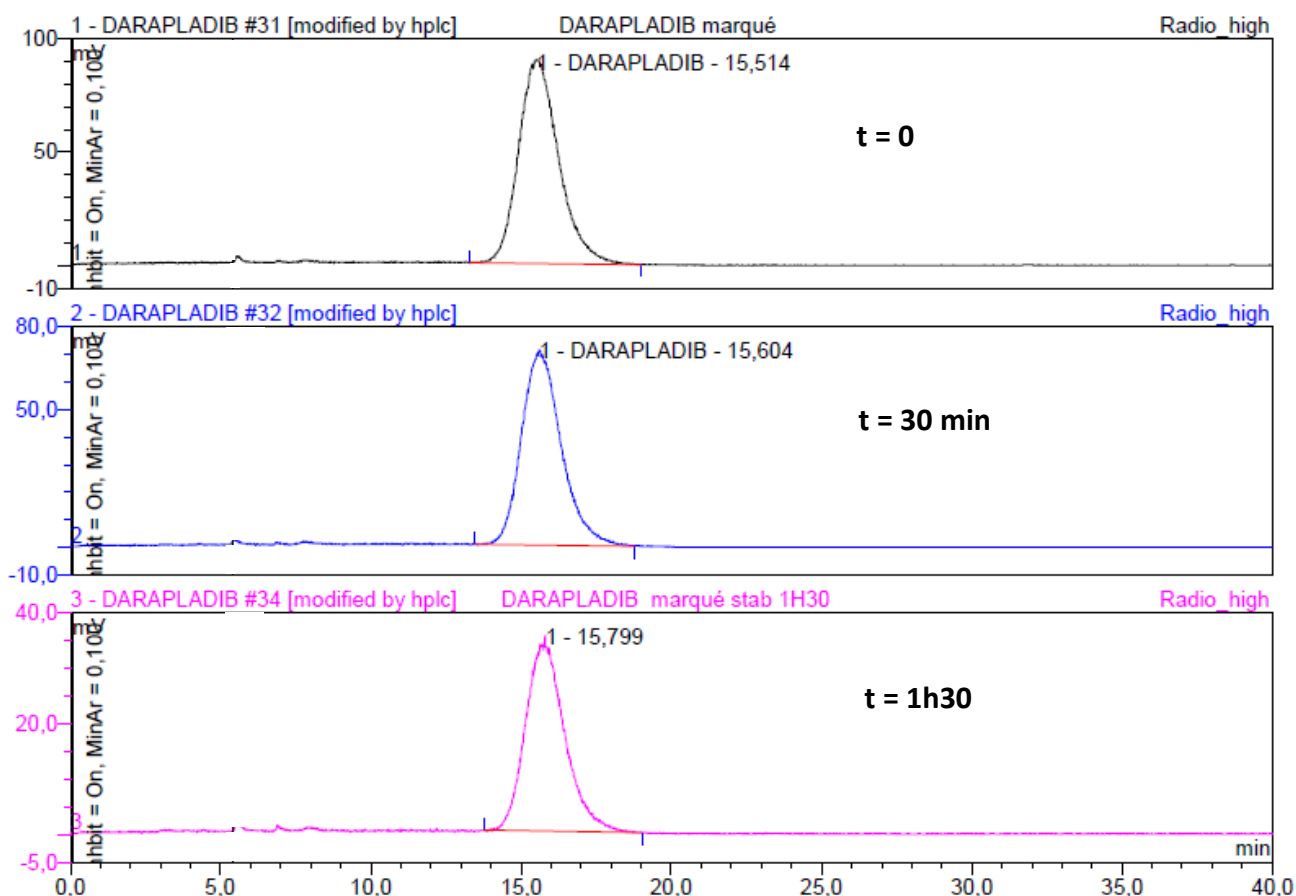


Figure 47. Stabilité du ^{18}F -Darapladib marqué dans la solution d'injection EtOH/sérum physiologique.

Les études en radio-HPLC ont montré que le produit était stable dans la solution d'injection (EtOH 5%/sérum physiologique) à différents temps (0, 30 et 90 min) et pouvait être engagé dans les expériences d'imagerie *in vivo* et *ex vivo*. Pour des raisons techniques, les données de stabilités plasmatiques ne sont pas encore disponibles et sont en cours.

4.2 Radiomarquage des analogues structuraux

Comme décrit précédemment (Chapitre 4, partie 3), nous avons synthétisé plusieurs analogues structuraux du Darapladib dont l'affinité pour la Lp-PLA₂ a été testée. Afin de confirmer les résultats de radiomarquage du Darapladib (notamment de solvant), nous avons engagé les premiers précurseurs dans les conditions originelles de la littérature.

Parmi les produits synthétisés, nous avons engagé les deux composés présentant des inhibitions envers la Lp-PLA₂ (**Schéma 60**).

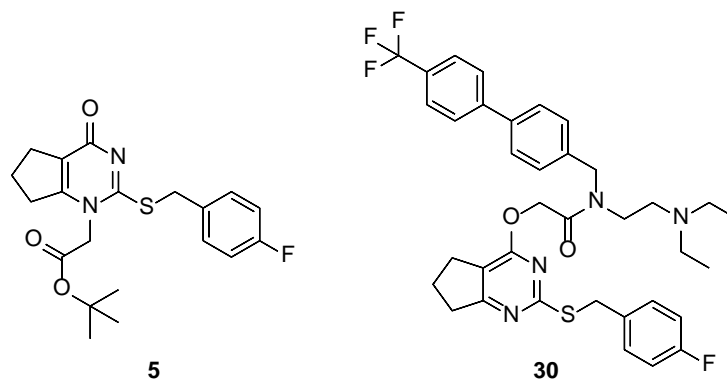


Schéma 60. Structures des analogues **5** et **30**.

Nous avons au préalable déjà synthétisé les précurseurs de radiomarquage de ces composés qui ont alors été radiomarqués par radiofluoration induite par le cuivre (**Schéma 61**).

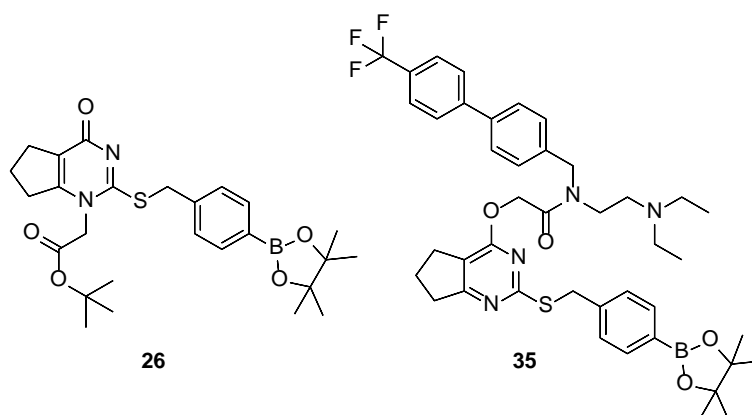
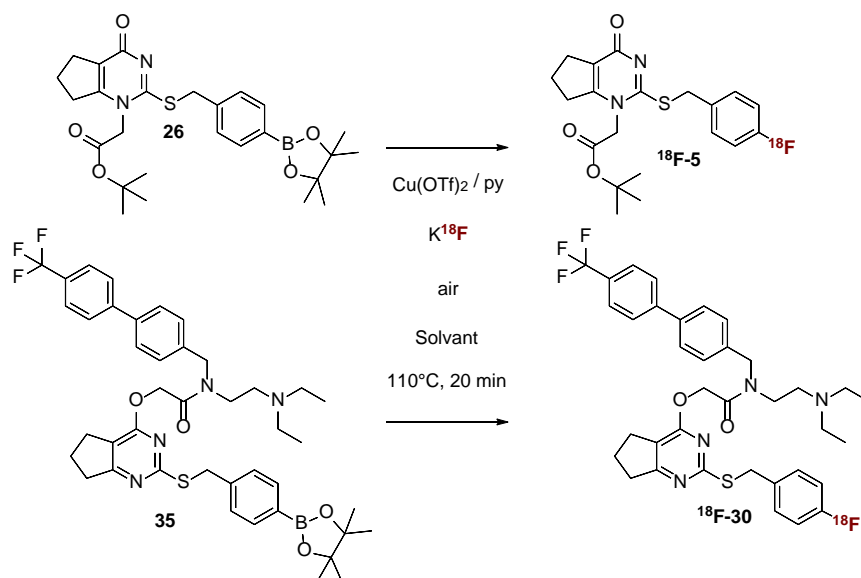


Schéma 61. Structures des précurseurs de marquage **26** et **35**.

Les résultats des différents radiomarquages réalisés sont présentés dans le **Tableau 14**.



Entrée	Précurseur	Solvant	Départ (MBq)	Activité après formulation (MBq) [a]	RCY [b]
1	26	DMF	44000	1774	5%
2	26	DMF	53000	1440	3%
3	26	NMP / n-BuOH	49000	3574	9%
4	35	DMF	53000	25	traces
5	35	DMF	52000	26	traces
6	35	NMP / n-BuOH	44000	520	1%

Tableau 14. Activités des radiomarquages des composés **26** et **35** [a] activité mesurée par l'activimètre interne de l'enceinte blindée MIP [b] RCY calculé avec une activité corrigée par la décroissance.

Les résultats de radiomarquage montrent les mêmes tendances que celles obtenues concernant le Darapladib. En effet, en passant du DMF à un mélange NMP/n-BuOH (0.6/0.3 v/v), les rendements ont été améliorés en particulier en ce qui concerne le précurseur **26**. Cependant, les rendements de marquage du composé **35** sont très faibles et l'utilisation d'un mélange NMP/n-BuOH permet d'augmenter légèrement ces rendements. Ces faibles

radiomarquages peuvent être éventuellement expliqués par la présence d'eau possible dans les solvants utilisés ou encore la dégradation possible de notre source de cuivre.

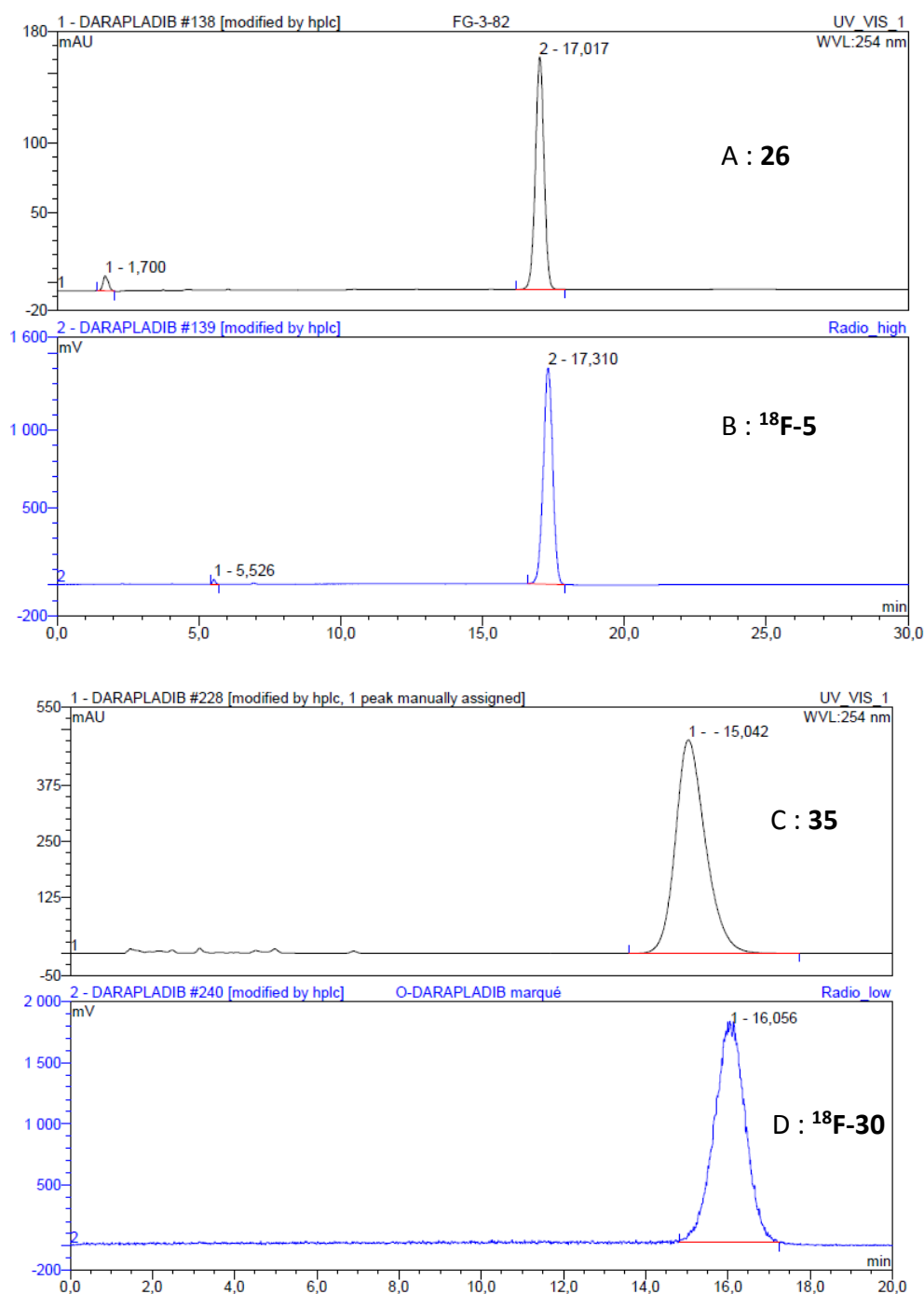


Figure 48. Profils HPLC analytique (UPLC Dionex Ultimate 3000 ; colonne : Gemini C₁₈ 250 × 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex), élution isocratique : NH₄OAc 0.1M (pH 6)/MeCN ; débit : 1 or 1.5 ml/min; température ambiante). **A** : Profil UV du composé **26**; **B** : Profil radio du composé **¹⁸F-5** ; **C** : Profil UV du composé **35**; **D** : Profil radio du composé **¹⁸F-30**. Il est à noter que la différence entre les temps de rétention correspond au décalage des mesures entre les deux détecteurs UV et radio.

Nous avons pu remarquer que le marquage de l'ester **26** s'effectue avec de bien meilleurs rendements en comparaison avec la molécule complète (indépendamment du site d'alkylation). À l'inverse du Darapladib et du composé ^{18}F -**30**, l'ester ^{18}F -**5** ne possède pas d'amine en position benzylique. Nous sommes dans des conditions oxydantes en présence de cuivre et une hypothèse serait que cette position benzylique soit oxydée dans nos conditions réactionnelles entraînant une compétition lors de l'étape de radiomarquage et diminuant ainsi les rendements (Chen, Wang et al. 2015).

Nous avons ensuite étudié la stabilité dans une solution sérum physiologique/EtOH (5%) de nos deux composés (**Figure 49** et **50**).

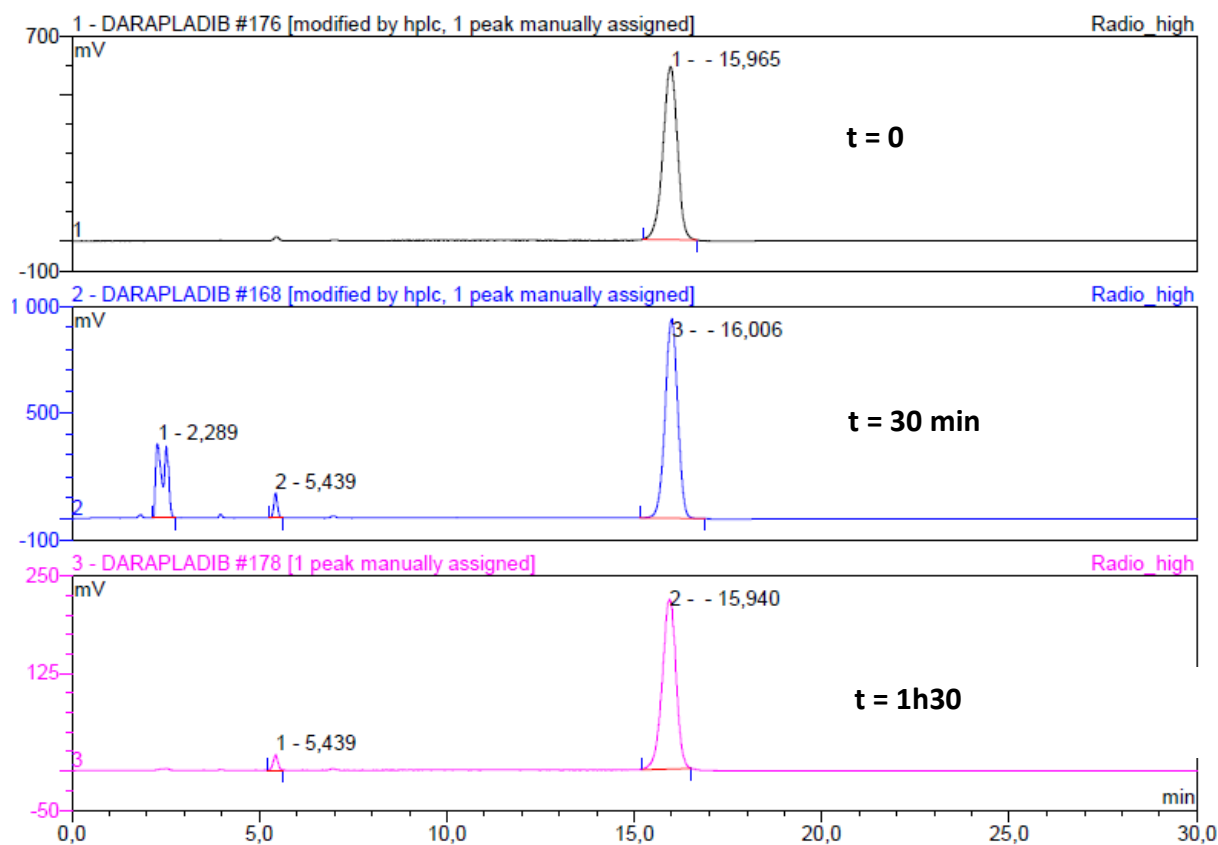


Figure 49. Stabilité du composé ^{18}F -**5** dans la solution d'injection EtOH/sérum physiologique.

Nous pouvons remarquer qu'à 30 minutes une impureté est détectée (2,289 minutes) mais n'est plus présente à 1h 30min. Il est possible qu'elle ait été présente dans la boucle d'injection et ne soit pas issue de notre composé. La molécule semble stable en tampon et

injectable en modèle animal *in vivo* puisqu'aucune impureté notable n'est observée à 1h 30min.

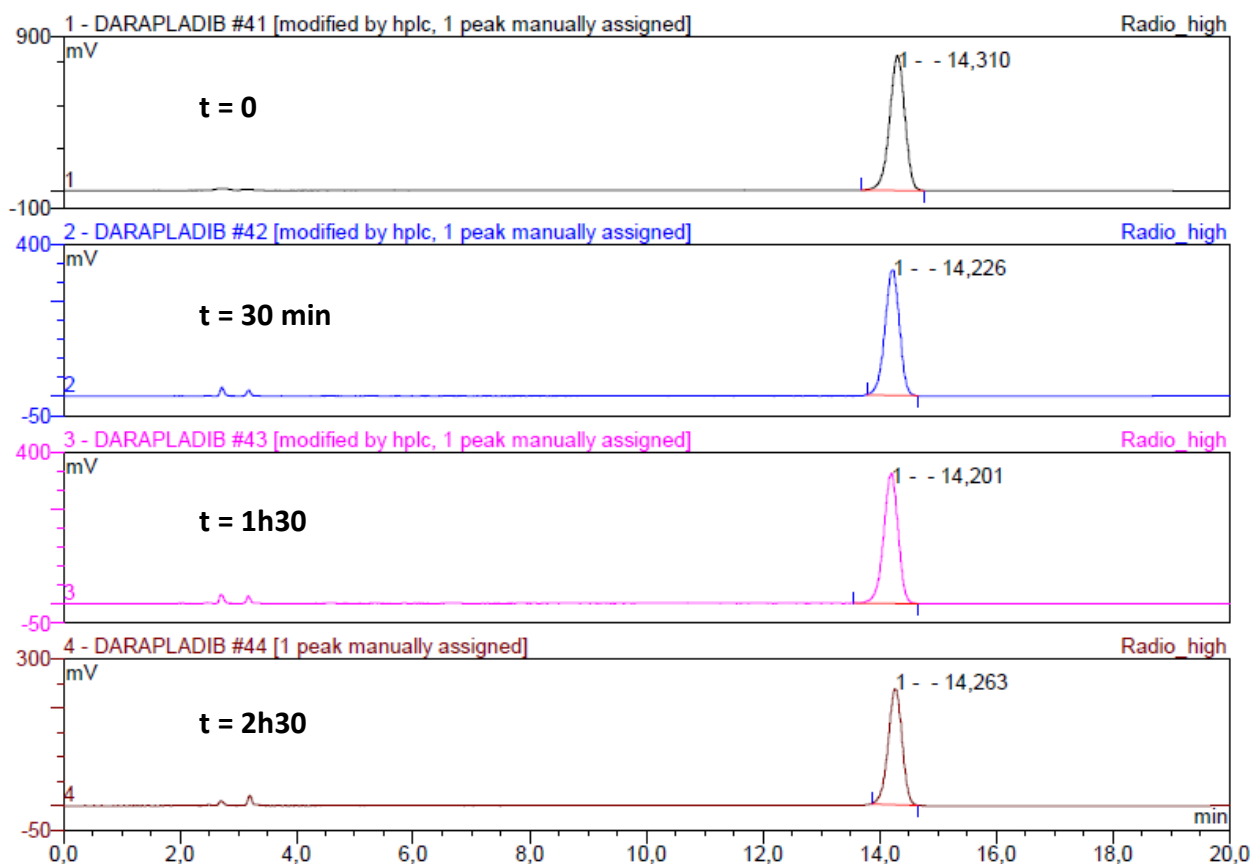


Figure 50. Stabilité du composé ^{18}F -30 dans la solution d'injection EtOH/sérum physiologique.

Nous pouvons voir, sur la **Figure 50**, que le composé ^{18}F -30 est stable jusqu'à 2h 30min et aucune impureté n'est détectable. Après étude de sa stabilité dans le plasma, nous pourrions procéder à son utilisation en imagerie sur petit animal.

Nous avons par la suite réalisé des marquages préliminaires concernant l'ester **33** et les résultats sont présentés ci-dessous (**Schéma 62**).

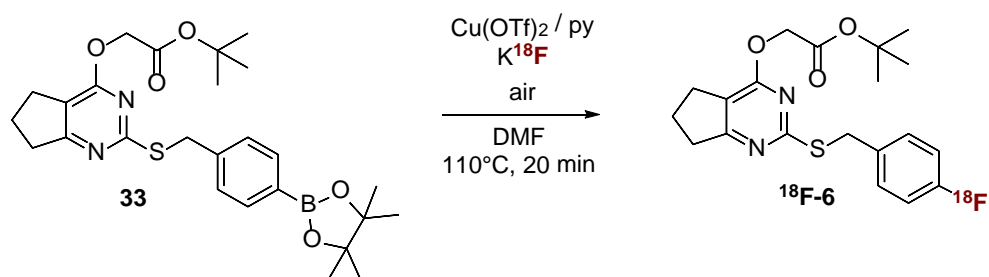


Schéma 62. Radiomarquage du composé **33**.

Nous n'avons réalisé actuellement que deux radiomarquages nous ayant permis d'obtenir la molécule $^{18}\text{F-6}$ avec des rendements de 7 et 1% (41000 et 37000 MBq d'activités de départ). Il est nécessaire d'étudier ce radiomarquage (dans les conditions de Zichler *et al.*) et plus particulièrement ses rendements ainsi que leur évolution.

Les différents composés ainsi synthétisés devront être ensuite injectés dans nos modèles animaux et les résultats devront être confrontés avec l'imagerie utilisant le Darapladib. Le composé $^{18}\text{F-6}$ pourra nous servir de contrôle négatif (puisque absence d'inhibition de la Lp-PLA₂) et nous permettra de vérifier la spécificité du Darapladib. En effet, il est possible que la structure de la molécule (qui reste proche de celle du Darapladib) soit reconnue par une autre cible. Les molécules $^{18}\text{F-5}$ et $^{18}\text{F-30}$ pourraient (en fonction de l'imagerie) substituer le Darapladib puisque leur synthèse est bien plus performante et leurs radiomarquages sont identiques voire meilleurs que ceux du Darapladib.

Chapitre IV : Imagerie de la plaque d'athérome

1) Modèles animaux

1.1 Modèle d'inflammation : mélanome murin B16

Nous avons montré précédemment dans quelle mesure la Lp-PLA₂ était une cible de choix dans l'imagerie de la plaque d'athérome vulnérable. En effet, elle est synthétisée par les macrophages et transportée par les lipoprotéines qui peuvent s'accumuler dans les cœurs lipidiques des plaques. Avant de tester le Darapladib dans un modèle d'athérome, nous avons opté pour un modèle plus caricatural, qui nous permettrait de visualiser une possible accumulation de Lp-PLA₂ de manière très focale. En effet, nous avons émis l'hypothèse que nous pourrions cibler la Lp-PLA₂ présente au niveau des tumeurs en marquant les macrophages présents (Banciu, Metselaar *et al.* 2008).

Le modèle choisi a alors été le mélanome murin issu de cellules B16. Après injection sous-cutanée, les B16 forment une tumeur entre 5 et 10 jours et vont atteindre 1 cm³ entre 14 et 21 jours (Overwijk and Restifo 2001). Après injection des cellules, nous avons réalisé l'imagerie des souris avec injection de ¹⁸F-Darapladib 11 jours après induction tumorale. Les images sont présentées en **Figure 51**.

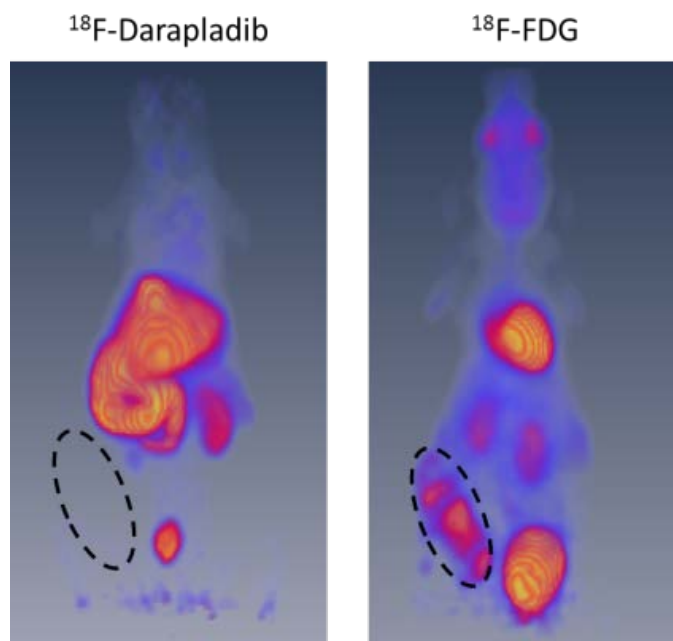


Figure 51. Imagerie PET de tumeurs B16 de mélanome murin par injection de ¹⁸F-Darapladib et ¹⁸F-FDG. Les images sont représentatives d'expériences réalisées au moins en triplicata (voir partie expérimentale).

Comme indiqué sur la **Figure 51**, aucune accumulation notable n'a pu être observée avec le ^{18}F -Darapladib. En revanche, le ^{18}F -FDG a montré une très forte accumulation au sein des tumeurs. En effet, les cellules tumorales ont une grande appétence pour le glucose et le ^{18}F -FDG est un traceur reconnu dans l'imagerie de tumeurs chez l'homme (Almuhaideb, Papathanasiou *et al.* 2011). Cependant, l'absence de marquage du ^{18}F -Darapladib pour les tumeurs est inattendue et une histologie précise des tumeurs (notamment via l'anticorps F8/40) pourra nous permettre d'expliquer ce résultat.

1.2 Modèle ApoE -/-

Les murins représentent de mauvais modèles pour étudier l'athérosclérose car ils transportent essentiellement leur cholestérol dans des HDL, à l'inverse de l'homme (LDL). L'apolipoprotéine E ou ApoE est présente à la surface de plusieurs types de lipoprotéines (comme les VLDL et les chylomicrons) qui, suite à un remodelage plasmatique par des lipoprotéines-lipases (formation de « remnants »), vont être recaptées par le foie via des récepteurs spécifiques. L'absence d'ApoE limite donc la clairance de ces lipoprotéines et du cholestérol qu'elles transportent. Par voie de conséquence, les taux de LDL et VLDL sont augmentés, favorisant ainsi leur accumulation dans la paroi des artères de gros calibre comme l'aorte. Les dépôts de lipides au sein du circuit vasculaire peuvent être observés 3 mois après la naissance (Tamminen, Mottino *et al.* 1999).

En dépit de l'usage intensif de ce modèle, il présente plusieurs désavantages. Le cholestérol plasmatique est principalement transporté par les « remnants » plutôt que par les LDL en comparaison avec l'humain. De plus, l'ApoE possède d'autres fonctions affectant le rôle biologique des macrophages et la fonction immunitaire qui peuvent avoir un possible impact sur l'athérogenèse indépendant des niveaux lipidiques plasmatiques (Getz and Reardon 2009). En comparaison, le modèle invalidé pour le récepteur aux LDL (LDLr KO) influence principalement les niveaux lipidiques contrairement à l'ApoE qui possède diverses fonctions dans l'organisme (Barcat, Amadio *et al.* 2006).

Une autre solution serait d'utiliser des modèles animaux dont les profils lipidiques sont proches de l'homme et pour lesquels l'administration d'un régime riche en graisses serait suffisante au développement de plaques athérosclérotiques (modèle de cochon ou encore de cochon d'Inde) (Fernandez and Volek 2006) (Xiangdong, Yuanwu *et al.* 2011). (**Figure 52**).

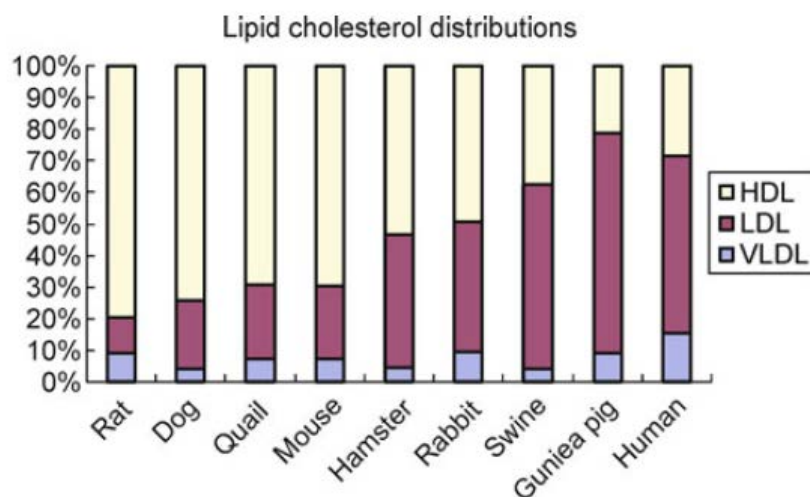


Figure 52. Profils lipidiques de cholestérol dans divers modèles animaux en comparaison à l'homme (Xiangdong, Yuanwu *et al.* 2011).

Au vu des moyens à notre disposition, nous nous sommes tournés vers le modèle murin le plus utilisé de la littérature et disponible au laboratoire (KO ApoE). Les souris ApoE $-/-$ ont été élevées pendant 18-20 mois sous régime normal puis ont été injectées avec du ^{18}F -Darapladib et ^{18}F -FDG.

L'imagerie a été réalisée sous anesthésie sur 1h avec 4 acquisitions de 15 minutes afin d'étudier le temps optimal d'imagerie. Le contrôle négatif utilisé est la lignée C57Bl6 qui possède le même fond génétique que les ApoE $-/-$ mais sans l'invalidation du gène (voir partie expérimentale). Les résultats sont présentés en **Figure 53**.

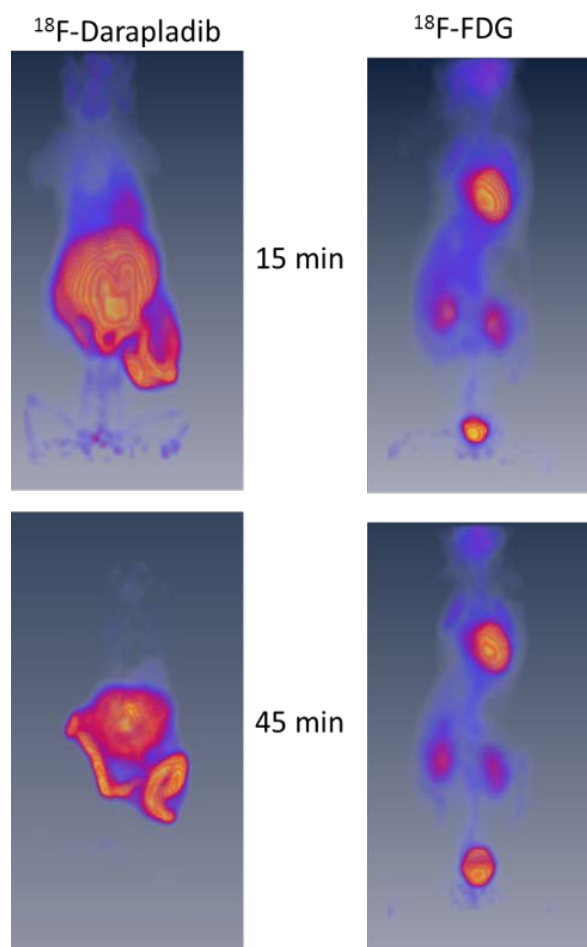


Figure 53. Imagerie corps entier du ^{18}F -FDG et ^{18}F -Darapladib sur un modèle murin d'athérome (ApoE $-/-$).

Nous n'avons pas observé de différence significative entre 15, 30, 45 et 60 minutes. Le temps optimal d'imagerie a alors été fixé à 15 minutes pour les expériences suivantes. L'injection de ^{18}F -FDG et l'imagerie TEP associée montrent une accumulation dans le cœur, les reins, la vessie et le cerveau. En effet, les principaux organes consommateurs de glucose sont le cœur et le cerveau. L'accumulation dans le circuit urinaire est la voie métabolique de dégradation du FDG. Aucune accumulation n'est visible dans le système circulatoire. Le ^{18}F -Darapladib montre une accumulation intense dans le foie, les reins et les intestins. Un marquage peu intense est observé au niveau du cœur. Comme montré précédemment (Dave, Nash *et al.* 2014), la principale voie métabolique de dégradation du Darapladib s'effectue par les fèces ce qui explique l'accumulation dans l'intestin grêle et le gros intestin. Dans cette étude, l'administration de Darapladib s'effectue par voie IV ou orale. Les auteurs ont observé des métabolismes similaires à savoir une accumulation dans les fèces et les urines. Ils postulent qu'une sécrétion biliaire et intestinale soit responsable de la présence de Darapladib

et de ses métabolites dans les intestins. Ces résultats se corrélient avec nos résultats d'imagerie. L'accumulation dans le foie, quant à elle, peut s'expliquer par la voie métabolique empruntée par les lipoprotéines. En effet, l'efflux de cholestérol vers le foie est réalisé par les HDL. Chez la souris, la majorité de la Lp-PLA₂ est transportée par les HDL qui retournent au foie, pouvant ainsi expliquer le marquage hépatique intense. De la même façon que pour le FDG, aucune accumulation notable n'a été observée dans le système circulatoire. Afin d'observer une possible accumulation dans les artères, l'aorte et le cœur des animaux ont été prélevés puis imagés pendant 15 minutes. Les aortes ont ensuite été conservées dans du sérum physiologique puis disséquées afin d'observer une possible corrélation entre l'imagerie (accumulation de ¹⁸F-Darapladib) et les clichés macroscopiques (présence de plaques) (**Figure 54**). L'adventice et le tissu adipeux péri-aortique sont éliminés puis l'aorte est ouverte longitudinalement. Après fixation sur une surface noire, les photos macroscopiques sont prises, permettant d'évaluer la localisation et la surface des plaques (blanches).

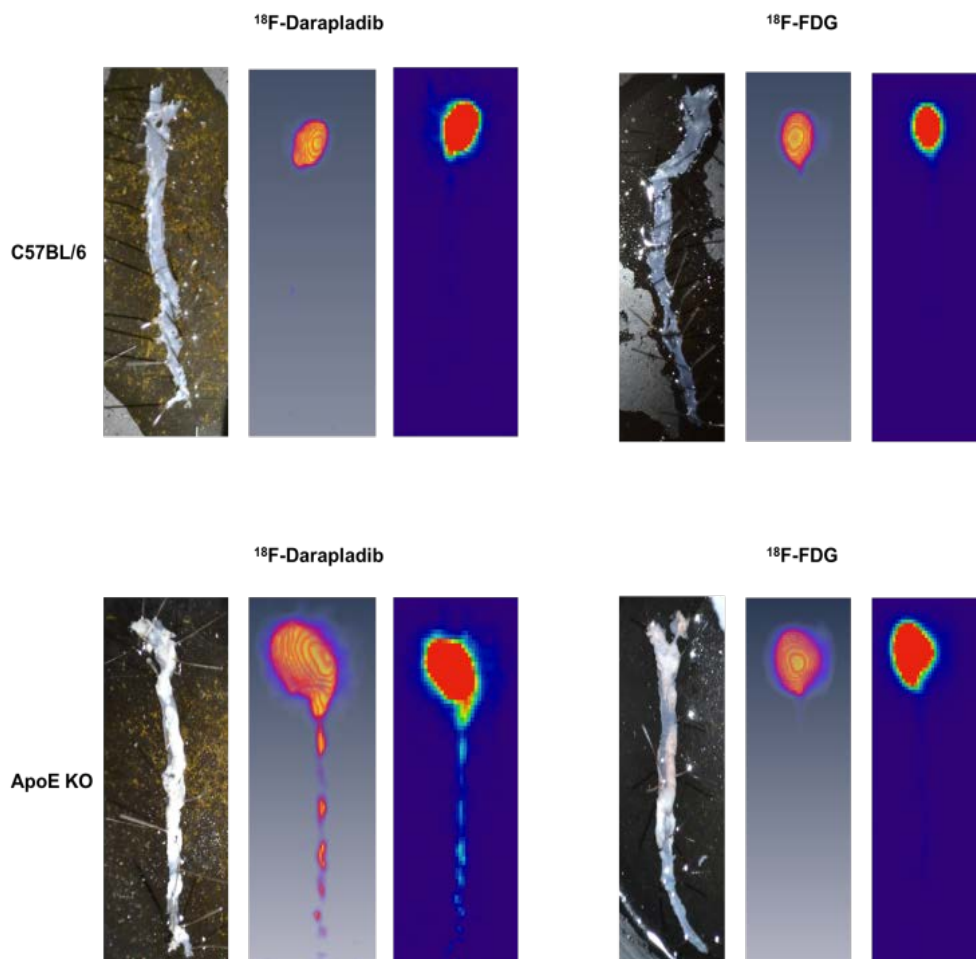


Figure 54. Imagerie des aortes et cœurs des souris C57BL/6 et KO ApoE après injection de ¹⁸F-Darapladib et ¹⁸F-FDG.

Les clichés macroscopiques des souris C57BL/6 montrent l'absence de plaques d'athérome et l'imagerie obtenue corrèle ces observations. Aucune accumulation n'est observée au niveau des deux aortes après injection de Darapladib ou de FDG. Cependant, les clichés macroscopiques de souris ApoE $-/-$ montrent la présence de nombreuses lésions athéromateuses et de plaques au niveau notamment de la crosse aortique et le long du vaisseau lui-même (en blanc). Le ^{18}F -FDG ne montre aucune accumulation tant chez le contrôle que chez la souris ApoE $-/-$. *A contrario*, le ^{18}F -Darapladib montre une accumulation au niveau de la crosse aortique ainsi que le long de l'aorte en corrélation avec les clichés macroscopiques. Cette expérience permet de mettre en évidence une possible efficacité du Darapladib comme traceur dans ce modèle d'athérosclérose.

2) Expériences sur carotides humaines

Pour terminer, nous avons travaillé sur des pièces d'endartériectomie humaines et plus particulièrement sur des carotides athérosclérotiques. Après avoir étudié des modèles murins, nous avons entrepris des études *ex vivo* chez l'homme. Grâce à une collaboration avec le service de chirurgie vasculaire de la Clinique de Sainte-Clotilde et du CHU (Centre Hospitalier Universitaire) de la Réunion, nous avons eu accès aux pièces chirurgicales après opérations. Les carotides sont récupérées dans du milieu stérile puis disséquées avant imagerie. Ces pièces chirurgicales sont alors incubées avec les radiotraceurs (20-30 MBq) pendant 1h à 37°C. Elles sont consécutivement lavées 3 fois pendant 5 minutes avec du sérum physiologique puis imagées pendant 15 minutes. Les résultats sont présentés dans la **Figure 55**.

Nous pouvons observer un marquage intense du ^{18}F -Darapladib au sein des parties non compliquées et compliquées des carotides. En revanche, le ^{18}F -FDG ne montre qu'une faible accumulation de traceur au sein de la partie compliquée ; la partie non-compliquée ne présentant pas de marquage détectable. La partie non-compliquée est principalement lipidique en comparaison à la partie compliquée thrombosée. Ces résultats suggèrent une efficacité de marquage du Darapladib. Les études histologiques en cours permettront de déterminer une possible corrélation entre présence de Lp-PLA₂ et marquage par notre traceur au sein des pièces chirurgicales.

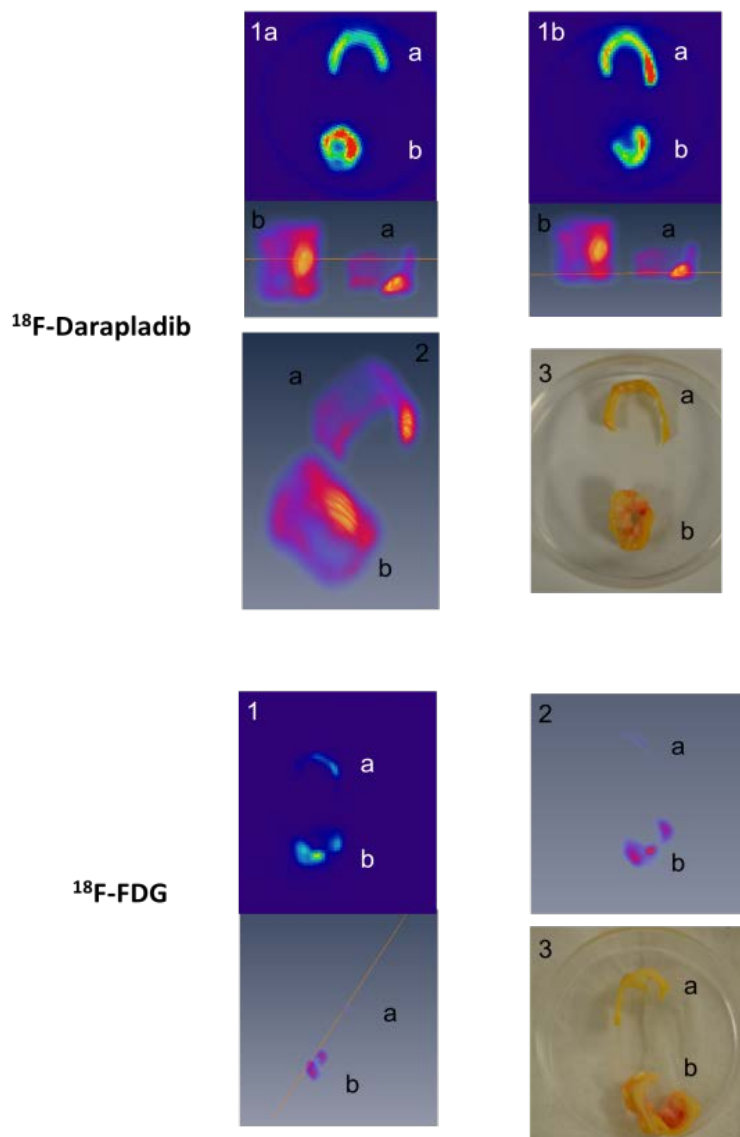


Figure 55. Comparaison entre ^{18}F -Darapladib et ^{18}F -FDG dans des échantillons de carotides humaines. a) Partie non compliquée; b) Partie compliquée. 1) Orthoslice associée avec la vue 3D de la coupe en orange; 2) Vue 3D complète; 3) Vue macroscopique.

3.3 Conclusion

En conclusion de toutes ces expériences, nous avons montré la capacité supérieure du Darapladib à se fixer dans des aortes de souris ApoE $^{-/-}$ présentant des plaques mais également sur des pièces pathologiques d'endartériectomie humaines (carotides) en comparaison avec le ^{18}F -FDG. Si les résultats obtenus sont plus qu'encourageants, c'est en situation *in vivo* chez l'homme que nous saurons si le Darapladib est un radiotraceur efficace permettant détecter des plaques d'athérosclérose précoces ou avancées.

Conclusion générale

Bien que l'athérosclérose et en particulier ses complications soient responsables de nombreux décès dans les sociétés industrialisées, l'effort constant des chercheurs tant en synthèse qu'en imagerie permet de développer des nombreux outils prometteurs pour le diagnostic et le suivi de cette pathologie.

De nombreux groupes travaillent à l'heure actuelle sur des radiotraceurs TEP pouvant permettre l'étude, la détection et la compréhension de l'athérosclérose en ciblant la TSPO avec le ^{11}C (Laitinen, Marjamaki *et al.* 2009, Gaemperli, Shalhoub *et al.* 2012), les récepteurs SST-2 avec le ^{68}Ga (Rominger, Saam *et al.* 2010, Mojtahedi, Alavi *et al.* 2015) ou encore la calcification avec le Na^{18}F (Joshi, Vesey *et al.* 2014, Fiz, Morbelli *et al.* 2015). Cependant, à l'heure actuelle, aucune méthode non-invasive utilisée en clinique ne permet la détection de plaques d'athérome précoces et l'enjeu de notre projet est de trouver un radiotraceur TEP capable de remplir cette fonction. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons synthétisé un inhibiteur de la Lp-PLA₂, une enzyme particulièrement impliquée dans l'athérosclérose : le Darapladib. Bien que le Darapladib ait été initialement développé en tant que médicament, nous avons détourné son utilisation à des fins diagnostiques. Nous avons utilisé la très forte affinité de ce composé pour la Lp-PLA₂, enzyme pro-athérogène et particulièrement présente au sein des lésions athérosclérotiques (Karabina and Ninio 2015). La Lp-PLA₂ est une enzyme transportée par les lipoprotéines (LDL et HDL) et les dépôts lipidiques dans les artères sont les premiers signes d'un développement de plaques. Il nous a semblé judicieux de cibler cette enzyme afin de visualiser ces accumulations de LDL afin d'évaluer la formation de plaques.

Nous avons réalisé le radiomarquage du Darapladib au ^{18}F ainsi que celui de trois analogues structuraux. Nous avons ensuite injecté notre radiotraceur ^{18}F -Darapladib puis réalisé l'imagerie dans deux modèles murins (préalablement développés) en TEP afin d'observer une possible accumulation de traceur dans des plaques d'athérome et dans des tumeurs. Nous avons également réalisé des études *ex-vivo* sur des pièces d'endartériectomie humaines par incubation de notre radiotraceur avec des carotides. Toutes ces études ont été réalisées en comparant nos résultats avec le traceur de référence pour l'imagerie TEP le ^{18}F -FDG également utilisé dans le diagnostic de l'athérosclérose (Masteling, Zeebregts *et al.* 2011, Muller, Viaccoz *et al.* 2014).

Nous avons tout d'abord montré que la littérature entourant la synthèse du Darapladib présentait plusieurs ambiguïtés. En effet, l'alkylation de la thiouracile étant une étape non sélective et substrat dépendante, plusieurs protocoles de la littérature décrivaient la synthèse de l'analogue alkylé sur l'oxygène et non sur l'azote *N1*. Après plusieurs tentatives, nous n'avons pas réussi à procéder à un déplacement de régiosélectivité conséquent mais nous avons cependant éclairci les données publiées précédemment en comparant toutes les voies possibles. Le Darapladib a ainsi été obtenu avec un rendement de 28% sur 7 étapes.

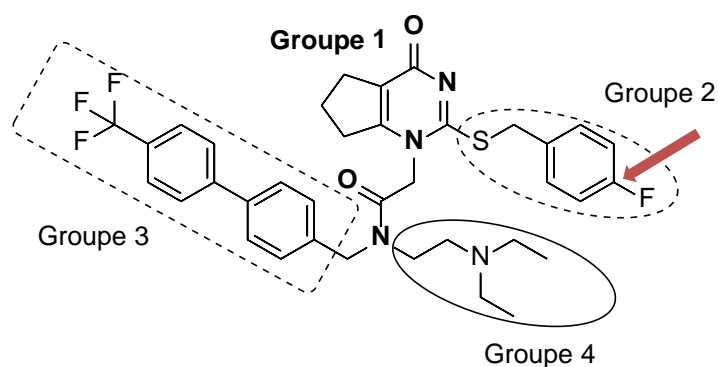


Schéma 63. Darapladib. La flèche rouge représente la position de radiomarquage.

Ces résultats nous ont permis de conclure que les groupes de Wang *et al.* mais également d'Azad *et al.* (Wang, Xu *et al.* 2011, Azad, Jain *et al.* 2015) avaient mal attribué leurs composés synthétisés et ont décrit dans leurs articles et leurs brevets les molécules alkylées sur la position *O* et non en position *N1*.

Notre analyse approfondie de la littérature abondante autour de la synthèse du Darapladib nous a permis de cibler les voies qui formaient les mauvais régioisomères de celles offrant les meilleurs rendements de *N1* alkylation. Ces résultats sont soumis dans un article exposant ces ambiguïtés et une analyse RMN ainsi qu'une étude d'affinité (envers la Lp-PLA₂) des régioisomères possibles sont décrites.

La suite du projet s'est centrée sur le radiomarquage du Darapladib au ¹⁸F et nous avons, pour ce faire, entrepris la synthèse d'un précurseur de radiomarquage.

Parmi les nombreuses voies de radiofluoration aromatique disponibles, nous avons étudié :

- les aryls iodoniums
- les ylures d'iodonium
- les esters de boronate

Ces méthodes ont été choisies car ce sont actuellement les plus prometteuses et les plus décrites dans la littérature récente (Cardinale and Ermert 2013, Rotstein, Stephenson *et al.* 2014, Preshlock, Calderwood *et al.* 2016). Les voies de l'iode hypervalent ne nous ont pas permis d'aboutir au précurseur souhaité. En effet, la fragilité des ylures mais également la faible réactivité du iodo-Darapladib, ne nous ont pas permis de synthétiser les composés d'intérêt. Cependant, grâce à l'utilisation d'une bibliographie récente, nous avons su adapter nos protocoles expérimentaux et trouver de nouvelles méthodes de synthèse permettant d'aboutir au précurseur de marquage. La voie des esters de boronate a permis (via l'alkylation non sélective de la thiouracile) d'obtenir le précurseur souhaité après couplage peptidique avec un rendement global de 5% sur 11 étapes.

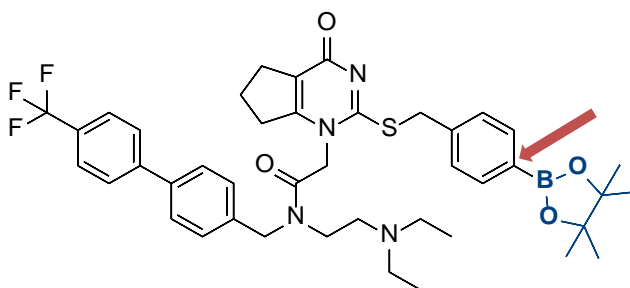


Schéma 64. Précurseur de marquage du Darapladib. La flèche rouge représente la position de radiomarquage.

Il est important de souligner ici les conditions particulières de manipulation en chimie organique à l'île de la Réunion. En effet, l'isolement géographique ne nous aura pas permis d'étudier toutes les possibilités concernant l'alkylation de la thiouracile mais également le développement de notre précurseur. L'hygrométrie importante à la Réunion (de 70 à 95%) entraîne de nombreux problèmes notamment en ce qui concerne les réactions anhydres (solvants), la conservation des réactifs (tendance à la dégradation) et des produits obtenus. De plus, certaines voies de synthèse n'ont pas été étudiées au cours de ces travaux car plusieurs

réactifs n'étaient pas autorisés à voyager par bateau ou par avion nous obligeant à trouver des solutions alternatives. Enfin, l'accès aux outils analytiques tels que la RMN (une seule pour l'île) ou encore l'HRMS ont, de manière non négligeable, retardé l'avancée des travaux.

Malgré les problèmes rencontrés, nous avons procédé au radiomarquage du Darapladib. Les équipes de Gouverneur *et al.* (Preshlock, Calderwood *et al.* 2016) et de Sanford *et al.* (Mossine, Brooks *et al.* 2015) ont développé des radiomarquages performants permettant de réaliser des radiofluorations aryliques sur des acides boroniques ou esters de boronate. En exploitant ces protocoles, nous avons réussi à obtenir le ^{18}F -Darapladib avec de très faibles rendements (1%). L'équipe de Zichler *et al.* a publié en 2017 une radiofluoration reposant sur les protocoles mentionnés précédemment. En adaptant ces conditions à notre radiomarquage et en utilisant un mélange NMP/n-BuOH en tant que solvant, nous avons réussi à améliorer le rendement de marquage du Darapladib à 6%.

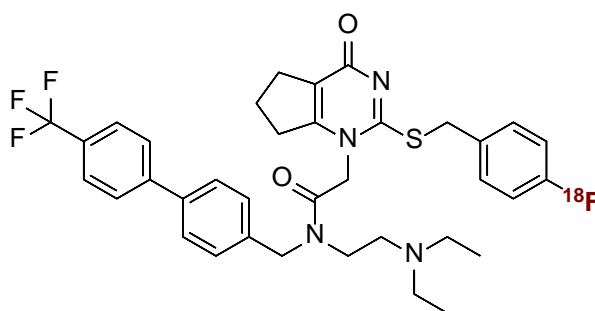


Schéma 65. ^{18}F -Darapladib.

Nous avons ensuite formulé le produit dans une solution de sérum physiologique contenant 5% d'EtOH nécessaire à sa dissolution. Sa stabilité a été étudiée en tampon ainsi qu'en plasma et aucun produit de dégradation n'a été observé sur 1h 30 min. Ce composé a alors été engagé dans les études d'imagerie dans lesquelles notre traceur a été comparé au ^{18}F -FDG.

Nous avons étudié deux modèles animaux :

- mélanome murin B16 induit sur des C57BL/6 (inflammation)
- ApoE KO (développement de plaques d'athérome)

Il est connu dans la littérature que les macrophages/monocytes expriment la Lp-PLA₂ (Stafforini 2009). Il est également décrit que des macrophages sont présents dans des tumeurs de mélanome murin (**Figure 56**).

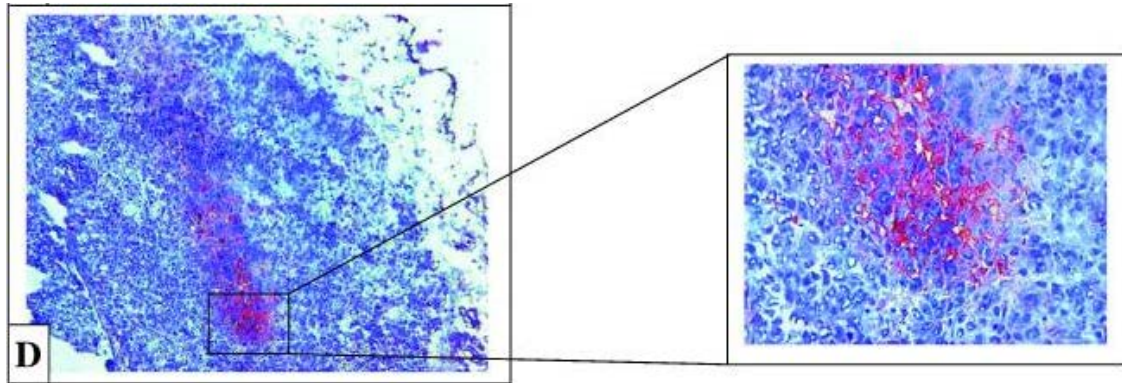


Figure 56. Analyse immunohistochimique de sections de tumeurs de mélanome murin B16.F10 par l'antigène F4/80 (Banciu, Metselaar *et al.* 2008).

Notre hypothèse était d'utiliser le ¹⁸F-Darapladib dans un modèle de mélanome murin B16 en tant que contrôle positif nous permettant de voir un marquage des tumeurs très facilement implantables et localisables en imagerie TEP. De plus, nous pouvions comparer nos deux traceurs sur les mêmes animaux.

Nous n'avons observé aucune accumulation de ¹⁸F-Darapladib au sein des tumeurs contrairement au ¹⁸F-FDG présentant une importante accumulation. Nous nous attendions à observer une accumulation de ¹⁸F-Darapladib dans les tumeurs induites chez des souris C57BL/6. Il sera donc primordial d'effectuer des analyses histologiques de nos tumeurs (prélevées après imagerie de nos deux traceurs) avec des anticorps anti-macrophages mais également anti-Lp-PLA₂ afin de conclure sur les résultats d'imagerie. Les études d'histologie permettront d'élucider ces résultats inattendus. La biodistribution du Darapladib a néanmoins pu être étudiée à ce stade montrant une forte accumulation dans les intestins et le foie. L'accumulation dans le foie, comme mentionnée auparavant, est attribuable au métabolisme des lipoprotéines et notamment à la clairance du cholestérol réalisée par les HDL. L'accumulation dans les intestins pourrait être imputable au transport trans-intestinal du cholestérol ou encore à l'excrétion biliaire du Darapladib (Dave, Nash *et al.* 2014). Une autre hypothèse est que le Darapladib est un substrat de la Glycoprotéine-P. Cette protéine est responsable de l'acheminement de médicaments (tels que le Darapladib) vers la lumière

intestinale et les hépatocytes (He Magee, Shaddinger *et al.* 2015). Ce métabolisme intestinal est indépendant du type d'administration (tant orale qu'intraveineuse comme montré par les auteurs). Une faible accumulation est également observée dans le cœur et la vessie.

Nous avons ensuite injecté le ^{18}F -Darapladib dans des souris ApoE $-/-$. C'est le modèle le plus utilisé dans la littérature pour l'étude de l'athérosclérose chez les murins (Xiangdong, Yuanwu *et al.* 2011). L'imagerie corps entier de nos souris ne nous a pas permis de visualiser une quelconque accumulation au niveau des plaques et plus particulièrement des artères de gros calibre comme l'aorte. Nous avons alors prélevé, après sacrifice, les aortes de nos souris que nous avons imagé en TEP. Il nous a été possible d'observer une accumulation de ^{18}F -Darapladib le long des aortes des souris ApoE $-/-$ tandis que le ^{18}F -FDG n'a montré aucune accumulation notable dans notre modèle de souris. Il est ici important de souligner que nos souris étaient âgées (18-20 mois). Chez la souris ApoE $-/-$, des différences notamment dans l'épaisseur de la paroi artérielle et de la lumière ont été observées en fonction de l'âge des animaux (**Figure 57**).

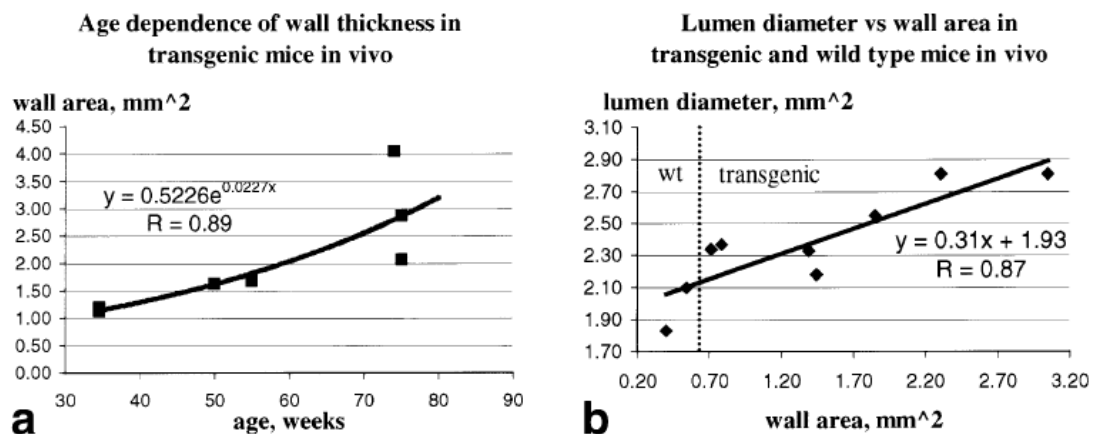


Figure 57. Dépendance liée à l'âge du diamètre de la paroi vasculaire et de la lumière du vaisseau chez des souris ApoE $-/-$ par microscopie par résonance magnétique (Itskovich, Choudhury *et al.* 2003).

Il sera important d'étudier les aortes prélevées notamment au niveau de la composition de la plaque, sa morphologie et sa composition. Ces études pourront être réalisées par histologie et immunohistochimie sur des coupes d'aortes prélevées.

Si l'on souhaite se projeter sur une utilisation de notre radiotracer chez l'homme, il est nécessaire de discuter plusieurs éléments. En effet, il nous a été nécessaire de prélever les aortes de nos souris après imagerie. Pour une utilisation chez l'homme, l'imagerie TEP permet de cibler des zones d'intérêt beaucoup plus précises et ne requiert pas l'imagerie du corps entier de l'individu. De plus, la taille du sujet d'étude permettra également d'éliminer (zoom) les zones présentant de trop fortes accumulations et moins pertinentes pour le diagnostic (**Figure 58**).

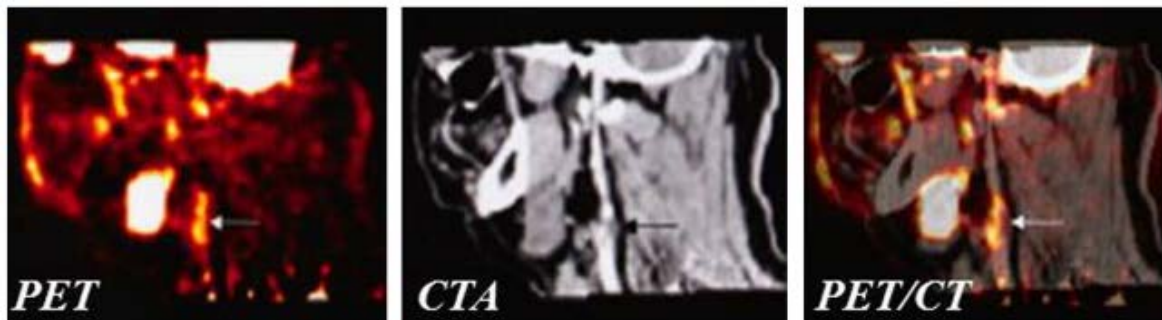


Figure 58. Imagerie d'un patient adulte par ^{18}F -FDG avec accumulation (flèche blanche) au niveau d'une plaque carotidienne avec zoom sur la zone d'intérêt (Orbay, Hong *et al.* 2013).

Enfin, notre radiotracer a été évalué dans le marquage de pièces d'endartériectomie humaines. Les pièces chirurgicales ont été incubées avec le ^{18}F -FDG ainsi que le ^{18}F -Darapladib avec les mêmes activités mesurées (30 MBq).

Le ^{18}F -FDG a déjà été utilisé en imagerie TEP de l'athérosclérose (Menezes, Kotze *et al.* 2011). Nous nous attendions donc à un marquage important des carotides. Cependant, les résultats ont montré que les parties non-complicées et principalement lipidiques n'étaient pas marquées contrairement aux parties complicées correspondant à la plaque athérosclérotique. En effet, le FDG va cibler les cellules capables de métaboliser le glucose. Or, les parties non-complicées sont très pauvres en cellules métaboliquement actives. Les parties complicées, quant à elles, sont plus cellulaires notamment s'il y a présence d'hémorragie intraplaque. Ces hypothèses devront être vérifiées sur des coupes de carotides par histologie.

De nombreux groupes ont utilisés le ^{18}F -FDG et il a été montré par exemple que l'accumulation de FDG était corrélée avec la présence de macrophage (**Figure 59**).

Cependant, ces études sont effectuées chez des patients présentant des plaques avancées et l'utilisation de ^{18}F -FDG sur des plaques précoces n'est pas aussi étudiée dans la littérature.

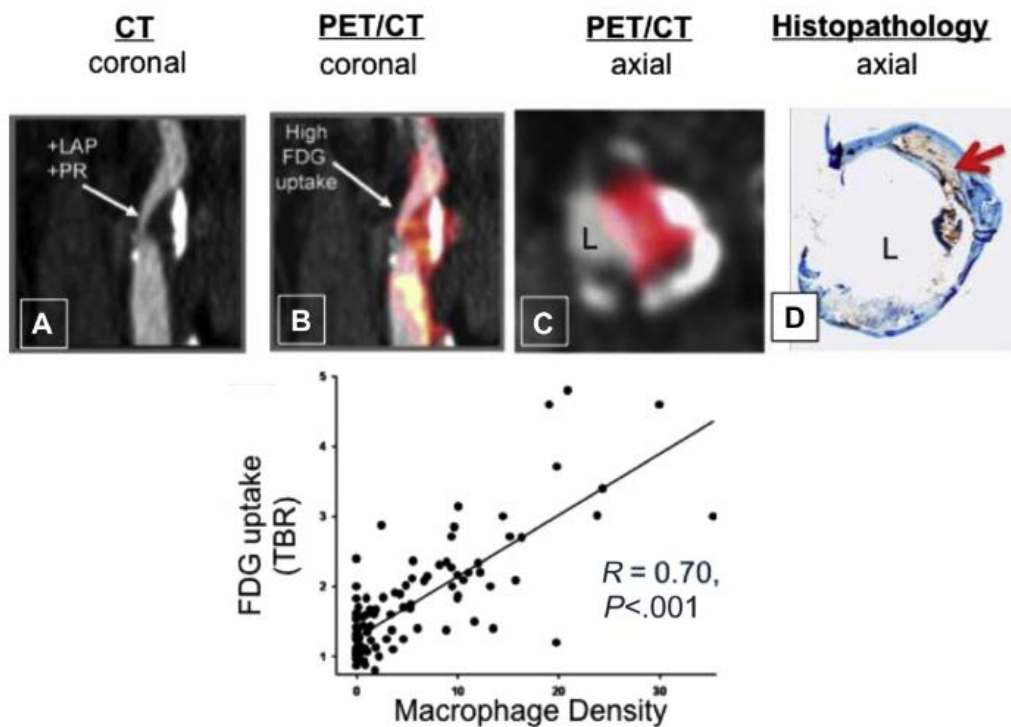


Figure 59. Imagerie TEP d'un patient présentant sténose carotidienne sévère par ^{18}F -FDG corrélée avec la présence en histologie de macrophage (CD68) (Ali and Tawakol 2016).

En ce qui concerne le Darapladib, nous avons pu voir que les parties non-complicquées lipidiques étaient plus marquées que les parties complicquées qui déjà présentaient quant à elles une forte accumulation. Il est important de souligner ici que nous ne sommes pas en situation *in vivo* et que l'accès à l'artère est facilité (par dissection de la pièce chirurgicale) en comparaison avec une injection intraveineuse de notre radiotracteur. Les plaques athérosclérotiques chez l'homme sont très hétérogènes notamment en composition (lipides, hémorragie, calcium, fibrose etc.). Il serait judicieux d'étudier l'accumulation de ^{18}F -Darapladib dans des pièces carotidiennes présentant des morphologies différentes de plaques. En complément, il serait également intéressant d'utiliser des techniques histologiques couplées à la spectrométrie de masse afin d'étudier la distribution précise du ^{18}F -Darapladib dans les plaques telles que l'imagerie par MALDI-TOF-MS associée à une coloration histologique classique. En effet, cette méthode pourra précisément localiser la présence de Darapladib dans les différentes parties de la carotide par détection du pic moléculaire.

Un article présentant ces résultats sur souris, aortes et carotides accompagnés des radiomarquages est actuellement en préparation pour soumission dans « *Angewandte Chemie International Edition* ». Ces résultats ont d'ailleurs été brevetés et déposés ; ils concernent le radiomarquage du Darapladib et de ses analogues ainsi que leur utilisation en imagerie.

En perspective de ce travail, il sera important :

- de tester *in vivo* et *ex vivo* (sur des carotides) les différents analogues du Darapladib déjà marqués présentant une bonne inhibition envers la Lp-PLA₂ et dont la synthèse et les radiomarquages se révèlent plus simples et avec de meilleurs rendements
- d'étudier les possibles cibles du Darapladib *in vivo*
- d'étudier le passage à l'homme. En effet, le Darapladib ayant déjà été étudié tant dans son métabolisme que dans sa toxicité, il sera plus facile de l'utiliser en imagerie de l'athérosclérose chez des patients. En fonction des résultats concernant les analogues et sur la base du brevet déjà déposé, il est envisageable d'imaginer une molécule optimisée afin de cibler précisément les plaques d'athérome précoces

Experimental Part

General information

Analysis

^1H , ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Advanced 3 spectrometer at 25 °C (600 MHz for ^1H and 150 MHz for ^{13}C). Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to trimethylsilane (TMS) and calibrated using solvent residual peaks in CDCl_3 ($\delta = 7.26, 77.16$) or $\text{DMSO-}d_6$ (2.50, 39.52). Coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz) and refer to apparent and visible multiplicities. ^1H NMR multiplicities are reported as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, bs = broad signal.

Atom numbering for NMR spectra analysis is arbitrary and is given on the molecule's structure.

Melting points (m.p.) were uncorrected and recorded while using Büchi M-560 melting point apparatus.

Infrared spectra were recorded on a IR-FT ALPHA Bruker equipped with an Alpha Platinum unit and a monoreflexion diamond ATR unit (Attenuated Total Reflectance).

Mass spectra were obtained from a MALDI-TOF for the high resolution mass spectra (HRMS) or from ABSciex® 3200 QTRAP model using electrospray infusion (ESI⁺ or ESI⁻). Flowrate of the injection syringe was 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

HPLC analysis were performed on a Thermofisher UPLC Ultimate 3000 system equipped with a UV-Vis spectrophotometer with diode array detector; column: Gemini C₁₈ 250 × 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex), isocratic elution: NH_4OAc 0.1M (pH 6)/MeCN; flow rate: 1 or 1.5 ml/min; room temperature

Chromatography

Thin layer chromatography (TLC) was carried out on silica gel coated Aluminium plates (Macherey-Nagel, SilG₆₀/UV₂₅₄)

Preparative thin layer chromatography was carried out on 20 x 20 cm silica gel coated glass plates with a layer thickness of 0.5 or 1 mm.

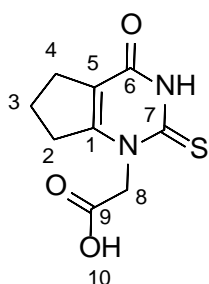
Reaction conditions

Reactions were carried out under argon atmosphere in air-dried glassware when needed. Sensitive liquids were transferred via syringe.

Solvents

Unless otherwise noted, all reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification (Acros and Sigma-Aldrich). Pyridine and DiPEA were distilled prior to use or stored over KOH. All the solvents were purchased from Carlo-Erba. Solvents used for synthesis were dried on activated molecular sieve when needed. Molecular sieve was activated by heating at 200°C over 12h under vacuum.

Chemistry



2-(4-oxo-2-thioxo-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1H-cyclopenta[*d*]pyrimidin-1-yl)acetic acid (1)

$C_9H_{10}N_2O_3S$

MW : 226,25 g.mol⁻¹

Aspect : off white solid

Experimental procedure:

Methyl 2-oxocyclopentanecarboxylate (1 eq, 17.5 mmol) was added to a stirred suspension of glycine sodium salt (1 eq, 18.0 mmol) in NMP (18 mL). The reaction mixture was stirred for 2 hours at 60° C under argon atmosphere. After cooling the mixture to room temperature, sodium thiocyanate (1.4 eq, 25 mmol) was added. Chlorotrimethylsilane (3.5 eq, 61.5 mmol) was then added dropwise and the reaction mixture was stirred at 120° C for 3 hours. The reaction was cooled to 90° C and water (35 mL) was added. The resulting suspension was slowly cooled to 4° C overnight and the product was collected by filtration. The product was washed with water (2 x 15 mL) and acetone (15 mL) then dried at 50° C to yield the title compound as an off white solid (1.4 g, 58%).

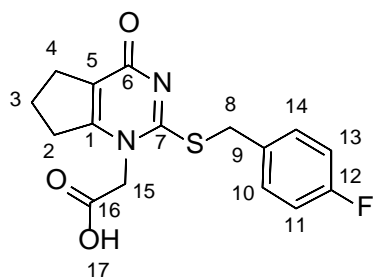
Analysis and spectral data:

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 12.57 (s, 1H, H₁₀), 4.95 (bs, 2H, H₈), 2.90-2.82 (m, 2H, H₂), 2.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₄), 2.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₃);

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 177.0 (1C, C₉), 168.6 (1C, C₇), 158.4 (1C, C₆), 157.9 (1C, C₁), 117.1 (1C, C₅), 51.7 (1C, C₈), 32.7 (1C, C₂), 27.5 (1C, C₄), 20.5 (1C, C₃);

ESI-MS *m/z* for C₉H₁₀N₂O₃S [MH]⁺ 227.4;

Spectral analysis is conform with reported data (Cardwell, Crawford *et al.* 2011);



2-(2-(4-fluorobenzylthio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetic acid (2)

$C_{16}H_{15}FN_2O_3S$

MW : 334,37 g.mol⁻¹

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

Compound **1** (1 eq, 1.62 mmol) was stirred in a mixture of water (3 mL) and isopropyl alcohol (820 μ L). KOH aqueous solution (50% w/v, 1.9 eq, 3.08 mmol) was added followed by K_2CO_3 (0.15 eq, 0.24 mmol) and the reaction was heated to 40° C under constant stirring. 4-fluorobenzyl chloride (0.95 eq, 1.52 mmol) was then added and the reaction was stirred at 40° C for 3 hours. The reaction was cooled to room temperature and formic acid (0.5 eq, 0.8 mmol) was added to crystallize the product. After 1h, more formic acid (1.7 eq, 2.7 mmol) was slowly added and the reaction was stirred for at least an hour until crystallization was complete. The product was collected through filtration and washed twice with a 4:1 (v:v) mixture of water and isopropyl alcohol (1 mL) followed by isopropyl alcohol (1 mL). The product was stirred in Et_2O overnight to remove remaining organic impurities and filtered again. Product was dried at 50° C to afford the title compound as a colourless solid (300 mg, 60%).

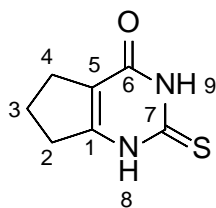
Analysis and spectral data:

M.p. 183-185° C at 23° C;

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 12.30 (s, 1H, H₁₇), 7.46-7.48 (m, 2H, H₁₀+H₁₄), 7.13-7.10 (m, 2H, H₁₁+H₁₃), 4.65 (s, 2H, H₁₅), 4.45 (s, 2H, H₈), 2.82 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H₄), 2.59 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H₂), 1.97 (quint, $J = 7.3$ Hz, 2H, H₃);

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ : 168.3 (1C, C₁₆), 165.7 (1C, C₆), 161.6 (d, $J_{CF} = 240$ Hz, 1C, C₁₂), 160.6 (1C, C₁), 156.7 (1C, C₇), 133.2 (d, $J_{CF} = 3$ Hz, 1C, C₉), 131.3 (d, $J_{CF} = 7.5$ Hz, 2C, C₁₀+C₁₄), 119.8 (1C, C₅), 115.3 (d, $J_{CF} = 21$ Hz, 2C, C₁₁+C₁₃), 50.1 (1C, C₁₅), 34.6 (1C, C₈), 31.4 (1C, C₄), 28.0 (1C, C₂), 20.2 (1C, C₃);

Spectral analysis is conform with reported data (Cardwell, Crawford *et al.* 2011);



2-thioxo-1,2,3,5,6,7-hexahydro-4H-cyclopenta[d]pyrimidin-4-one (3)

$C_7H_8N_2OS$

MW : 168,21 $g \cdot mol^{-1}$

Aspect : beige solid

Experimental procedure:

Thiourea (1.5 eq, 21.1 mmol) was stirred in ACN (40 mL). Methyl 2-cyclopentanone-carboxylate (1 eq, 14.1 mmol) was then added followed by DBU (1.2 eq, 16.9 mmol). The mixture was stirred at reflux (82°C) for 16h. The reaction was cooled to 0°C with an ice bath and water (30 mL) was added. The pH was adjusted to 1 using concentrated HCl and the suspension was stirred for 30 min. Thus, the solid obtained was filtered and washed thoroughly with water three times (3 x 15 mL) and dried at 55°C overnight to obtain the desired compound as a beige solid (1.54 g, 65%).

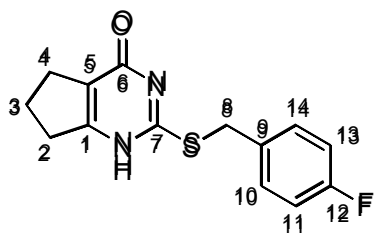
Analysis and spectral data:

1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 12.5 (bs, 1H, H₈ or H₉), 12.2 (bs, 1H, H₈ or H₉), 2.67 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₄), 2.46 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₂), 1.94 (quint, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₃);

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 175.6 (1C, C₇), 159.6 (1C, C₆), 156.7 (1C, C₁), 115.6 (1C, C₅), 31.1 (1C, C₄), 26.6 (1C, C₂), 20.8 (1C, C₃);

ESI-MS m/z for $C_7H_8N_2OS$ [MH]⁺ 169.5 ; [MNa]⁺ 191.4;

Spectral analysis is conform with reported data (Mulholland, Ross *et al.* 2007);



2-((4-fluorobenzyl)thio)-1,5,6,7-tetrahydro-4H-cyclopenta[d]pyrimidin-4-one (4)

$C_{14}H_{13}FN_2OS$

MW : 276,33 g.mol⁻¹

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

Compound **3** (1 eq, 2.97 mmol), potassium carbonate (1.5 eq, 4.46 mmol) and potassium iodide (0.1 eq, 0.297 mmol) were stirred in acetone (10 mL) at RT. 4-fluorobenzyl chloride (1.05 eq, 3.12 mmol) was then added and the mixture was refluxed (54°C) for 1h. A portion of potassium carbonate (0.2 eq, 0.59 mmol) was poured into the flask and the reflux was maintained for 2h. After cooling to 0°C, the pH was adjusted to 1 using concentrated HCl. The reaction was stirred for 30 min until the precipitation was complete. The solid was then washed three times with water (3 x 15 mL) then dried at 55°C overnight to obtain the desired compound as a colourless solid (758 mg, 92%).

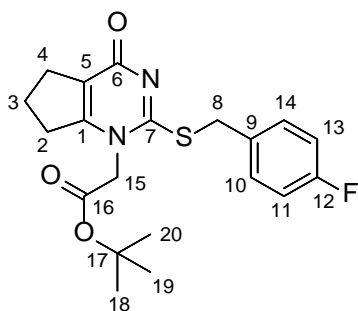
Analysis and spectral data:

Rf: 0.40 in 50/50 Hex/EtOAc;

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 12.5 (bs, 1H, *N*1H or *N*3H), 7.46-7.43 (m, 2H, H₁₀+H₁₄), 7.15-7.12 (m, 2H, H₁₁+H₁₃), 4.37 (s, 2H, H₈), 2.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₂), 2.58 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₄), 1.96 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₃);

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 168.2 (1C, C₆), 166.2 (1C, C₇), 161.3 (d, *J*_{CF} = 291 Hz, 1C, C₁₂), 159.3 (1C, C₁), 134.0 (m, 1C, C₉), 131.0 (d, *J*_{CF} = 9 Hz, 2C, C₁₀+C₁₄), 119.9 (1C, C₅), 115.2 (d, *J*_{CF} = 26 Hz, 2C, C₁₁+C₁₃), 34.3 (1C, C₈), 32.7 (1C, C₂), 26.7 (1C, C₄), 20.6 (1C, C₃);

Spectral analysis is conform with reported data (Mulholland, Ross *et al.* 2007);



tert-butyl 2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetate (5)

$C_{20}H_{23}FN_2O_3S$

MW : 390,47 g.mol⁻¹

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

Compound **4** (1 eq, 0.73 mmol), DiPEA (1.2 eq, 0.87 mmol) and *tert*-butyl bromoacetate (1 eq, 0.73 mmol) were dissolved in dry DCM (6 mL) and stirred at 42°C under argon for 20h. The solution was poured on water (10 mL) and extracted with EtOAc 3 times (3 x 5 mL). The combined organic extracts were dried, filtered and evaporated under vacuum. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 EtOAc/Hex) to obtain the desired compound as a colourless solid (60 mg, 21%).

Analysis and spectral data:

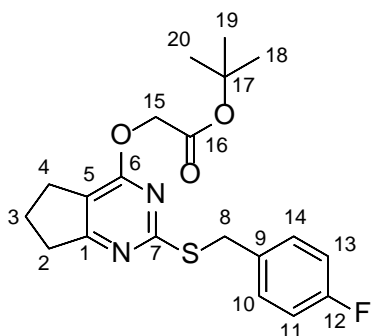
Rf: 0.20 in 90/10 EtOAc/Hex;

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 7.47-7.45 (m, 2H, H₁₀+H₁₄), 7.15-7.12 (m, 2H, H₁₁+H₁₃), 4.67 (s, 2H, H₁₅), 4.43 (s, 2H, H₈), 2.81 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₂), 2.58 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₄), 1.97 (quint, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₃), 1.38 (s, 9H, H₁₈+H₁₉+H₂₀);

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ : 165.8 (1C, C₁₆), 165.2 (1C, C₆), 161.4 (d, $J_{CF} = 291$ Hz, 1C, C₁₂), 160.3 (1C, C₇), 156.2 (1C, C₁), 133.2 (d, $J_{CF} = 3$ Hz, 1C, C₉), 131.1 (d, $J_{CF} = 11$ Hz, 2C, C₁₀+C₁₄), 119.6 (1C, C₅), 115.2 (d, $J_{CF} = 26$ Hz, 2C, C₁₁+C₁₃), 82.8 (1C, C₁₇), 50.4 (1C, C₁₅), 34.3 (1C, C₈), 31.3 (1C, C₂), 27.9 (1C, C₄), 27.5 (3C, C₁₈+C₁₉+C₂₀), 20.1 (1C, C₃);

ESI-MS m/z for $C_{20}H_{23}FN_2O_3S$ [MH]⁺ 391.7 ;

Spectral analysis is conform with reported data (Hickey, Ife *et al.* 2016);



tert-butyl 2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetate (6)

$C_{20}H_{23}FN_2O_3S$

MW : 390,47 g.mol⁻¹

Aspect : colourless oil

Experimental procedure:

Wang's method: Compound **4** (1 eq, 1.40 mmol), potassium carbonate (1.2 eq, 1.27 mmol) and tert-butyl bromoacetate (1.2 eq, 1.27 mmol) were dissolved in dry DMF (14 mL) and stirred at 75°C under argon for 18h. The reaction was monitored by TLC and the mixture was then dried under vacuum when it was deemed completed. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 98/2 Hex/EtOAc) to obtain the desired compound as a colourless oil (477 mg, 96%).

Hickey's method: Compound **4** (1 eq, 0.73 mmol), DiPEA (1.2 eq, 0.87 mmol) and tert-butyl bromoacetate (1 eq, 0.73 mmol) were dissolved in dry DCM (6 mL) and stirred at 42°C under argon for 20h. The solution was poured on water (10 mL) and extracted with EtOAc (3 x 5 mL). The combined organic extracts were dried, filtered and evaporated under vacuum. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 98/2 Hex/EtOAc) to obtain the desired compound as a colourless oil (21 mg, 7%).

Analysis and spectral data:

Rf: 0.30 in 98/2 Hex/EtOAc;

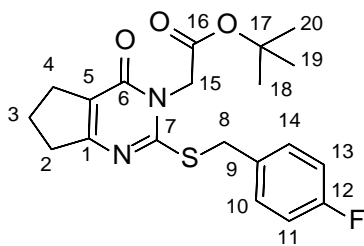
IR (neat, cm⁻¹) ν 2975, 1753, 1589, 1558, 1509, 1437, 1395, 1364, 1328, 1292, 1228, 1142, 1093;

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 7.44-7.41 (m, 2H, H₁₀+H₁₄), 7.14-7.11 (m, 2H, H₁₁+H₁₃), 4.81 (s, 2H, H₁₅), 4.33 (s, 2H, H₈), 2.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₂), 2.75 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₄), 2.05 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₃), 1.37 (s, 9H, H₁₈+H₁₉+H₂₀);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ : 176.2 (1C, C₁), 167.6 (1C, C₇), 167.2 (1C, C₁₆), 164.0 (1C, C₆), 161.2 (d, *J*_{CF} = 243 Hz, 1C, C₁₂), 134.2 (m, 1C, C₉), 130.6 (d, *J*_{CF} = 9 Hz, 2C,

C₁₀+C₁₄), 115.2 (d, $J_{CF} = 21$ Hz, 2C, C₁₁+C₁₃), 115.1 (1C, C₅), 81.5 (1C, C₁₇), 62.9 (1C, C₁₅), 33.5 (1C, C₈), 33.4 (1C, C₂), 27.7 (3C, C₁₈+C₁₉+C₂₀), 25.7 (1C, C₄), 21.5 (1C, C₃);

HRMS (TOF MS ES⁺) calculated for C₂₀H₂₄FN₂O₃S [MH]⁺ requires 391.1492 found 391.1476;



tert-butyl 2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-3H-cyclopenta[d]pyrimidin-3-yl)acetate (7)

$C_{20}H_{23}FN_2O_3S$

MW : 390,47 g.mol⁻¹

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

Compound **4** (1 eq, 0.73 mmol), DiPEA (1.2 eq, 0.87 mmol) and tert-butyl bromoacetate (1 eq, 0.73 mmol) were dissolved in dry DCM (6 mL) and stirred at 42°C under argon for 20h. The solution was poured on water (10 mL) and extracted with EtOAc (3 x 5 mL). The combined organic extracts were dried, filtered and evaporated under vacuum. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 Hex/EtOAc) to obtain the desired compound as a colourless solid (76 mg, 27%).

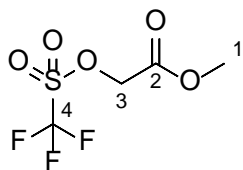
Analysis and spectral data:

Rf: 0.30 in 90/10 Hex/EtOAc;

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 7.47-7.45 (m, 2H, H₁₀+H₁₄), 7.16-7.12 (m, 2H, H₁₁+H₁₃), 4.65 (s, 2H, H₁₅), 4.46 (s, 2H, H₈), 2.82 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₂), 2.64 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₄), 2.00 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₃), 1.38 (s, 9H, H₁₈+H₁₉+H₂₀);

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 167.0 (1C, C₁₆), 165.8 (1C, C₆), 161.5 (d, *J*_{CF} = 291 Hz, 1C, C₁₂), 160.6 (1C, C₇), 159.0 (1C, C₁), 132.8 (d, *J*_{CF} = 3 Hz, 1C, C₉), 131.3 (d, *J*_{CF} = 11 Hz, 2C, C₁₀+C₁₄), 118.4 (1C, C₅), 115.2 (d, *J*_{CF} = 26 Hz, 2C, C₁₁+C₁₃), 82.3 (1C, C₁₇), 45.0 (1C, C₁₅), 34.7 (1C, C₈), 34.3 (1C, C₂), 27.5 (3C, C₁₈+C₁₉+C₂₀), 27.2 (1C, C₄), 20.8 (1C, C₃);

HRMS (TOF MS ES⁺) calculated for C₂₀H₂₄FN₂O₃S [MH]⁺ requires 391.1492 found 391.1478;



Methyl 2-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)acetate (8)

$C_4H_5F_3O_5S$

MW : 222.13 g.mol⁻¹

Aspect : light brown oil

Experimental procedure:

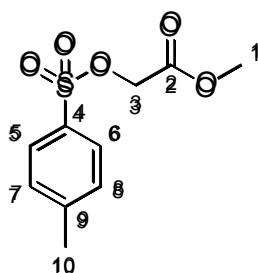
To a solution of triflic anhydride (1 eq, 20 mmol) in DCM (10 mL) at 5°C under argon was added over 30 min a solution of methyl glycolate (1 eq, 20 mmol) in DCM (5 mL). The clear solution was stirred at 0°C for 1h 30 min. The mixture was washed 5 times with water (15 mL x 5) and with saturated NaCl (10 mL) then dried filtered and evaporated to yield the desired product as a light brown oil which was used without further purification (3.11g, 70%).

Analysis and spectral data:

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 4.17 (s, 2H, H₃), 3.80 (s, 3H, H₁);

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 165.1 (1C, C₂), 118.5 (q, $J_{CF3} = 318$ Hz, 1C, C₄), 69.0 (1C, C₃), 53.3 (1C, C₁);

Spectral analysis is conform with reported data (Schäfer, Frey *et al.* 2010);



Methyl 2-(tosyloxy)acetate (9)

$C_{10}H_{12}O_5S$

MW : 244,26 $g \cdot mol^{-1}$

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

To a solution of methyl glycolate (1 eq, 5.55 mmol) in Et₂O (4 mL) was added TsCl (1 eq, 5.55 mmol). Et₃N (2 eq, 11.1 mmol) was then added at 0°C dropwise. The mixture was stirred at 0°C for 2h. Water (15 mL) was added and the solution was extracted twice with Et₂O (15 mL x 2). The combined organic extracts were dried, filtered and evaporated. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 Hex/EtOAc) to obtain the desired compound as a colourless solid (424 mg, 31%)

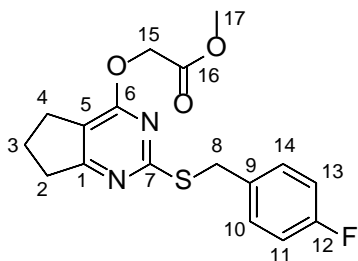
Analysis and spectral data:

Rf: 0.35 in 90/10 Hex/ EtOAc;

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.84 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₅+H₆), 7.36 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₇+H₈), 4.60 (s, 2H, H₃), 3.73 (s, 3H, H₁), 2.46 (s, 3H, H₁₀);

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 166.6 (1C, C₂), 145.5 (1C, C₄), 132.7 (1C, C₉), 130.1 (2C, C₅+C₆), 128.3 (2C, C₇+C₈), 64.7 (1C, C₃), 52.7 (1C, C₁), 21.8 (1C, C₁₀);

Spectral analysis is conform with reported data (Choi, Lee *et al.* 2016);



Methyl-2-((2-((4-fluorobenzyl)thio)-6,7-dihydro-5H-cyclopenta [d]pyrimidin-4-yl)oxy)acetate (10)

$C_{17}H_{17}FN_2O_3S$

MW : 348,39 g.mol⁻¹

Aspect : colourless oil

Experimental procedure:

Compound **4** (1 eq, 0.18 mmol), potassium carbonate (1.2 eq, 0.22 mmol) and compound **9** (1.2 eq, 0.22 mmol) were dissolved in dry DMF (14 mL) and stirred at 75°C under argon for 18h. The reaction was monitored by TLC and the mixture was then dried under vacuum. The resulting paste was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 Hex/EtOAc) to obtain the desired compound as a colourless oil (48 mg, 58%).

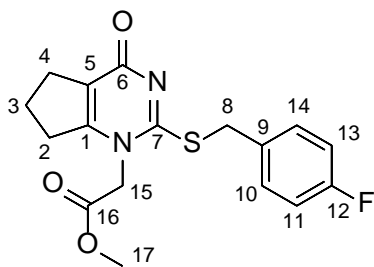
Analysis and spectral data:

Rf: 0.30 in 90/10 Hex/ EtOAc;

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 7.42-7.40 (m, 2H, H₁₀+H₁₄), 7.14-7.11 (m, 2H, H₁₁+H₁₃), 4.97 (s, 2H, H₁₅), 4.31 (s, 2H, H₈), 3.63 (s, 3H, H₁₇), 2.85 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H₂), 2.77 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H₄), 2.06 (quint, $J = 7.4$ Hz, 2H, H₃);

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ : 176.9 (1C, C₁), 169.1 (1C, C₇), 168.2 (1C, C₁₆), 164.4 (1C, C₆), 161.2 (d, $J_{CF} = 194$ Hz, 1C, C₁₂), 134.3 (d, $J_{CF} = 5$ Hz, 1C, C₉), 131.0 (d, $J_{CF} = 9$ Hz, 2C, C₁₀+C₁₄), 115.6 (d, $J_{CF} = 21$ Hz, 2C, C₁₁+C₁₃), 115.5 (1C, C₅), 62.9 (1C, C₁₇), 52.4 (1C, C₁₅), 33.9 (1C, C₈), 33.8 (1C, C₂), 26.2 (1C, C₄), 21.9 (1C, C₃);

Spectral analysis is conform with reported data (Zhou, Lv *et al.* 2014);



Methyl-2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetate (11)

$C_{17}H_{17}FN_2O_3S$

MW : 348,39 g.mol⁻¹

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

Compound **4** (1 eq, 0.90 mmol), saccharin (0.01 eq, 0.009 mmol) were dissolved in DCM (2 mL) and stirred at 42°C. HMDS (0.6 eq, 0.54 mmol) was added and the mixture was stirred at reflux for 1h 30 min. Compound **8** (1.5 eq, 1.35 mmol) dissolved in 500 µL of DCM was slowly added over 10 min. The resulting solution was stirred at 42°C for 10h. 5 mL of HCl 1N was added followed by water (5 mL). The aqueous phase was extracted 3 times with EtOAc (3 x 5 mL). The combined organic extracts were washed with saturated NaHCO₃ (10 mL) then brine (10 mL). The organic layer was dried, filtered and solvents were removed. The paste was purified using column chromatography (silica gel, 90/10, EtOAc/MeOH) to obtain the desired compound as a colourless solid (291 mg, 93%).

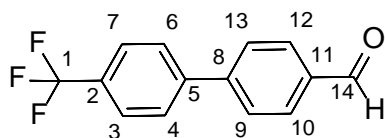
Analysis and spectral data:

Rf: 0.20 in 90/10 EtOAc/MeOH;

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 7.47-7.45 (m, 2H, H₁₀+H₁₄), 7.15-7.12 (m, 2H, H₁₁+H₁₃), 4.81 (s, 2H, H₁₅), 4.42 (s, 2H, H₈), 3.70 (s, 3H, H₁₇), 2.83 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₂), 2.59 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₄), 1.96 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₃);

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 170.9 (1C, C₁₆), 167.4 (1C, C₆), 165.4 (1C, C₇), 164.4 (1C, C₁), 161.4 (d, *J*_{CF} = 207 Hz, 1C, C₁₂), 130.9 (d, *J*_{CF} = 8 Hz, 2C, C₁₀+C₁₄), 130.6 (d, *J*_{CF} = 3 Hz, 1C, C₉), 120.0 (1C, C₅), 115.6 (d, *J*_{CF} = 23 Hz, 2C, C₁₁+C₁₃), 65.0 (1C, C₁₇), 53.4 (1C, C₁₅), 36.0 (1C, C₈), 32.7 (1C, C₂), 26.9 (1C, C₄), 21.2 (1C, C₃);

Spectral analysis is conform with reported data (Shen, Wang *et al.* 2014);



4'-(trifluoromethyl)biphenyl-4-carbaldehyde (12)

$C_{14}H_9F_3O$

MW : 250.22 $g \cdot mol^{-1}$

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

Method A: 4-bromobenzaldehyde (1 eq, 0.95 mmol), 4-(trifluoromethyl)phenylboronic acid (1.1 eq, 1.05 mmol), TBAB (1eq, 0.95 mmol) and K_2CO_3 (2.5 eq, 2.37 mmol) were dissolved in a water/dioxane mixture (1/1 v/v, 1.5/1.5 mL) which was further deoxygenated three times (vacuum/Ar). Palladium (II) acetate (0.05 eq, 0.05 mmol) was then added to the resulting solution and the reaction mixture was heated to 70°C under stirring and argon for 3h until reaction completion was shown by TLC. Water was added followed by extraction with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic phases were washed with brine (10 mL) then dried and filtered. After removal of the solvent under reduced pressure, the remaining paste was purified using column chromatography (silica gel, 95/5 Hex/EtOAc) to afford the desired compound as a colourless solid (210 mg, 89%).

Method B: 4-bromobenzaldehyde (1 eq, 7.18 mmol), 4-(trifluoromethyl)phenylboronic acid (1 eq, 7.18 mmol), TBAB (1 eq, 7.18 mmol), Na_2CO_3 (3 eq, 21.54 mmol) were dissolved in 11 mL of water. Palladium acetate (0.4 % eq, 0.029 mmol) was then added and the reaction was stirred in a sealed tube and heated at 150°C. After 20 min, the tube was slowly cooled down to rt and opened with caution. The biphasic mixture was poured onto 10 mL of EtOAc and extracted (3 x 10 mL). The combined organic phases were dried and filtered to obtain the desired compound as a colourless solid (1.7 g, 96%)

Analysis and spectral data:

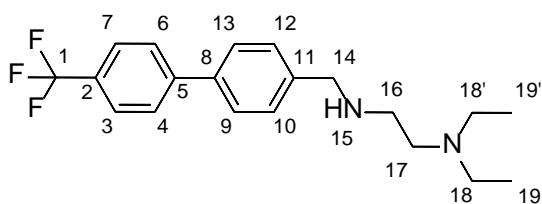
Rf: 0.35 in 95/5 Hex/EtOAc;

M.p. 70-72°C;

1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ 10.09 (s, 1H, H_{14}), 8.00-7.99 (m, 2H, $H_{10}+H_{12}$), 7.77-7.76 (m, 2H, H_3+H_7), 7.74 (m, 4H, $H_4+H_6+H_9+H_{13}$);

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ 191.7 (1C, C₁₄), 145.6 (1C, C₈), 143.3 (1C, C₅), 135.9 (1C, C₁₁), 130.6 (m, 1C, C₂), 130.4 (2C, C₁₀+C₁₂), 128.0 (2C, C₄+C₆), 127.7 (2C, C₉+C₁₃), 126.0 (m, 2C, C₃+C₇), 125.9 (m, 1C, C₁);

Spectral analysis is conform with reported data (Carroll, Evans *et al.* 2015);



N',N'-diethyl-N²-((4'-(trifluoromethyl)biphenyl-4-yl)methyl)ethane-1,2-diamine (13)

$C_{20}H_{25}F_3N_2$

MW : 350.43 g.mol⁻¹

Aspect : yellow oil

Experimental procedure:

Method A: Compound **12** (1 eq, 1.01 mmol) and *N,N*-diethylethylenediamine (1.05 eq, 1.05 mmol) were dissolved in DCM (5 mL) at rt under argon. The resulting clear solution was stirred for 1h followed by addition of NaBH(OAc)₃ (1.4 eq, 1.40 mmol) at 0°C. The reaction mixture was then stirred at rt for 3h until TLC showed reaction completion. Quenching with NaOH was followed by extraction using DCM (3 x 15mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL) then dried and filtered. After removal of the solvent under reduced pressure, the remaining orange oil was purified using column chromatography (silica gel, 85/15 DCM/MeOH) to afford the desired compound as a yellow oil (310 mg, 80%).

Method B: Compound **15** (1 eq, 1.48 mmol), potassium carbonate (2 eq, 2.96 mmol) and *N,N*-diethylethylenediamine (4 eq, 5.91 mmol) were dissolved in dry DMF (8 mL) and stirred at 70°C under argon for 18h. The reaction was monitored by TLC and the mixture was then dried under vacuum when it was deemed completed. The reaction was then diluted with water (15 mL) and EtOAc (15 mL). The compound was purified using column chromatography (silica gel, 85/15 DCM/MeOH) to obtain the desired compound as a yellow oil (654 mg, 94%).

Analysis and spectral data:

Rf: 0.25 in 85/15 DCM/MeOH;

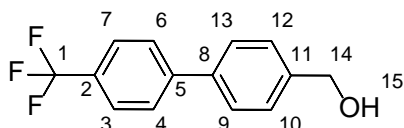
¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ 7.68 (m, 4H, H₄+H₆+H₉+H₁₃), 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H₃+H₇), 7.43 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H₁₀+H₁₂), 3.87 (s, 2H, H₁₄), 2.75 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H₁₆), 2.64 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H₁₇), 2.57 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, H₁₈+H_{18'}), 2.12 (bs, 1H, H₁₅), 1.05 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, H₁₈+H_{18'});

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ 144.6 (1C, C₅), 140.3 (1C, C₁₁), 138.6 (1C, C₈), 129.4 (m, 1C, C₂), 129.0 (2C, C₄+C₆), 127.4 (2C, C₁₀+C₁₂), 127.3 (2C, C₉+C₁₃), 125.8 (m, 2C, C₃+C₇),

124.5 (m, 1C, C₁), 53.6 (1C, C₁₆), 52.5 (1C, C₁₇), 47.2 (2C, C₁₈+C_{18'}), 46.3 (1C, C₁₄), 11.3 (2C, C₁₉+C_{19'});

ESI-MS m/z for C₂₀H₂₅F₃N₂ [MH]⁺ 351.4, [MNa]⁺ 373.8;

Spectral analysis is conform with reported data (Nagano, Hsu *et al.* 2013);



(4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl) methanol (14)

$C_{14}H_{11}F_3O$

MW : 252.24 $g \cdot mol^{-1}$

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

4-bromobenzylalcohol (1 eq, 5.35 mmol), 4-(trifluoromethyl)phenylboronic acid (1 eq, 5.35 mmol), TBAB (1 eq, 5.35 mmol), Na_2CO_3 (3 eq, 16.05 mmol) were dissolved in 11 mL of water. Palladium acetate (0.4 % eq, 0.021 mmol) was then added and the reaction was stirred in a sealed tube and heated at 150°C. After 20 min, the tube is slowly cooled down to rt and was opened with caution. The biphasic mixture was poured onto 10 mL of EtOAc and extracted (3 x 10 mL). The combined organic phases were dried and filtered. After removal of the solvent under reduced pressure, the remaining black oil was purified using column chromatography (silica gel, 80/20 Hex/EtOAc) to afford the desired compound as a colourless solid (1.29 g, 96%).

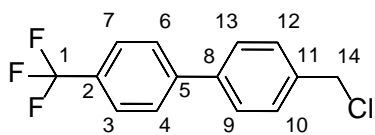
Analysis and spectral data:

Rf: 0.20 in 80/20 Hex/EtOAc;

1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 7.69 (m, 4H, $H_4+H_6+H_9+H_{13}$), 7.60 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_3+H_7), 7.48 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, $H_{10}+H_{12}$), 4.77 (s, 2H, H_{14}), 1.68 (bs, 1H, H_{15});

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 144.5 (1C, C_{11}), 141.1 (1C, C_5), 139.3 (1C, C_8), 129.1 (m, 1C, C_2), 127.7 (2C, $C_{10}+C_{12}$), 127.6 (2C, C_4+C_6), 127.5 (2C, C_9+C_{13}), 125.9 (m, 2C, C_3+C_7), 124.4 (m, 1C, C_1), 65.1 (1C, C_{14});

Spectral analysis is conform with reported data (Shen, Wang *et al.* 2014);



4-(chloromethyl)-4'-(trifluoromethyl)-1,1'-biphenyl (15)

$C_{14}H_{11}F_3O$

MW : 270.68 g.mol⁻¹

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

Compound **14** (1 eq, 9.51 mmol) was dissolved in 20 mL of $CHCl_3$. $SOCl_2$ (2 eq, 19.0 mmol) was then added and the reaction was stirred at rt during 12h. The reaction mixture was evaporated to dryness and diluted with water (30 mL) and EtOAc (60 mL). The mixture was then extracted three times (3 x 60 mL). The combined organic phases were washed with saturated Na_2CO_3 (20 mL), dried and filtered. After removal of the solvent under reduced pressure, the remaining oil was purified using column chromatography (silica gel, 98/2 Hex/EtOAc) to obtain the desired compound as a colourless solid (2.35 g, 91%).

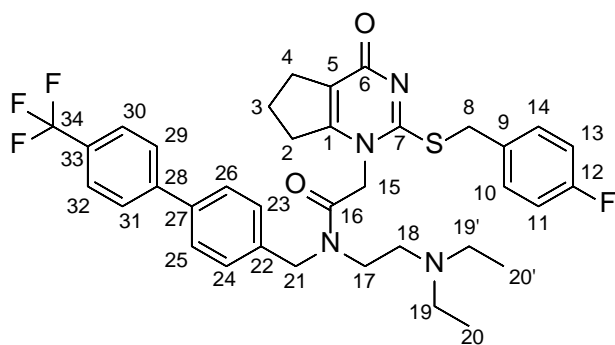
Analysis and spectral data:

Rf: 0.20 in 98/2 Hex/EtOAc;

¹H-NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 7.69 (m, 4H, $H_4+H_6+H_9+H_{13}$), 7.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, $H_{10}+H_{12}$), 7.50 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_3+H_7), 4.65 (s, 2H, H_{14});

¹³C-NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 144.2 (1C, C_{11}), 140.0 (1C, C_5), 137.6 (1C, C_8), 129.8 (m, 1C, C_2), 129.4 (2C, $C_{10}+C_{12}$), 127.8 (2C, C_4+C_6), 127.6 (2C, C_9+C_{13}), 125.9 (m, 2C, C_3+C_7), 120.3 (m, 1C, C_1), 45.9 (1C, C_{14});

Spectral analysis is conform with reported data (Bartel, Hahn *et al.* 2009);



N-(2-(Diethylamino)ethyl)-2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)-N-((4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)acetamide (16)

$C_{36}H_{38}F_4N_4O_2S$

MW : 666,78 g.mol⁻¹

Aspect : pale yellow solid

Experimental procedure:

Compound **2** (1 eq, 0.51 mmol) and **13** (1 eq, 0.51 mmol) were dissolved in DMF (1 mL) then stirred with DIPEA (2 eq, 1.03 mmol) for 10 min at rt. The reaction was then cooled with an ice bath to 0°C and COMU (1 eq, 0.51 mmol) was added portionwise. The mixture was stirred at 0°C for 1h then the bath was removed and the reaction was allowed to reach rt and continued for 5h. The compound was extracted using EtOAc 3 times (3 x 10 mL). Afterwards, the combined organic layers were then washed several times with saturated NaHCO₃ (10 mL) until the washing solution was colourless. The resulting organic solution was dried, filtered and evaporated under vacuum. The remaining paste was purified using preparative chromatography (silica gel, 90/10 AE/MeOH) to afford the desired compound as a pale yellow solid (220 mg, 65%).

Analysis and spectral data:

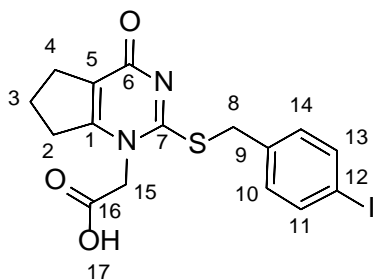
Rf: 0.30 in 90/10 AE/MeOH;

M.p. 94.0 °C;

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) *Mix of rotamers ratio (1/1)* δ: 7.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H₃₀+H₃₂), 7.63 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H₂₅+H₂₆), 7.58 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H₂₅+H₂₆), 7.47-7.45 (m, 2H, H₂₉+H₃₁), 7.36-7.33 (m, 1H, H₂₃+H₂₄), 7.31-7.29 (m, 2H, H₁₀+H₁₄), 7.28-7.27 (m, 1H, H₂₃+H₂₄), 6.96 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H₁₁+H₁₃), 6.89 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H₁₁+H₁₃), 4.96 (s, 1H, H₁₅), 4.70 (s, 1H, H₁₅), 4.69 (s, 1H, H₂₁), 4.67 (s, 1H, H₂₁), 4.50 (s, 1H, H₈), 4.40 (s, 1H, H₈), 3.66 (m, 1H, H₁₇), 3.30 (m, 1H, H₁₇), 2.88 (m, 1H, H₂), 2.82 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H₁₈), 2.77-2.75 (m, 4H, H₄+H₁₉), 2.59 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H₂), 2.52 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H₁₉), 2.10 (quint, $J = 7.4$ Hz, 1H, H₃), 2.04 (quint, $J = 7.4$ Hz, 1H, H₃), 1.10 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H₂₀), 0.98 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H₂₀);

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) *Mix of rotamers* δ: 167.5 (C₁₆), 166.5 (C₁₆), 162.2 (d, $J_{CF} = 240$ Hz, C₁₂), 161.4 (C₆), 161.3 (C₆), 156.8 (C₇), 156.5 (C₇), 144.1 (C₁), 143.6 (C₁), 139.8 (C₂₈), 139.3 (C₂₈), 136.8 (C₂₇), 135.4 (C₂₂), 131.5 (d, $J_{CF} = 3$ Hz, C₉), 131.2 (d, $J_{CF} = 9$ Hz, C₁₀+C₁₄), 131.1 (d, $J_{CF} = 3$ Hz, C₉), 129.8 (m, C₃₃), 128.8 (C₂₅+C₂₆), 128.0 (m, C₂₉+C₃₁), 127.7 (m, C₂₉+C₃₁), 127.4 (C₂₅+C₂₆), 127.3 (C₂₃+C₂₄), 127.2 (C₂₃+C₂₄), 125.9 (m, C₃₀+C₃₂), 124.4 (m, C₃₄), 121.3 (C₅), 121.2 (C₅), 115.7 (d, $J_{CF} = 23$ Hz, C₁₁+C₁₃), 115.6 (d, $J_{CF} = 23$ Hz, C₁₁+C₁₃), 51.4 (C₂₁), 50.4 (C₁₅), 50.3 (C₁₅), 50.1 (C₁₇), 49.2 (C₁₇), 47.8 (C₁₉+C_{19'}), 47.3 (C₁₉+C_{19'}), 46.1 (C₁₈), 36.6 (C₈), 36.5 (C₈), 32.1 (C₂), 32.0 (C₂), 28.5 (C₄), 28.4 (C₄), 20.9 (C₃), 20.8 (C₃), 11.8 (C₂₀+C_{20'});

Spectral analysis is conform with reported data (Nagano, Hsu *et al.* 2013);



2-(2-((4-iodobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetic acid (17)

$C_{16}H_{15}IN_2O_3S$

MW : 442,27 g.mol⁻¹

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

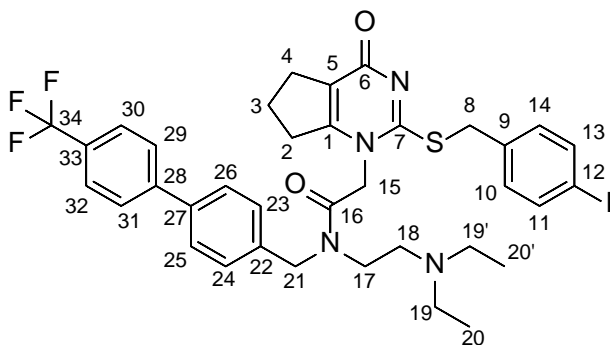
Compound **1** (1 eq, 2.21 mmol) was stirred in a mixture of water (3 mL) and isopropyl alcohol (820 μ L). KOH aqueous solution (50% w/v, 1.9 eq, 4.20 mmol) was added followed by K_2CO_3 (0.15 eq, 0.33 mmol) and the reaction was heated to 40° C under constant stirring. 4-iodobenzyl bromide (1 eq, 4.20 mmol) was then added and the reaction was stirred at 40° C for 3 hours. The reaction was cooled to room temperature and formic acid (0.5 eq, 0.8 mmol) was added to crystallize the product. After 1h, more formic acid (1.7 eq, 3.76 mmol) was slowly added and the reaction was stirred for at least an hour until crystallization was complete. The product was collected through filtration and washed twice with a 4:1 (v:v) mixture of water and isopropyl alcohol (1 mL) followed by isopropyl alcohol (1 mL). The product was stirred in Et_2O overnight to remove remaining organic impurities and filtered again. Product was dried at 50° C to afford the title compound as a colourless solid (712 mg, 73%).

Analysis and spectral data:

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 7.67 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H₁₁+H₁₃), 7.23 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H₁₀+H₁₄), 4.65 (s, 2H, H₁₅), 4.38 (s, 2H, H₈), 2.82 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H₂), 2.58 (t, $J = 7.1$ Hz, H₄), 1.96 (quint, $J = 7.1$ Hz, 2H, H₃);

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ : 170.0 (1C, C₁₆), 168.1 (1C, C₆), 164.6 (1C, C₁₂), 162.5 (1C, C₇), 134.8 (1C, C₉), 131.2 (2C, C₁₀+C₁₄), 119.5 (1C, C₅), 115.6 (2C, C₁₁+C₁₃), 50.7 (1C, C₁₅), 33.9 (1C, C₈), 33.8 (1C, C₄), 26.2 (1C, C₂), 21.9 (1C, C₃);

Compound is currently under analysis.



N-(2-(diethylamino)ethyl)-2-(2-((4-iodobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)-N-((4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)acetamide (18)

$C_{36}H_{38}F_3IN_4O_2S$

MW : 774,69 g.mol⁻¹

Aspect : pale yellow solid

Experimental procedure:

Compound **13** (1 eq, 0.23 mmol) and **17** (1 eq, 0.23 mmol) were dissolved in DMF (2 mL) then stirred with DIPEA (2 eq, 0.46 mmol) for 10 min at rt. The reaction was then cooled with an ice bath to 0°C and COMU (1 eq, 0.23 mmol) was added portionwise. The mixture was stirred at 0°C for 1h then the bath was removed and the reaction was allowed to reach rt was continued for 5h. The compound was extracted using EtOAc 3 times (3 x 10 mL). The combined organic layers were then washed several times with saturated NaHCO₃ (15 mL) until the washing solution was colourless. The resulting organic solution was dried, filtered and evaporated under vacuum. The remaining paste was purified using preparative chromatography (silica gel, 95/5 DCM/MeOH) to afford the desired compound as a pale yellow solid (151 mg, 85%).

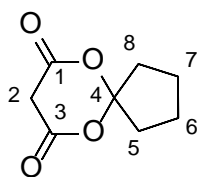
Analysis and spectral data:

Rf: 0.20 in 95/5 DCM/MeOH;

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) *Mix of rotamers ratio (3/2)* δ 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 1.2H, H₃₀+H₃₂), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.8H, H₃₀+H₃₂), 7.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 0.8H, H₂₅+H₂₆), 7.61-7.58 (m, 2H, H₂₉+H₃₁), 7.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1.2H, H₂₅+H₂₆), 7.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₂₃+H₂₄), 7.33-7.30 (m, 2H, H₁₁+H₁₃), 7.14 (d, *J* = 7.4 Hz, 0.8H, H₁₀+H₁₄), 7.06 (d, *J* = 7.4 Hz, 1.2H, H₁₀+H₁₄), 4.94 (s, 0.8H, H₁₅), 4.81 (bs, 1.2H, H₁₅), 4.74 (s, 1.2H, H₂₁), 4.68 (s, 0.8H, H₂₁), 4.48 (s, 0.8H, H₈), 4.39 (s, 1.2H, H₈), 3.78 (m, 1.2H, H₁₇), 3.30 (m, 0.8H, H₁₇), 3.16-2.83 (m, 3.6H, H₁₈+H₁₉+H_{19'}), 2.81-2.78 (m, 2H, H₂), 2.59 (m, 0.8H, H₄), 2.54 (m, 1.2H, H₄), 2.13-2.09 (m, 0.8H, H₃), 2.08-2.04 (m, 1.2H, H₃), 1.75-1.49 (m, 2.4H, H₁₉+H_{19'}), 1.25-1.21 (m, 2.4H, H₂₀+H_{20'}), 1.00 (t, *J* = 7.1 Hz, 3.6H, H₂₀+H_{20'});

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) *Mix of rotamers* δ: 167.4 (C₁₆), 167.3 (C₁₆), 165.6 (C₆), 161.0 (C₇), 144.1 (C₁), 143.6 (C₁), 140.0 (C₂₈), 139.4 (C₂₈), 137.9 (C₁₁+C₁₃), 137.8 (C₁₁+C₁₃), 136.8 (C₂₇), 135.6 (C₂₂), 135.2 (C₉), 131.4 (C₁₀+C₁₄), 131.3 (C₁₀+C₁₄), 129.9 (m, C₃₄), 129.6 (m, C₃₃), 128.8 (m, C₃₀+C₃₂), 128.1 (C₂₅+C₂₆), 127.7 (C₂₅+C₂₆), 127.4 (C₂₃+C₂₄), 127.3 (C₂₃+C₂₄), 127.2 (m, C₃₀+C₃₂), 126.2 (m, C₂₉+C₃₁), 126.0 (m, C₂₉+C₃₁), 121.4 (C₅), 121.3 (C₅), 93.4 (C₁₂), 51.4 (C₁₅), 51.3 (C₁₅), 50.5 (C₁₇), 50.0 (C₁₆), 49.1 (C₂₁), 47.8 (C₁₉+C_{19'}), 47.1 (C₈), 36.7 (C₂), 36.6 (C₂), 32.2 (C₄), 32.1 (C₄), 28.5 (C₃), 28.4 (C₃), 20.9 (C₂₀+C_{20'});

Compound is currently under analysis.



6,10-dioxaspiro[4.5]decane-7,9-dione (19)

$C_8H_{10}O_4$

MW : 170,16 g.mol⁻¹

Aspect : pale brown solid

Experimental procedure:

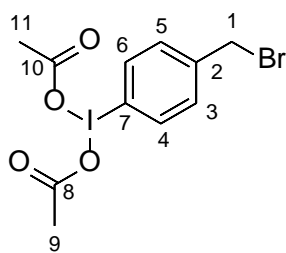
Acetic anhydride (1 eq, 11.9 mmol) and malonic acid (1 eq, 11.9 mmol) were dissolved together. Sulfuric acid (few drops) was added and the mixture was heated at 60°C for 15 min. The reaction was cooled to RT and cyclopentanone (1 eq, 11.9 mmol) was then added over 20 min and stirred at rt for 12h. The reaction was evaporated to dryness and the product was recrystallized in Et₂O/Hex then filtered and washed with Hex to obtain the titled compound as a pale brown solid (665 mg, 33%).

Analysis and spectral data:

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 3.61 (s, 2H, H₂), 2.21 (m, 4H, H₅+H₈), 1.90 (m, 4H, H₆+H₇);

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 163.5 (2C, C₁+C₃), 115.6 (1C, C₄), 38.7 (1C, C₂), 37.7 (2C, C₅+C₈), 23.5 (2C, C₆+C₇);

Spectral analysis is conform with reported data (Carneiro, Trivella *et al.* 2015);



(4-(bromomethyl)phenyl)-1,3-iodanediyl diacetate (20)

$C_{11}H_{12}BrIO_4$

MW : 415,02 g.mol⁻¹

Aspect : white needles

Experimental procedure:

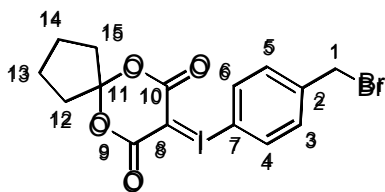
To a solution of 4-iodobenzyl bromide (1 eq, 1.68 mmol) in AcOH (11 mL) is added mCPBA (1.1 eq, 1.85 mmol) with caution. The solution was stirred at 55°C for 30 hours. The reaction mixture was diluted with water (15 mL) and extracted three times with DCM (3 x 8 mL). The combined organic layers were dried, filtered and evaporated. The compound was recrystallized in Et₂O/Hex to yield the desired compound as white needles (413 mg, 64%).

Analysis and spectral data:

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 8.05 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₄+H₆), 7.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₃+H₅), 4.49 (s, 2H, H₁), 2.01 (s, 6H, H₉+H₁₁);

Compound is currently under analysis.

Spectral analysis is conform with reported data (Chun and Pike 2012);



8-((4-bromophenyl)oxy)-6,6-dioxaspiro[4.5]undecane (21)

$C_{15}H_{14}BrO_4$

MW : 465,08 g.mol⁻¹

Aspect : off white paste

Experimental procedure:

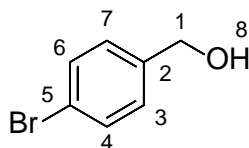
To a solution of **20** (1 eq, 0.52 mmol) in Na₂CO₃ 10% in water (1.6 mL) is added quickly **19**. The reaction was stirred vigorously at rt for 4h 30 min. Water (3 mL) was added and the compound was extracted three times using DCM (3 x 5 mL). The combined organic layers were then dried, filtered and evaporated under vacuum. The remaining paste was purified using column chromatography (silica gel, 100 AE) to afford the desired compound as an off white paste (120 mg, 50%)

Analysis and spectral data:

Rf: 0.20 in 100 AE;

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 7.82 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₄+H₆), 7.45 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₃+H₅), 4.45 (s, 2H, H₁), 2.16 (m, 4H, H₁₂+H₁₅), 1.80 (m, 4H, H₁₃+H₁₄);

Compound is currently under analysis.



(4-bromophenyl)methanol (22)

C_7H_7BrO

MW : $187.04 \text{ g.mol}^{-1}$

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

Bromobenzaldehyde (1 eq, 5.40 mmol) was dissolved in THF/MeOH (7/3 v/v; 32/13 mL). The reaction was cooled to 0°C with an ice bath then sodium borohydride (1.5 eq, 8.10 mmol) was added with caution portion-wise. The mixture was then stirred at rt for 30 min. HCl 1N was added to quench unreacted hydride. The reaction was extracted using DCM 3 times (3 x 10 mL) then the combined organic extracts were washed with water (15 mL) and brine (15 mL) followed by drying and filtering. Removal of the solvent under reduced pressure afforded the desired compound as a colourless solid (953 mg, 91%).

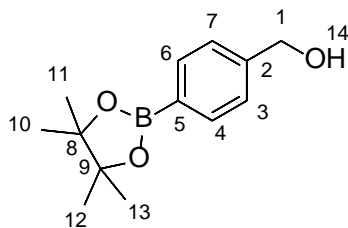
Analysis and spectral data:

Rf: 0.20 in 40/60 Et₂O/Hex;

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.48 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H₄+H₆), 7.24 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H₃+H₇), 4.65 (s, 2H, H₁), 1.71 (bs, 1H, H₈);

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 139.9 (1C, C₂), 131.8 (2C, C₄+C₆), 128.7 (2C, C₃+C₇), 121.6 (1C, C₅), 64.8 (1C, C₁);

Spectral analysis is conform with reported data (Lakshman, Tine *et al.* 2017);



(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)methanol (23)

$C_{13}H_{19}BO_3$

MW : 234.10 $g \cdot mol^{-1}$

Aspect : colourless oil

Experimental procedure:

The compound **22** (1 eq, 0.53 mmol) was dissolved in DMSO (2 mL) followed by the addition of potassium acetate (3 eq, 1.59 mmol), bis(pinacolato)diboron (1.1 eq, 0.59 mmol) and Pd(dppf)Cl₂ (0.2 eq, 0.11 mmol). The mixture was deoxygenated by three successive argon bubbling/vacuum cycles. The reaction was then heated at 85°C under argon for 18h. Water (5 mL) was added and the resulting black solution was extracted 3 times with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic extracts were washed with brine (10 mL), dried, filtered and evaporated under vacuum. The resulting paste was purified using column chromatography (silica gel, 70/30 Hex/EtOAc) to afford the desired compound as a colourless oil (113 mg, 91%).

Analysis and spectral data:

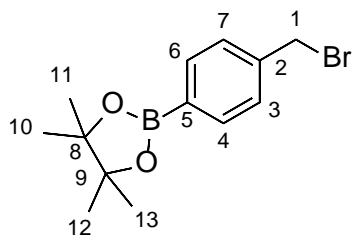
Rf: 0.30 in 70/30 Hex/EtOAc;

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.80 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H₃+H₇), 7.36 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H₄+H₆), 4.71 (s, 2H, H₁), 2.17 (bs, 1H, H₁₄), 1.34 (s, 12H, H₁₀+H₁₁+H₁₂+H₁₃);

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 144.1 (1C, C₂), 135.2 (2C, C₄+C₆), 126.2 (2C, C₃+C₇), 126.0 (1C, C₅), 84.0 (2C, C₈+C₉), 65.4 (1C, C₁), 25.0 (4C, C₁₀+C₁₁+C₁₂+C₁₃);

ESI-MS m/z for C₁₃H₁₉BO₃ [MNa]⁺ 257.5;

Spectral analysis is conform with reported data (Xie, Ni *et al.* 2017);



2-(4-(Bromomethyl)phenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane (24)

$C_{13}H_{18}BBrO_2$

MW : 297.00 $g \cdot mol^{-1}$

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

The compound **23** (1 eq, 5.72 mmol) was dissolved in THF (25 mL) followed by the addition of triphenylphosphine (2 eq, 11.4 mmol). The mixture was cooled to 0°C with an ice bath then tetrabromomethane (2 eq, 11.4 mmol) was carefully added portion-wise. The reaction was stirred at rt for 18h. The solution was poured into water (30 mL) and extracted 3 times with EtOAc (3 x 30 mL). The combined organic layers were dried, filtered and evaporated under vacuum. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 99/1 Hex/EtOAc) to afford the desired compound as a colourless solid (1.6 g, 94%).

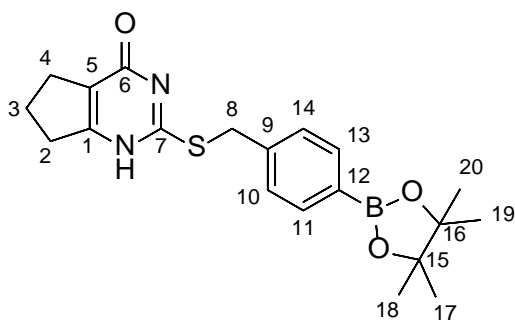
Analysis and spectral data:

Rf: 0.20 in 99/1 Hex/EtOAc;

1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 7.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_3+H_7), 7.39 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_4+H_6), 4.49 (s, 2H, H_1), 1.34 (s, 12H, $H_{10}+H_{11}+H_{12}+H_{13}$);

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 140.8 (2C, C_2), 135.4 (2C, C_4+C_6), 128.5 (2C, C_3+C_7), 126.3 (1C, C_5), 84.1 (2C, C_8+C_9), 33.5 (1C, C_1), 25.0 (4C, $C_{10}+C_{11}+C_{12}+C_{13}$);

Spectral analysis is conform with reported data (Levin, Zemtsov *et al.* 2013);



2-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzylthio)-6,7-dihydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-4(5H)-one (25)

$C_{20}H_{25}BN_2O_3S$

MW : 384.30 $g \cdot mol^{-1}$

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

Compound **3** (1 eq, 0.48 mmol), potassium carbonate (1.5 eq, 0.72 mmol) and potassium iodide (0.1 eq, 0.048 mmol) were stirred in acetone (3 mL) at rt. Compound **24** (1.05 eq, 0.50 mmol) was then added and the mixture was refluxed (54°C) for 1h. An additional portion of potassium carbonate (0.2 eq, 0.14 mmol) was poured into the flask and the reflux was maintained for 2h. After cooling with an ice bath to 0°C, the pH was adjusted to 1 using concentrated HCl. The reaction was stirred for 30 min. The solid was then filtered and washed 3 times with water (5 mL x 3) then dried at 55°C to afford the desired compound as a colourless solid (170 mg, 98%).

Analysis and spectral data:

Rf: 0.60 in 80/20 EtOAc/Hex;

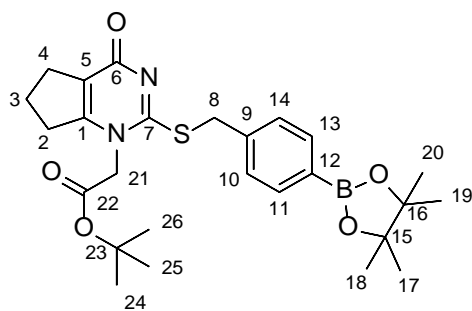
M.p. 222.0 °C;

IR (neat, cm^{-1}) ν 2975, 1656, 1611, 1534, 1398, 1360, 1268, 1190, 1166, 1144, 1089, 859, 656;

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 7.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H₁₀+H₁₄), 7.41 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H₁₁+H₁₃), 4.39 (s, 2H, H₈), 2.75 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H₂), 2.58 (m, 2H, H₄), 1.95 (quint, $J = 6.7$ Hz, 2H, H₃), 1.28 (s, 12H, H₁₇+H₁₈+H₁₉+H₂₀);

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ : 168.1 (1C, C₆), 159.1 (1C, C₇), 140.7 (1C, C₁), 134.5 (2C, C₁₁+C₁₃), 134.2 (1C, C₉), 128.6 (2C, C₁₀+C₁₄), 128.1 (1C, C₁₂), 119.9 (1C, C₅), 83.6 (2C, C₁₅+C₁₆), 34.3 (1C, C₂), 33.5 (1C, C₈), 26.7 (1C, C₄), 24.7 (4C, C₁₇+C₁₈+C₁₉+C₂₀), 20.5 (1C, C₃);

HRMS (ESI) calculated for $C_{20}H_{26}BN_2O_3S$ [MH]⁺ requires 385.1757, found 385.1761;



tert-butyl 2-(4-oxo-2-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)thio)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetate (26)

$C_{26}H_{35}BN_2O_5S$

MW : 498,44 g.mol⁻¹

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

Compound **25** (1 eq, 3.72 mmol), DiPEA (1.2 eq, 4.47 mmol) and tert-butyl bromoacetate (1 eq, 3.72 mmol) were dissolved in dry DCM (21 mL) and stirred at 42°C under argon for 20h. The solution was poured into water (25 mL) and extracted with EtOAc 3 times (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried, filtered and evaporated under vacuum. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 EtOAc/Hex) to obtain the desired compound as a colourless solid (490 mg, 26%).

Analysis and spectral data:

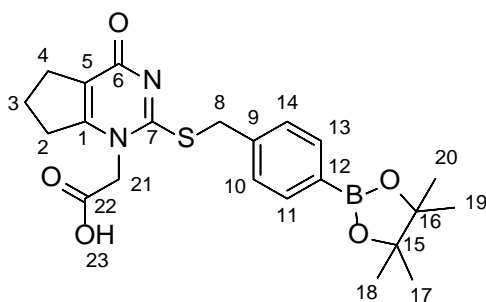
Rf: 0.30 in 90/10 EtOAc/Hex;

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 7.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₁₁+H₁₃), 7.41 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₁₀+H₁₄), 4.67 (s, 2H, H₂₁), 4.46 (s, 2H, H₈), 2.81 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₂), 2.58 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₄), 1.97 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₃), 1.39 (s, 9H, H₂₄+H₂₅+H₂₆), 1.28 (s, 12H, H₁₇+H₁₈+H₁₉+H₂₀);

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 165.9 (1C, C₂₂), 165.2 (1C, C₆), 160.3 (1C, C₇), 156.2 (1C, C₁), 140.2 (1C, C₉), 134.5 (2C, C₁₁+C₁₃), 128.6 (2C, C₁₀+C₁₄), 128.1 (1C, C₁₂), 119.7 (1C, C₅), 83.6 (2C, C₁₅+C₁₆), 82.9 (1C, C₂₃), 50.4 (1C, C₂₁), 35.2 (1C, C₈), 31.3 (1C, C₂), 27.9 (1C, C₄), 27.5 (3C, C₂₄+C₂₅+C₂₆), 24.6 (4C, C₁₇+C₁₈+C₁₉+C₂₀), 20.2 (1C, C₃);

HRMS (ESI) calculated for C₂₆H₃₆BN₂O₅S [MH]⁺ requires 499.2438 found 499.2426;

Compound is currently under analysis.



tert-butyl 2-(4-oxo-2-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)thio)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetate (27)

$C_{22}H_{27}BN_2O_5S$

MW : 442,34 g.mol⁻¹

Aspect : off white solid

Experimental procedure:

Compound **26** (1 eq, 0.54 mmol) was dissolved in DCM (10 mL). TFA (40 eq, 21.7 mmol) was then added followed by slow addition of triisopropylsilane (2.5 eq, 1.35 mmol) at 0°C. The reaction mixture was stirred at rt under argon for 20h. The clear solution was vacuumed to dryness and the compound was triturated in Et₂O and dried to afford the desired compound as an off white solid (152 mg, 64%).

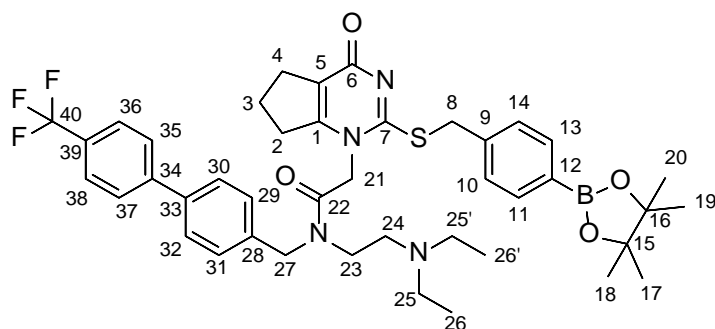
Analysis and spectral data:

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 7.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H₁₁+H₁₃), 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H₁₀+H₁₄), 4.68 (s, 2H, H₂₁), 4.45 (s, 2H, H₈), 2.82 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₂), 2.58 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₄), 1.96 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₃), 1.28 (s, 12H, H₁₇+H₁₈+H₁₉+H₂₀);

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 168.2 (1C, C₂₂), 165.2 (1C, C₆), 160.3 (1C, C₇), 156.3 (1C, C₁), 140.1 (1C, C₉), 134.5 (2C, C₁₁+C₁₃), 128.6 (2C, C₁₀+C₁₄), 128.1 (1C, C₁₂), 119.6 (1C, C₅), 83.7 (2C, C₁₅+C₁₆), 49.9 (1C, C₂₁), 35.3 (1C, C₈), 31.2 (1C, C₂), 27.9 (1C, C₄), 24.6 (4C, C₁₇+C₁₈+C₁₉+C₂₀), 20.1 (1C, C₃);

HRMS (ESI) calculated for C₂₂H₂₈BN₂O₅S [MH]⁺ requires 443.1812 found 443.1815;

Compound is currently under analysis.



N-(2-(diethylamino)ethyl)-2-(4-oxo-2-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)thio)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)-N-((4-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)acetamide (28**)**

$C_{42}H_{50}BF_3N_4O_4S$

MW : 774.75 g.mol⁻¹

Aspect : light yellow solid

Experimental procedure:

Compound **13** (1 eq, 0.11 mmol) and **27** (1 eq, 0.11 mmol) were dissolved in DMF (1.5 mL) then stirred with DIPEA (2 eq, 0.22 mmol) for 10 min at rt. The reaction was then cooled with an ice bath to 0°C and COMU (1 eq, 0.11 mmol) was added portionwise. The mixture was stirred at 0°C for 1h then the bath was removed and the reaction was allowed to reach RT and was continued for 12h. The compound was extracted using EtOAc 3 times (3 x 5 mL). The combined organic layers were then washed several times with saturated NaHCO₃ (10 mL) until the washing solution was colourless. The resulting organic solution was dried, filtered and evaporated under vacuum. The remaining paste was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 DCM/MeOH) to afford the desired compound as a light yellow solid (60 mg, 70%).

Analysis and spectral data:

Rf: 0.35 in 90/10 DCM/MeOH;

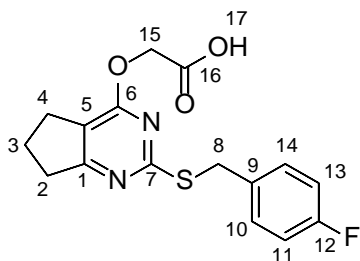
M.p. 94.0 °C

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) *Mix of rotamers ratio (13/7)* δ: 7.89-7.72 (m, 5H, H_{aromatics}), 7.69-7.66 (m, 3H, H_{aromatics}), 7.45-7.30 (m, 4H, H_{aromatics}), 5.13 (s, 1.3H, H₁₅), 4.87 (m, 0.7H, H₂₁+H₂₇), 4.73 (s, 0.7H, H₈), 4.62 (s, 1.3H, H₈), 4.46 (m, 0.7H, H₂₁+H₂₇), 4.44-4.34 (m, 1.3H, H₂₁+H₂₇), 3.48-3.45 (m, 0.3H, H₂₃), 3.44-3.38 (m, 1.7H, H₂₃), 2.79-2.71 (m, 2H, H₂), 2.62-2.72 (m, 4H, H₂₅+H_{25'}), 2.77-2.75 (m, 4H, H₄+H₁₉), 2.45-2.41 (m, 2H, H₄), 2.00-1.93 (m, 2H, H₃), 1.26 (s, 4H, H₁₄+H₁₈+H₁₉+H₂₀), 1.23 (s, 8H, H₁₄+H₁₈+H₁₉+H₂₀), 0.89 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H, H₂₆+H_{26'}), 0.84 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₂₆+H_{26'});

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) *Mix of rotamers* δ: 167.8 (C₂₂), 167.8 (C₂₂), 167.6 (C₆), 167.5 (C₆), 162.7 (C₇), 162.5 (C₇), 145.8 (C₁), 145.7 (C₁), 140.0 (C₃₄), 139.4 (C₃₃), 136.6 (C₂₈), 136.3 (C₁₂), 130.7 (C₁₁+C₁₃), 130.6 (C₁₁+C₁₃), 130.3 (C₁₀+C₁₄), 130.2 (C₁₀+C₁₄), 129.6 (C₃₉), 129.3 (m, C₉ +C₂₉+C₃₁+C₃₅+C₃₇), 129.0 (C₃₀+C₃₂) 127.8 (m, C₃₆+C₃₈), 121.5 (m, C₄₀), 118.2 (C₁₂), 115.5 (C₅), 85.6 (C₁₅+C₁₆), 71.8 (C₂₄), 60.9 (C₂₁), 52.4 (C₂₇), 52.0 (C₂₇), 50.3 (C₂₃), 50.1 (C₂₃), 48.9 (C₂₅+C_{25'}), 48.7 (C₂₅+C_{25'}), 37.4 (C₈), 31.0 (C₂), 30.0 (C₄), 26.6 (C₁₇+C₁₈+C₁₉+C₂₀), 22.1 (C₃), 13.6 (C₂₆+C_{26'});

HRMS (ESI) calculated for C₄₂H₅₁BF₃N₄O₄S [MH]⁺ requires 775.3676 found 775.3690;

Compound is currently under analysis.



2-((2-((4-Fluorobenzyl)thio)-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[d]pyrimidin-4-yl)oxy)acetic acid (29)

$C_{16}H_{15}FN_2O_3S$

MW :334,37 $g \cdot mol^{-1}$

Aspect : off white solid

Experimental procedure:

Compound **6** (1 eq, 8.11 mmol) was dissolved in DCM (31 mL). TFA (20 eq, 162 mmol) was then added and the reaction mixture was stirred at rt under argon for 18h. The solution was vacuumed to dryness and the paste was then triturated in Et₂O. The product was dried to yield the desired product as an off white solid (2.07 g, 76%).

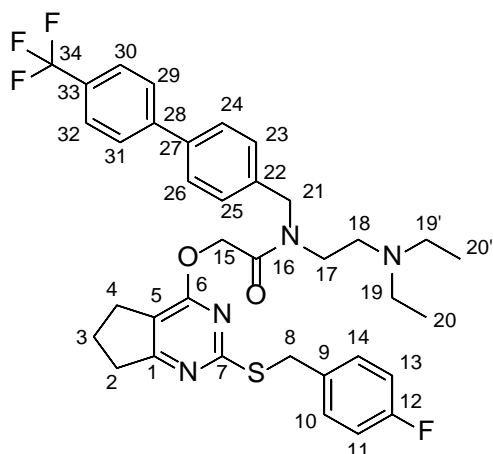
Analysis and spectral data:

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 13.06 (1H, H₁₇), 7.44-7.42 (m, 2H, H₁₁+H₁₃), 7.14-7.11 (m, 2H, H₁₀+H₁₄), 4.89 (s, 2H, H₁₅), 4.33 (s, 2H, H₈), 2.84 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, H₂), 2.76 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, H₄), 2.05 (quint, $J = 6.4$ Hz, 2H, H₃);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ : 176.1 (1C, C₁), 169.5 (1C, C₇), 167.8 (1C, C₁₆), 164.1 (1C, C₆), 161.2 (d, $J_{CF} = 290$ Hz, 1C, C₁₂), 134.3 (d, $J_{CF} = 5$ Hz, 1C, C₉), 130.7 (d, $J_{CF} = 11$ Hz, 2C, C₁₀+C₁₄), 115.2 (d, $J_{CF} = 26$ Hz, 2C, C₁₁+C₁₃), 115.1 (1C, C₅), 62.3 (1C, C₁₅), 33.4 (1C, C₈), 33.3 (1C, C₂), 25.7 (1C, C₄), 21.4 (1C, C₃);

HRMS (ESI) calculated for $C_{16}H_{16}FN_2O_3S$ [MH]⁺ requires 335.0866 found 335.0871;

Compound is currently under analysis.



N-(2-(diethylamino)ethyl)-2-(2-(4-fluorobenzylthio)-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[d]pyrimidin-4-yloxy)-N-((4'-(trifluoromethyl)biphenyl-4-yl)methyl)acetamide (30)

$C_{36}H_{38}F_4N_4O_2S$

MW : 666,78 g.mol⁻¹

Aspect : off white solid

Experimental procedure:

Compound **13** (1 eq, 0.15 mmol) and **29** (1 eq, 0.15 mmol) were dissolved in DMF (2 mL) then stirred with DIPEA (2 eq, 0.30 mmol) for 10 min at rt. The reaction was then cooled with an ice bath to 0°C and COMU (1 eq, 0.15 mmol) was added portionwise. The mixture was stirred at 0°C for 1h then the bath was removed and the reaction was allowed to reach rt and was continued for 5h. The compound was extracted using EtOAc 3 times (3 x 5 mL). The combined organic layers were then washed several times with saturated NaHCO₃ (10 mL) until the washing solution was colourless. The resulting organic solution was dried, filtered and evaporated under vacuum. The remaining paste was purified using column chromatography (silica gel, 98/2 DCM/MeOH) to afford the desired compound as an off white solid (93 mg, 93%).

Analysis and spectral data:

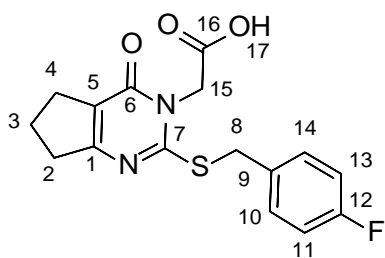
Rf: 0.20 in 98/2 DCM/MeOH;

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) *Mix of rotamers ratio (1/1)* δ: 7.82-7.75 (m, 4H, H₂₄+H₂₆+H₃₀+H₃₂), 7.68 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₂₉+H₃₁), 7.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₂₉+H₃₁), 7.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₂₃+H₂₅), 7.43-7.37 (m, 2H, H₁₀+H₁₄), 7.35 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₂₃+H₂₅), 7.10 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₁₁+H₁₃), 7.06 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₁₁+H₁₃), 5.30 (s, 1H, H₂₁), 5.22 (s, 1H, H₂₁), 4.68 (s, 1H, H₁₅), 4.59 (s, 1H, H₁₅), 4.34 (s, 1H, H₈), 4.33 (s, 1H, H₈), 3.57-3.55 (m, 1H, H₁₇), 3.45-3.41 (m, 2H, H₁₈), 3.08-3.06 (m, 1H, H₁₇), 2.89-2.82 (m, 4H, H₁₉+H_{19'}), 2.80 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₂), 2.74 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₂), 2.55-2.51 (m, 2H, H₄), 2.11-2.01 (m, 2H, H₃), 1.05-0.90 (m, 6H, H₂₀+H_{20'});

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) *Mix of rotamers* δ: 175.8 (C₁), 175.7 (C₁), 167.6 (C₇), 167.5 (C₇), 167.0 (C₁₆), 164.4 (C₆), 164.3 (C₆), 161.3 (d, $J_{CF} = 290$ Hz, C₁₂), 161.2 (d, $J_{CF} = 290$ Hz, C₁₂), 143.8 (C₂₈), 143.6 (C₂₈), 138.1 (C₂₇), 137.9 (C₂₇), 137.7 (C₂₂), 137.3 (C₂₂), 134.1 (m, C₃₃), 130.8 (d, $J_{CF} = 11$ Hz, C₁₀+C₁₄), 130.7 (d, $J_{CF} = 11$ Hz, C₁₀+C₁₄), 128.2 (m, C₃₀+C₃₂), 127.7 (m, C₃₀+C₃₂), 127.4 (C₂₄+C₂₆), 127.3 (C₂₃+C₂₅), 127.2 (C₂₃+C₂₅), 127.1 (C₂₄+C₂₆), 125.8 (m, C₂₉+C₃₁), 124.1 (m, C₃₄), 115.3 (d, $J_{CF} = 26$ Hz, C₁₁+C₁₃), 115.2 (C₅), 65.9 (C₁₅), 63.2 (C₁₈), 62.8 (C₁₈), 47.9 (C₂₁), 47.0 (C₂₁), 46.8 (C₁₉+C_{19'}), 46.7 (C₁₇), 33.5 (C₂), 33.4 (C₂), 33.3 (C₈), 29.0 (C₄), 28.9 (C₄), 25.8 (C₃), 25.7 (C₃), 21.4 (C₂₀+C_{20'}), 21.3 (C₂₀+C_{20'});

HRMS (ESI) calculated for C₃₆H₃₉F₄N₄O₂S [MH]⁺ requires 667.2734 found 667.2730;

Compound is currently under analysis.



2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-3H-cyclopenta[d]pyrimidin-3-yl)acetic acid (31)

$C_{16}H_{15}FN_2O_3S$

MW : 334,37 g.mol⁻¹

Aspect : off white solid

Experimental procedure:

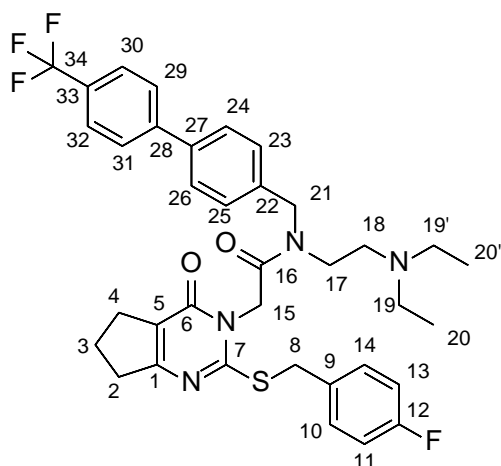
Compound **7** (1 eq, 0.64 mmol) was dissolved in DCM (3 mL). TFA (20 eq, 12.8 mmol) was then added and the reaction mixture was stirred at rt under argon for 18h. The solution was vacuumed to dryness and the paste was then triturated in Et₂O (2 mL). The product was dried to yield the desired product as an off white solid (188 mg, 88%).

Analysis and spectral data:

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 7.48-7.46 (m, 2H, H₁₀+H₁₄), 7.16-7.13 (m, 2H, H₁₁+H₁₃), 4.64 (bs, 2H, H₁₅), 4.44 (s, 2H, H₈), 2.81 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₂), 2.63 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₄), 2.00 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₃);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 168.6 (1C, C₁₆), 167.5 (1C, C₆), 161.1 (1C, C₇), 160.7 (d, *J*_{CF} = 239 Hz, 1C, C₁₂), 133.1 (d, *J*_{CF} = 3Hz, 1C, C₉), 131.7 (d, *J*_{CF} = 9 Hz, 2C, C₁₀+C₁₄), 118.9 (1C, C₅), 115.7 (d, *J*_{CF} = 21 Hz, 2C, C₁₁+C₁₃), 45.0 (1C, C₁₅), 35.2 (1C, C₈), 34.8 (1C, C₂), 27.6 (1C, C₄), 21.2 (1C, C₃);

Compound is currently under analysis.



N-(2-(diethylamino)ethyl)-2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-3H-cyclopenta[d]pyrimidin-3-yl)-N-((4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)acetamide (32)

$C_{36}H_{38}F_4N_4O_2S$

MW : 666,78 g.mol⁻¹

Aspect : off white solid

Experimental procedure:

Compound **13** (1 eq, 0.15 mmol) and **31** (1 eq, 0.15 mmol) were dissolved in DMF (2 mL) then stirred with DIPEA (2 eq, 0.30 mmol) for 10 min at rt. The reaction was then cooled with an ice bath to 0°C and COMU (1 eq, 0.15 mmol) was added portionwise. The mixture was stirred at 0°C for 1h then the bath was removed and the reaction was allowed to reach rt was continued for 5h. The compound was extracted using EtOAc 3 times (3 x 5 mL). The combined organic layers were then washed several times with saturated NaHCO₃ (10 mL) until the washing solution was colourless. The resulting organic solution was dried, filtered and evaporated under vacuum. The remaining paste was purified using column chromatography (silica gel, 95/5 DCM/MeOH) to afford the desired compound as an off white solid (60 mg, 60%).

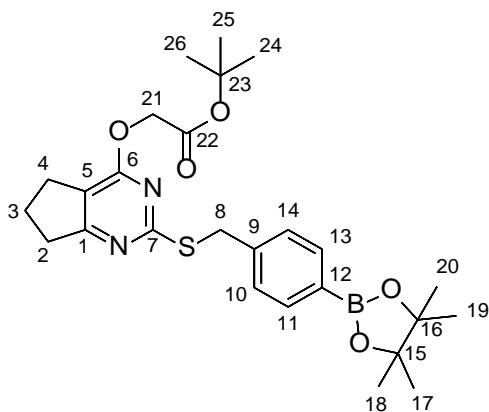
Analysis and spectral data:

Rf: 0.20 in 95/5 DCM/MeOH;

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) *Mix of rotamers ratio (3/1)* δ: 7.70-7.68 (m, 2H, H₃₀+H₃₂), 7.65-7.62 (m, 2H, H₂₄+H₂₆), 7.58 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₂₉+H₃₁), 7.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 0.5H, H₂₃+H₂₅), 7.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 1.5H, H₂₃+H₂₅), 7.38-7.36 (m, 0.5H, H₁₀+H₁₄), 7.34-7.32 (m, 1.5H, H₁₀+H₁₄), 7.00-6.95 (m, 2H, H₁₁+H₁₃), 5.05 (bs, 0.5H, H₁₅), 4.94 (s, 1.5H, H₁₅), 4.79 (s, 1.5H, H₂₁), 4.69 (bs, 0.5H, H₂₁), 4.44 (bs, 0.5H, H₈), 4.41 (s, 1.5H, H₈), 3.90-3.87 (m, 1.5H, H₁₇), 3.69-3.67 (m, 0.5H, H₁₇), 3.23-3.21 (m, 0.5H, H₁₈), 3.09-2.96 (m, 4.5H, H₁₈+H₁₉+H_{19'}), 2.86-2.84 (m, 3H, H₂+H₁₉+H_{19'}), 2.80 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₄), 2.07 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₃), 1.29-1.25 (m, 6H, H₂₀+H_{20'});

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) *Mix of rotamers* δ: 168.2 (C₁₆), 166.6 (C₆), 163.1 (C₇), 160.5 (C₁), 160.4 (C₁), 156.6 (d, $J_{CF} = 195$ Hz, C₁₂), 156.5 (d, $J_{CF} = 195$ Hz, C₁₂), 143.8 (C₂₈), 139.8 (C₂₇), 135.1 (C₂₂), 131.5 (d, $J_{CF} = 3$ Hz, C₉), 131.1 (d, $J_{CF} = 8$ Hz, C₁₀+C₁₄), 131.0 (m, C₂₉+C₃₁), 129.5 (C₃₄), 128.1 (C₂₃+C₂₅), 127.8 (C₂₃+C₂₅), 127.6 (C₂₄+C₂₆), 127.3 (C₂₄+C₂₆), 125.8 (m, C₃₀+C₃₂), 125.1 (C₃₃), 119.5 (C₅), 115.5 (d, $J_{CF} = 21$ Hz, C₁₁+C₁₃), 51.8 (C₁₈), 48.4 (C₂₁), 47.3 (C₁₅), 46.8 (C₁₉+C_{19'}), 45.3 (C₁₇), 36.3 (C₈), 36.0 (C₂), 29.7 (C₄), 27.5 (C₃), 21.3 (C₂₀+C_{20'});

Compound is currently under analysis.



tert-butyl 2-(4-oxo-2-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)thio)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetate (33)

$C_{26}H_{35}BN_2O_5S$

MW : 498.44 $g \cdot mol^{-1}$

Aspect : colourless solid

Experimental procedure:

Compound **25** (1 eq, 1.40 mmol), potassium carbonate (1.2 eq, 1.68 mmol) and *tert*-butyl bromoacetate (1.2 eq, 1.68 mmol) were dissolved in dry DMF (15 mL) and stirred at 75°C under argon for 18h. The reaction was monitored by TLC and the mixture was then dried under vacuum when it was deemed completed. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 Hex/EtOAc) to afford the desired compound as a colorless oil (654 mg, 94%).

Analysis and spectral data:

Rf: 0.30 in 90/10 Hex/EtOAc;

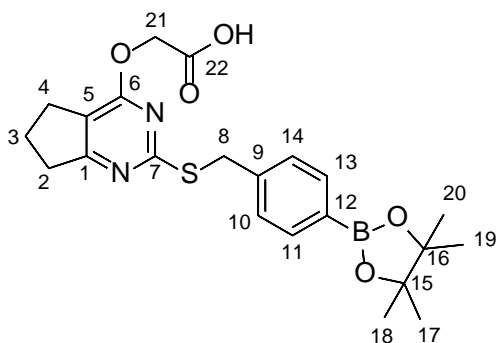
M.p. 56.6 °C;

IR (neat, cm^{-1}) ν 2976, 1752, 1610, 1588, 1557, 1437, 1394, 1357, 1325, 1140, 1087, 858, 656;

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.61 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H₁₁+H₁₃), 7.41 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H₁₀+H₁₄), 4.80 (s, 2H, H₂₁), 4.35 (s, 2H, H₈), 2.85 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H₂), 2.75 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H₄), 2.05 (quint, $J = 7.2$ Hz, 2H, H₃), 1.38 (s, 9H, H₂₄+H₂₅+H₂₆), 1.28 (s, 12H, H₁₇+H₁₈+H₁₉+H₂₀);

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 176.2 (1C, C₂₂), 167.6 (1C, C₇), 167.1 (1C, C₉), 164.0 (1C, C₆), 141.4 (1C, C₁₂), 134.5 (2C, C₁₀+C₁₄), 128.2 (2C, C₁₁+C₁₃), 127.7 (1C, C₁), 115.0 (1C, C₅), 83.6 (2C, C₁₅+C₁₆), 81.4 (1C, C₂₃), 62.9 (1C, C₂₁), 34.3 (1C, C₈), 33.4 (1C, C₂), 27.6 (3C, C₂₄+C₂₅+C₂₆), 25.7 (1C, C₄), 24.6 (4C, C₁₇+C₁₈+C₁₉+C₂₀), 21.4 (1C, C₃);

HRMS (ESI) calculated for $C_{26}H_{35}BN_2O_5S$ [MH]⁺ requires 499.2438 found 499.2438;



2-((2-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)thio)-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[d]pyrimidin-4-yl)oxy)acetic acid (34)

$C_{22}H_{27}BN_2O_5S$

MW : 442.34 $g \cdot mol^{-1}$

Aspect : off white solid

Experimental procedure:

Compound **25** (1 eq, 1.31 mmol) was dissolved in DCM (5 mL). TFA (12 eq, 15.72 mmol) was then added and the reaction mixture was stirred at rt under argon for 18h. The clear solution was vacuumed to dryness and the compound was purified using column chromatography (silica gel, 40/60 Hex/EtOAc) to afford the desired compound as an off white solid (426 mg, 74%).

Analysis and spectral data:

Rf: 0.20 in 40/60 Hex/EtOAc;

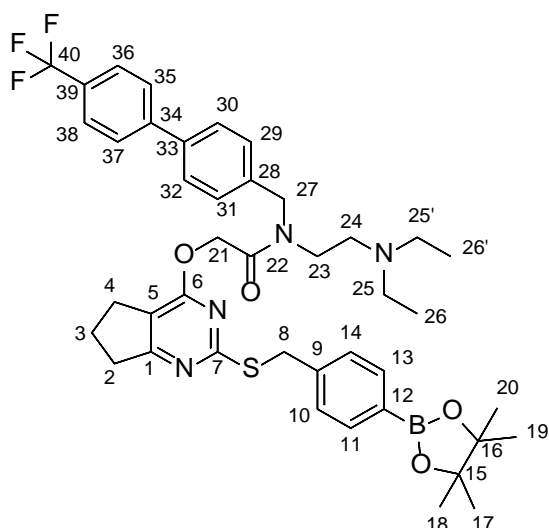
M.p. 214.4 °C;

IR (neat, cm^{-1}) ν 3604, 2975, 2835, 1748, 1611, 1587, 1395, 1360, 1325, 1167, 1088, 858, 655;

1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.61 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, $H_{11}+H_{13}$), 7.41 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, $H_{10}+H_{14}$), 4.89 (s, 2H, H_{21}), 4.35 (s, 2H, H_8), 2.84 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H_2), 2.75 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H_4), 2.05 (quint, $J = 7.2$ Hz, 2H, H_3), 1.28 (s, 12H, $H_{17}+H_{18}+H_{19}+H_{20}$);

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 176.1 (1C, C_{22}), 169.6 (1C, C_7), 167.6 (1C, C_9), 164.1 (1C, C_6), 141.6 (1C, C_{12}), 134.6 (2C, $C_{10}+C_{14}$), 128.8 (1C, C_1), 128.3 (2C, $C_{11}+C_{13}$), 115.0 (1C, C_5), 83.6 (2C, $C_{15}+C_{16}$), 62.3 (1C, C_{21}), 34.2 (1C, C_8), 33.4 (1C, C_2), 25.7 (1C, C_4), 24.6 (4C, $C_{17}+C_{18}+C_{19}+C_{20}$), 21.4 (1C, C_3);

HRMS (ESI) calculated for $C_{22}H_{28}BN_2O_5S$ $[MH]^+$ requires 443.1812 found 443.1797;



N-(2-(diethylamino)ethyl)-2-((2-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)thio)-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[d]pyrimidin-4-yl)oxy)-N-((4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)acetamide (35)

$C_{42}H_{50}BF_3N_4O_4S$

MW : 774.75 g.mol⁻¹

Aspect : off white solid

Experimental procedure:

Compound **10** (1 eq, 0.23 mmol) and **19** (1 eq, 0.23 mmol) were dissolved in DMF (2 mL) then stirred with DIPEA (2 eq, 0.46 mmol) for 10 min at rt. The reaction was then cooled with an ice bath to 0°C and COMU (1 eq, 0.23 mmol) was added portionwise. The mixture was stirred at 0°C for 1h then the bath was removed and the reaction was allowed to reach rt was continued for 5h. The compound was extracted using EtOAc 3 times (3 x 5 mL). The combined organic layers were then washed several times with saturated NaHCO₃ (10 mL) until the washing solution was colourless. The resulting organic solution was dried, filtered and evaporated under vacuum. The remaining paste was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 AE/MeOH) to afford the desired compound as an off white solid (115 mg, 65%).

Analysis and spectral data:

Rf: 0.30 in 90/10 /EtOAc/Hex;

M.p. 94.0 °C

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) *Mix of rotamers ratio (1/1)* δ: 7.75 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₁+H₁₃), 7.71 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₁+H₁₃), 7.68 (m, *J* = 6.7 Hz, 2H, H₃₆+H₃₈), 7.59 (m, 2H, H₂₉+H₃₁), 7.56 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₃₀+H₃₂), 7.51 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₃₀+H₃₂), 7.42 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₃₅+H₃₇), 7.37 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₃₅+H₃₇), 7.34 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₁₀+H₁₄), 5.14 (s, 1H, H₂₇), 5.06 (s, 1H, H₂₇), 4.67 (s, 1H, H₈), 4.63 (s, 1H, H₈), 4.38 (s, 1H, H₂₁), 4.32 (s, 1H, H₂₁), 3.69 (m, 1H, H₂₃), 3.50 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, H₂₄), 3.30 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, H₂₄), 3.23 (m, 1H,

H₂₃), 2.90 (m, 2H, H₂₅), 2.88 (m, 2H, H₂), 2.80 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H₄), 2.76 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, H₂), 2.64 (m, 2H, H₂₅), 2.57 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, H₄), 2.11 (quint, $J = 7.4$ Hz, 1H, H₃), 2.06 (quint, $J = 7.4$ Hz, 1H, H₃), 1.33 (s, 6H, H₁₇+H₁₈+H₁₉+H₂₀), 1.32 (s, 6H, H₁₇+H₁₈+H₁₉+H₂₀), 1.03 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H₂₆), 0.98 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H₂₆);

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) *Mix of rotamers* δ : 176.3 (1C, C₆), 176.2 (1C, C₆), 168.8 (1C, C₂₂), 167.9 (C₇), 164.7 (C₁), 164.5 (C₁), 144.3 (C₃₄), 143.9 (C₃₄), 141.0 (C₃₃), 140.9 (C₃₃), 139.4 (C₉), 138.9 (C₉), 137.5 (C₂₈), 136.7 (C₂₈), 135.1 (C₁₁+C₁₃), 135.0 (C₁₁+C₁₃), 129.8 (C₃₉), 129.7 (C₃₉), 129.6 (C₁₂), 129.5 (C₁₂), 128.7 (C₂₉+C₃₁), 128.5 (C₃₅+C₃₇), 128.4 (C₃₀+C₃₂), 128.0 (C₁₀+C₁₄), 127.7 (C₂₉+C₃₁), 127.5 (C₃₀+C₃₂), 127.4 (C₃₅+C₃₇), 127.3 (C₁₀+C₁₄), 125.9-125.8 (m, C₄₀), 115.8 (C₅), 115.7 (C₅), 84.0 (C₁₅+C₁₆), 83.9 (C₁₅+C₁₆), 63.3 (C₂₁), 62.9 (C₂₁), 51.7 (C₂₇), 51.3 (C₂₃), 49.1 (C₂₃), 47.6 (C₂₅) 47.7 (C₈), 47.4 (C₂₇), 45.7 (C₂₄), 44.9 (C₂₄), 35.6 (C₂₅+C_{25'}), 34.3 (C₄), 34.2 (C₄), 26.4 (C₂), 26.3 (C₂), 25.0 (C₃₀+C₃₂+C₃₀+C₃₂), 22.0 (C₃), 21.9 (C₃), 12.0 (C₂₆+C_{26'});

Compound is currently under analysis.

Radiochemistry

1) General Materials and Methods

All reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification (Acros and Sigma-Aldrich).

Radioisotope production. No-carrier-added fluorine-18 (half-life : 109.8 min) was produced via the [$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$] nuclear reaction by irradiation of a 1,5ml [^{18}O]water (IBA CisBio) target with an 16.5 MeV proton beam on a cyclotron General Electrics PET trace 80 cyclotron (GE Healthcare, Sweden, Uppsala). The aqueous radioactive solution was transferred to an appropriate shielded hot cell (COMECER) using Helium pressure of 2 bars. Typical irradiation times were 60 min with a beam current of 40 μA , which yielded a [^{18}F]-fluoride amount of about 70 GBq at end of bombardment.

Automated synthesis. All loading operations were conducted under an ambient atmosphere. A remote controlled GE TracerLab FX FN module was used for the automated radiolabeling experiments. Helium was used as a pressurizing gas during sample transfers. All the SEP-Paks cartridges were purchased from Waters Corporation. Prior to use, QMA-light Sep-Paks were flushed with 10 ml of ethanol, followed by 10 ml of 90 mg/ml potassium trifluoromethanesulfonate solution, and 10 ml of sterile water prior to use. Alumina N Sep-Paks were pre-conditioned with 10 ml of sterile water and C18 Sep-paks lights with ethanol (2 ml) and sterile water (10 ml). Preparative HPLC separations were all done on the GE Tracerlab FX FN module with a Gemini C18 5 μm 250X10 mm column (Phenomenex), isocratic elution: NH_4OAc 0.1M (pH 6)/MeCN; flow rate: 4.7 ml/min; room temperature; UV detection $\lambda=254$ nm. The HPLC Analysis were performed on a Thermofisher UPLC Ultimate 3000 system equipped with a UV spectrophotometer and a Berthold LB509 radioactivity detector, column: Gemini C18 250 \times 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex), isocratic elution: NH_4OAc 0.1M (pH 6)/MeCN 50/50; flow rate: 1 ml/min; room temperature, UV detection $\lambda=254$ nm.

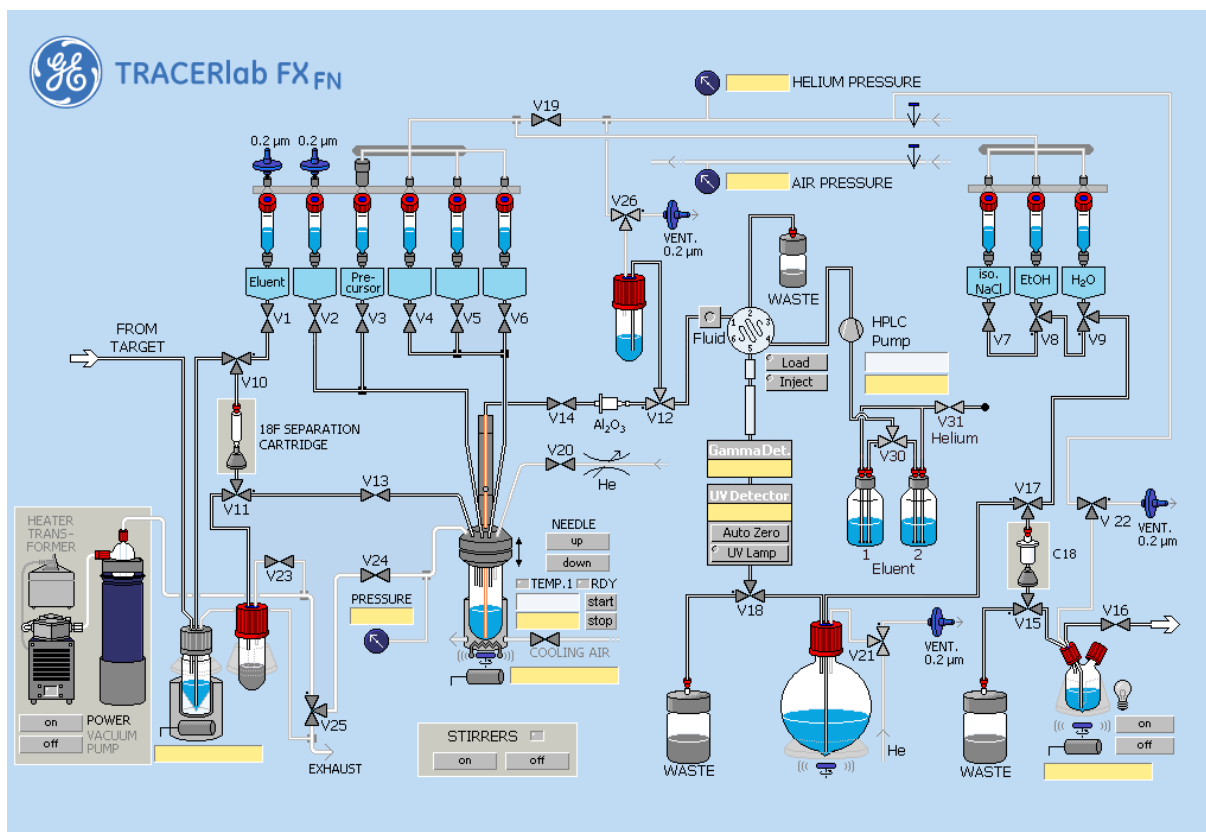


Figure 60. GE Tracerlab FX-FN module for the preparation of ^{18}F -Darapladib and analogs: V1: 5 mg KOTf + 50 μg K_2CO_3 in 550 μl water /V2: 1 ml ACN /V3: 2/4 mg precursor in 660 μL NMP + 330 μl n-BuOH + 7/9 mg $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ + 40/52 μl Pyridine /V4: 1.5 ml HPLC eluent/V5: 1.5 ml HPLC eluent /V6: empty /V7: 10 ml H_2O /V8: 0.7 ml EtOH/V9 : 9.3 ml H_2O / Dilution Flask: 60 ml H_2O .

2) Synthesis of K^{18}F

The 1.5 ml bolus of ^{18}O water containing 70 GBq of ^{18}F Fluoride was delivered to the synthesis module and trapped in a QMA-light Sep-Pak cartridge to remove the excess of ^{18}O water and others impurities. The activity was released from the cartridge into the reaction vessel by the aqueous solution of KOTf/ K_2CO_3 . The 1 ml of acetonitrile from V2 was poured into the reaction vessel and the resulting solution was dried by azeotropic distillation to provide K^{18}F . This step was achieved by heating the reaction vessel to 120°C under vacuum during 6 min. Overall, around 70% of activity remained after this first step.

3) Automated synthesis of ^{18}F -Darapladib (^{18}F -16)

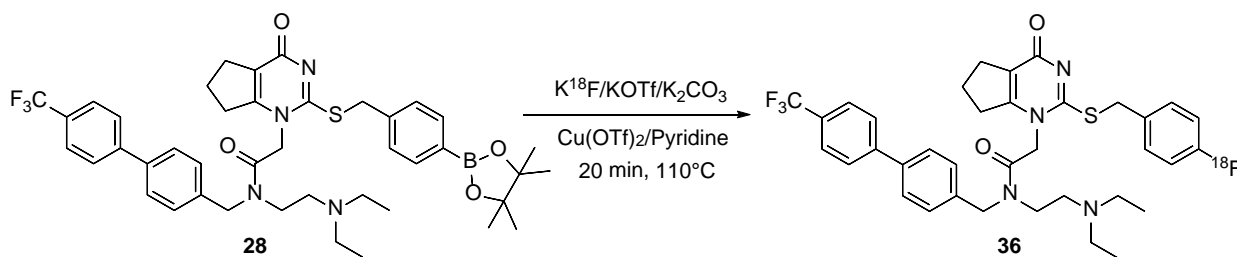


Schéma 66. Radiolabelling of ^{18}F -Darapladib via alcohol enhanced copper mediated radiofluorination.

During this step of the automated program, the reactive mixture contained in vial 3 [precursor **28** (4 mg, 5 μmol , 0.005 M), $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (9 mg, 25 μmol , 0.02 M), Pyridine (52 μl , 644 μmol , 0.62 M) in a solution of NMP and n-BuOH] was poured into the reaction vessel with the dried K^{18}F by applying helium pressure. Before starting the radiolabeling of the precursor **28**, vial 2 was opened to bring some air into the reaction vessel. After shutting the valve of vial 2, the mixture was then stirred for 20 min at 120°C . The reaction vessel was cooled to 50°C with compressed air cooling before adding 1.5 ml of HPLC eluent from V4. The solution was sucked into the HPLC vial. The reaction vessel was finally cleaned by adding another portion of 1.5 ml of HPLC eluent and immediately transferred into the HPLC vial. The whole volume contained in the HPLC vial was sent into the preparative HPLC. The ^{18}F -Darapladib was collected into the dilution flask. At the end of the collection, the formulation step was started by passing through a Sep-Pak Plus C18 cartridge (Waters). The final activities were measured into a shielded glove box with dose calibrator SCINTIDOSE (Lemer Pax, Carquefou, France).

4) Quality control of ^{18}F -Darapladib ^{18}F -16

Quality controls were carried out before administration of the tracers. The batches were expected to be clear, colourless and free of particulates. pH were measured using pH paper strips. The pH values were expected to range between 4.5 and 8.5 due to the mice injection specifications. The radiochemical purities (RCP) and the specific activities (SA) were measured with the analytical HPLC system RCP were $94.5 \pm 0.7\%$ ($n = 10$) and SA were $10.1 \pm 2.3 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$.

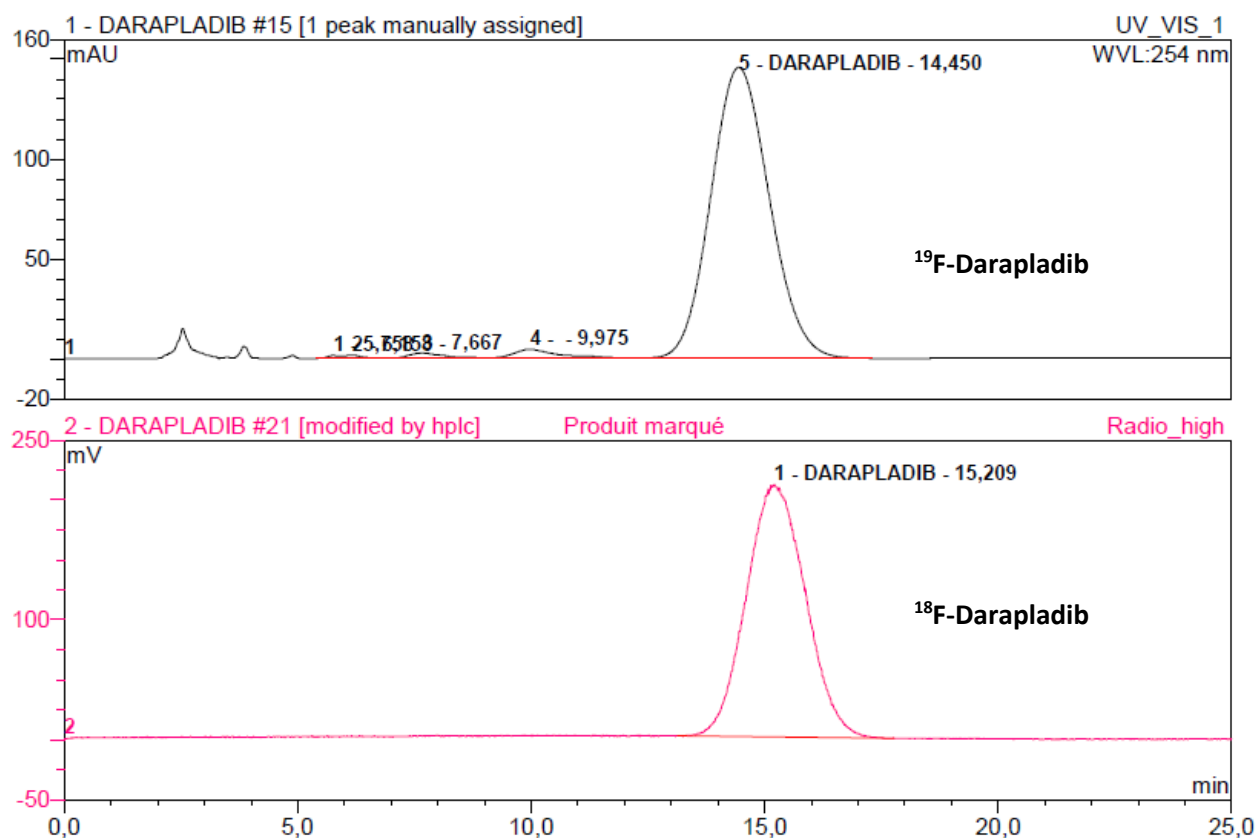


Figure 61. HPLC chromatogram of Darapladib compared with ^{18}F -Darapladib. Eluent: 50/50 NH_4OAc (pH 6) / ACN). ^{19}F -Darapladib retention time is similar to ^{18}F -Darapladib.

5) Stabilities in buffer of ^{18}F -Darapladib

***In vitro* studies.** Human plasma for research purposes were obtained from healthy volunteers. The stabilities in PBS buffer were analyzed by analytical HPLC [ThermoFisher UPLC Ultimate 3000 system equipped with a UV-Vis spectrophotometer with diode array detector; column: Gemini C18 250 \times 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex), isocratic elution: NH_4OAc 0.1M (pH 6)/MeCN 50/50; flow rate: 1 ml/min; room temperature]. The stabilities of the labeled peptides in Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X pH 7.0 were performed at different time points (0, 30 min, 1h30) post synthesis at a temperature of 37°C.

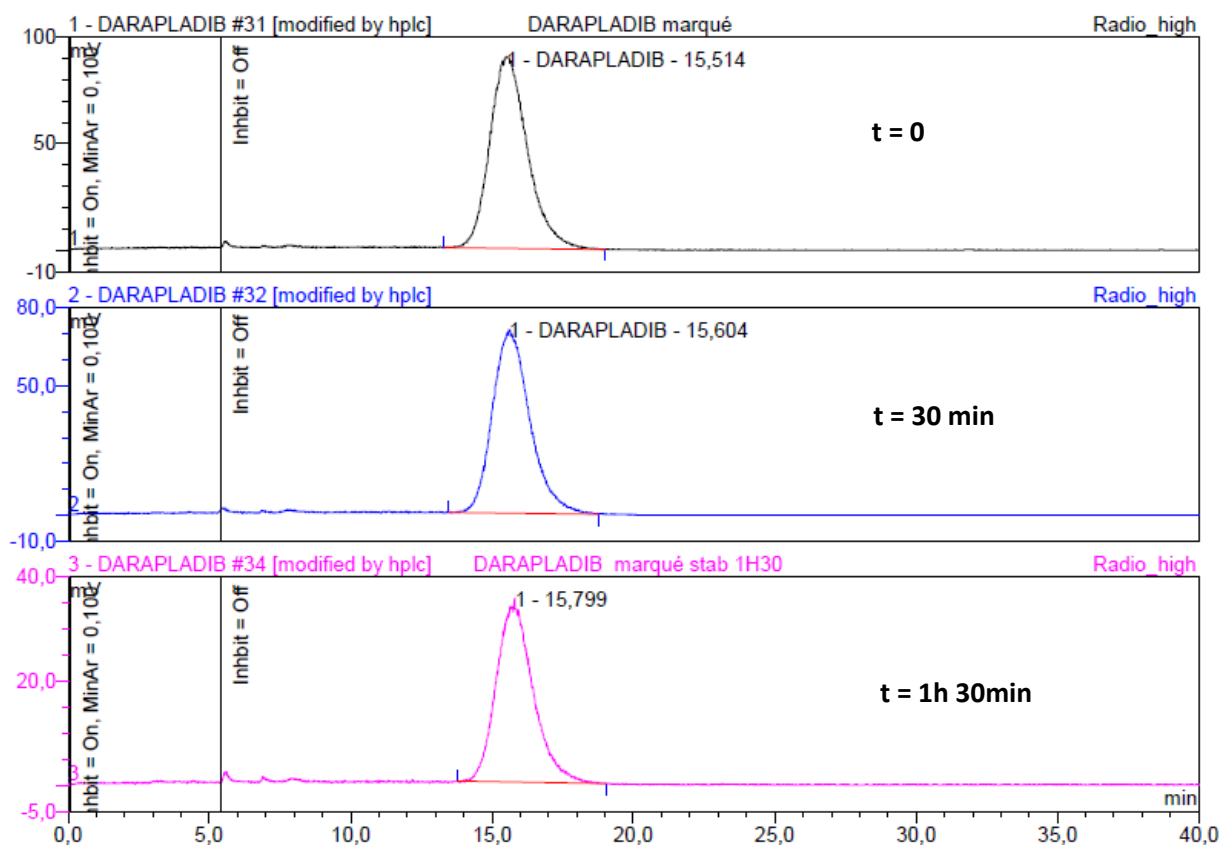


Figure 62. Phosphate buffer saline stability of ^{18}F -Darapladib at 0, 30 min and 1h 30 min. ^{18}F -16 was stable over 1h 30 min and no degradation compounds were observed.

Biology and associated imaging modalities

1) Biochemical assay for determination of Lp-PLA₂ inhibitory capacity.

Low-density lipoproteins (LDL) containing Lp-PLA₂ enzyme were isolated from a pool of human EDTA-plasma from healthy volunteers by ultracentrifugation (Optima™ L-80 XP Ultracentrifuge, Beckman Coulter) as described before (Ortiz-Muñoz et al. 2009). Briefly, plasma density was adjusted to $d=1.22$ (4 mL) with solid KBr and overlaid with 3 mL KBr saline solution ($d=1.063$) and water ($d=1$, 3 mL). Ultracentrifugation was performed at 100 000 g for 20 h at 10°C. The LDL fraction (top orange layer) was recovered as a single band, was rinsed with saline and concentrated using a centrifugal concentrating device (cutoff 10 kDa; Vivascience, Stonehouse, UK). KBr was eliminated by dialysis against saline. LDL concentration was estimated by Bradford assay for total protein quantification. Lp-PLA₂ activity was determined with a kit (PAF Acetylhydrolase activity assay Kit by CliniSciences) according the manufacturer's instruction, using 2-thio platelet-activating factor as a substrate. The free thiols released by hydrolysis were detected using 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (TMB) transformed into 5-thio-2-nitrobenzoic acid, detectable at 412 nm by spectrophotometry. Increasing concentrations of (14) or analogs (0.1, 1, 10, 100, 500 and 1000 nM) were incubated with a 2 g/L LDL solution for 30 min before adding the substrate for 60 minutes and eventually the TMB. Optical density was followed at 412 nm and the inhibition capacity of the molecules tested was expressed as % of control containing LDL without inhibitors. Data are expressed as means \pm SEM of three independent experiments performed at least in triplicate.

2) Tumor model

Cell culture. The tumor cell line B16 was purchased from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). This cell line was cultivated in RPMI1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 units/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin and 1.25 μ g/ml fungizone. Cells were maintained in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. Cell viability was over 90%, as determined by trypan-blue staining. Immediately before implantation in mice, cells were centrifuged and adjusted to a concentration of 25×10^6 cells per ml in PBS 1X for subcutaneous injection.

Tumor Models. Six to eight weeks old C57Bl6 mice were used for implantation of B16 cells. A B16 tumor cell suspension containing 1×10^6 cells in a volume of 0.2 ml of a medium without serum solution was injected subcutaneously into right flank using a 27-gauge needle. The experiments were performed when tumors were 500 mm³ (tumor volume measurement was performed by digital caliper).

PET Imaging. Injected doses of radiotracers ¹⁸F-FDG or ¹⁸F-Darapladib were 15 ± 5 MBq. The PET imaging distributions of mice were assessed at time intervals from 0 to 1h post-injection with four images of 15 minutes each.

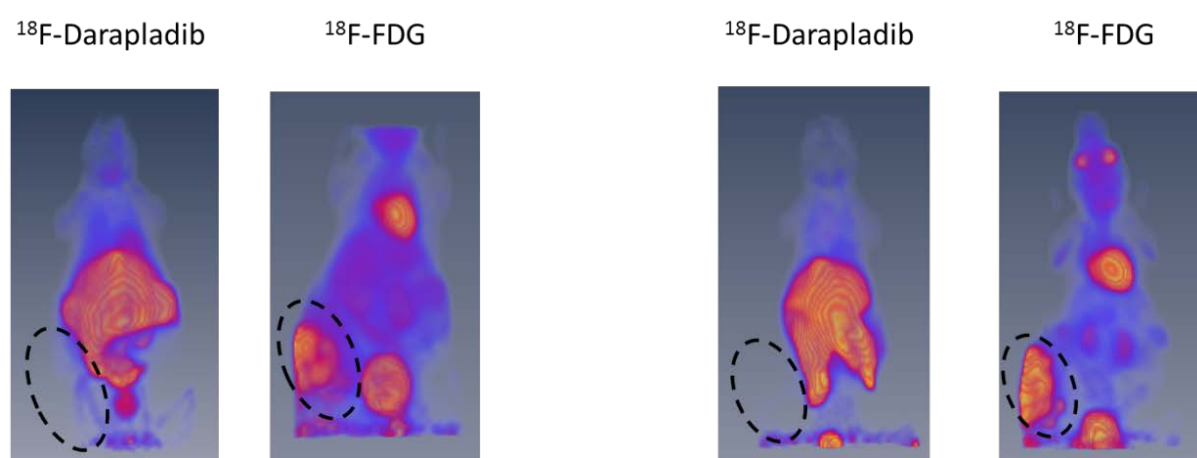


Figure 63. ¹⁸F-Darapladib and ¹⁸F-FDG injection in tumor induced mouse model (mouse B16 melanoma). Tumor location is represented by dashed lines. No accumulation of ¹⁸F-Darapladib compared to ¹⁸F-FDG that shows a strong accumulation within tumors.

3) Atherosclerosis model

ApoE KO model. Apolipoprotein E-deficient mice (ApoE (-/-) or ApoE KO) were chosen as models for atherosclerosis studies. Mice were bred in the animal facility until the age of 18-20 months for the study. 5 ApoE KO mice were used for each radiotracer. To compare with normal mice, 5 C57Bl6 mice were used for each radiotracer.

PET Imaging. Injected doses of radiotracers ¹⁸F-FDG or ¹⁸F-Darapladib were 15 ± 5 MBq. The PET imaging distributions of mice were assessed at time intervals from 0 to 1h post-injection with four images of 15 minutes each.

Biodistributions. At the end of the PET imaging acquisitions, the animals were sacrificed by cardiac puncture under anesthesia (isoflurane, 3% induction and 1.5% maintenance in air). The heart and aorta were removed and isolated, blood-flushed and placed under the multimodal imager. A PET *ex vivo* acquisition of 15 minutes was performed specifically on these tissues to measure the activity associated to the atherosclerosis plaques. At the end of this acquisition, all the organs were collected and placed into glass tubes for the γ -counter measurements.

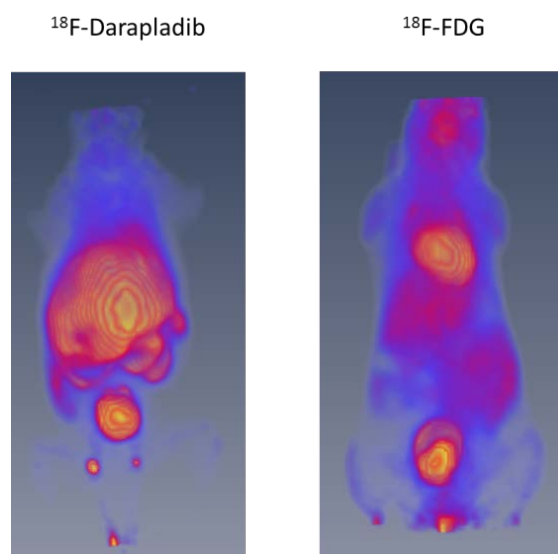


Figure 64. ^{18}F -Darapladib and ^{18}F -FDG injection in C57BL/6 mice. Accumulation in heart, liver, intestines and bladder for ^{18}F -Darapladib. Accumulation in heart, brain, kidneys and bladder for ^{18}F -FDG.

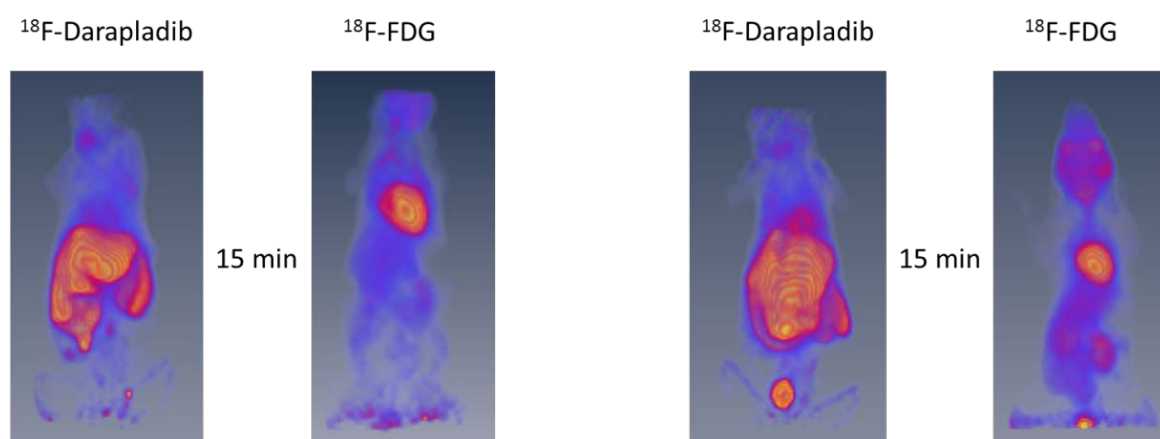


Figure 65. ^{18}F -Darapladib and ^{18}F -FDG injection in KO ApoE mice. Images at 15 min are representative of 30, 45 and 60 min acquisitions images. Accumulation is similar to C57BL/6 mice (see **Figure 59**).

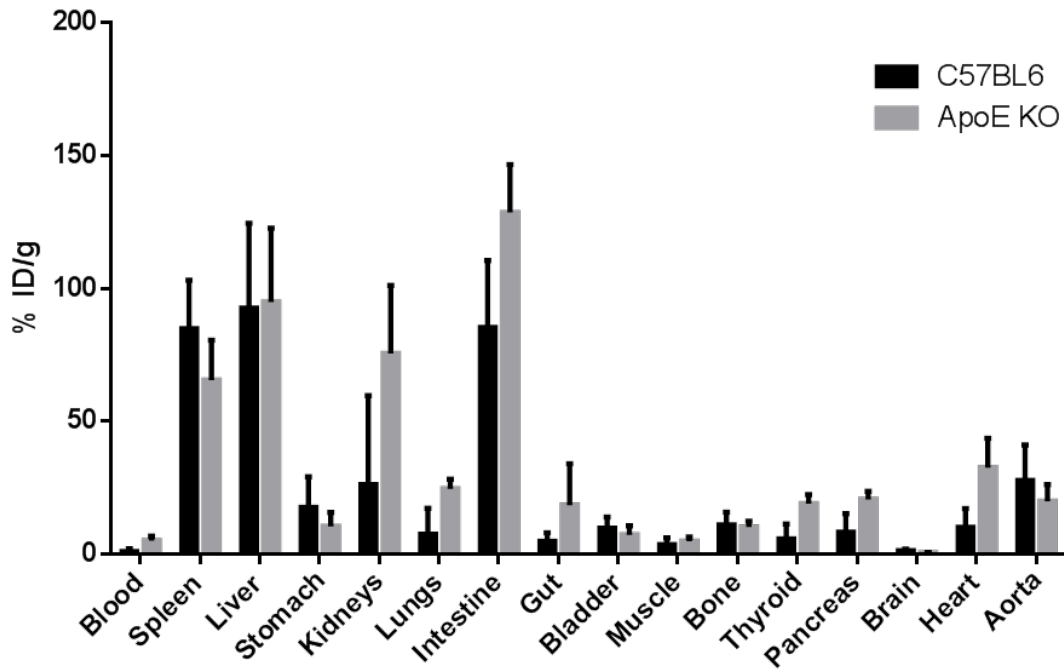


Figure 66. ¹⁸F-Darapladib biodistribution in KO ApoE and C57BL/6 mice. Data are expressed as means ± SEM of three independent experiments. Statistical evaluation was performed by using one-way ANOVA and Tukey test (PRISM software). No significant differences were observed.

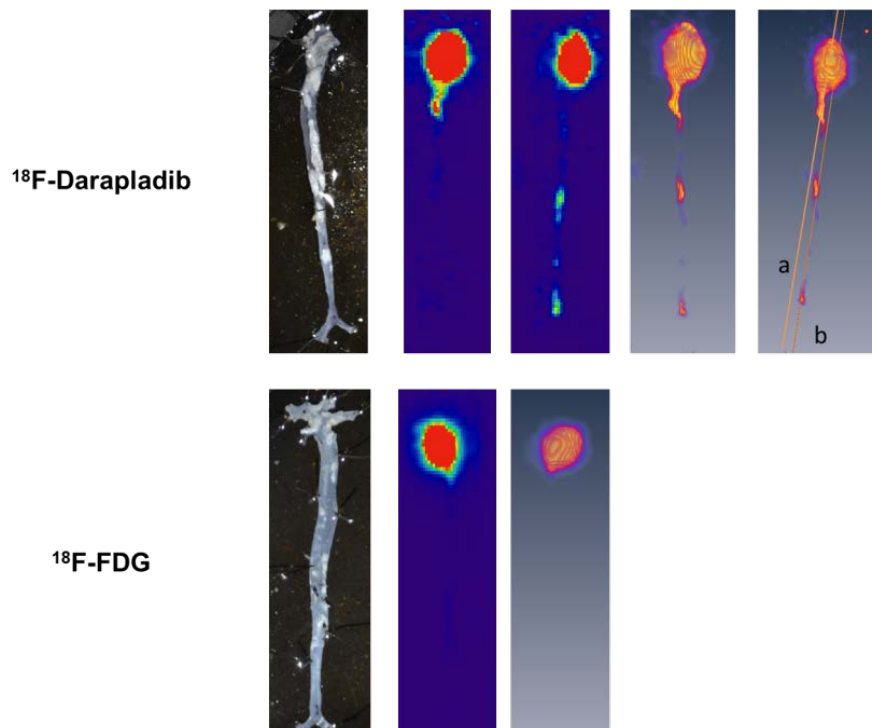


Figure 67. ¹⁸F-Darapladib and ¹⁸F-FDG in KO ApoE mice aortas and heart. Results are representative of experiments performed at least in triplicate.

4) Human endarterectomy pieces studies

Endarterectomy samples. Freshly obtained carotid samples were incubated with 30 ± 5 MBq of ^{18}F -Darapladib or ^{18}F -FDG for 1h at 37°C . Samples were washed consecutively with saline 3 times then were dried before performing imaging studies.

PET Imaging. Incubated doses of radiotracers ^{18}F -FDG or ^{18}F -Darapladib were 30 ± 5 MBq. The PET imaging acquisitions carotids were assessed at 1h post-incubation with a 15 minutes acquisition.

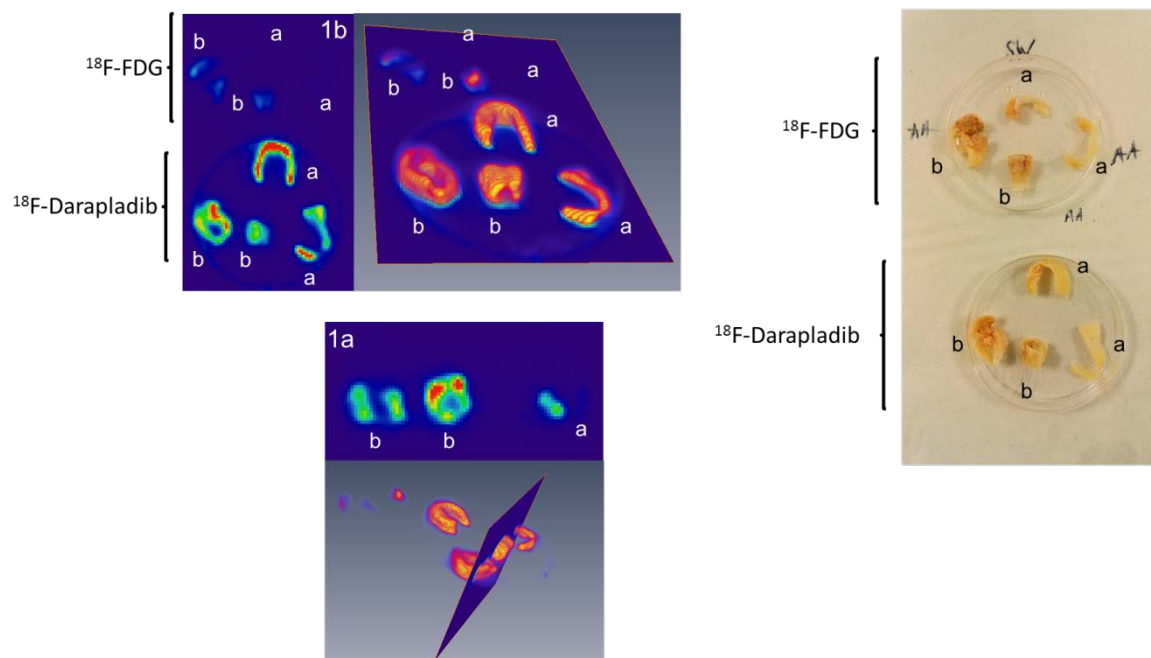


Figure 68. *Ex vivo* accumulation of ^{18}F -Darapladib compared to ^{18}F -FDG in human carotid endarterectomy samples. a) Non-complicated; b) Complicated. (left) Orthoslice associated with 3D view of the slice; (right) macroscopic view.

Références bibliographiques

Achenbach, S., F. Moselewski, D. Ropers, M. Ferencik, U. Hoffmann, B. MacNeill, K. Pohle, U. Baum, K. Anders, I. K. Jang, W. G. Daniel and T. J. Brady (2004). "Detection of calcified and noncalcified coronary atherosclerotic plaque by contrast-enhanced, submillimeter multidetector spiral computed tomography: a segment-based comparison with intravascular ultrasound." Circulation **109**(1): 14-17.

Adam, M. J., J. R. Grierson, T. J. Ruth and S. Jivan (1986). "Reaction of [18F]acetyl hypofluorite with derivatives of dihydroxyphenylalanine: Synthesis of 1-[18F]6-fluorodopa." International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes **37**(8): 877-882.

Agius, L. M. (2007). "Complicated atheromatous plaque as integral atherogenesis." J Clin Pathol **60**(6): 589-592.

Aikawa, H. I. M. (2015). Dynamic Interplay Between Smooth Muscle Cells and Macrophages in Vascular Disease. Medicine » Tissue Engineering and Regenerative Medicine » "Muscle Cell and Tissue". K. Sakuma, CC BY 3.0 license.

Akins, P. T., T. K. Pilgram, D. T. Cross, 3rd and C. J. Moran (1998). "Natural history of stenosis from intracranial atherosclerosis by serial angiography." Stroke **29**(2): 433-438.

Albericio, F., J. M. Bofill, A. El-Faham and S. A. Kates (1998). "Use of Onium Salt-Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis1." The Journal of Organic Chemistry **63**(26): 9678-9683.

Ali, A. and A. Tawakol (2016). "FDG PET/CT Imaging of Carotid Atherosclerosis." Neuroimaging Clinics of North America **26**(1): 45-54.

Allahverdian, S., A. C. Chehroudi, B. M. McManus, T. Abraham and G. A. Francis (2014). "Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis." Circulation **129**(15): 1551-1559.

Almuhaideb, A., N. Papathanasiou and J. Bomanji (2011). "(18)F-FDG PET/CT Imaging In Oncology." Ann Saudi Med **31**(1): 3-13.

Amann, K. (2008). "Media Calcification and Intima Calcification Are Distinct Entities in Chronic Kidney Disease." Clinical Journal of the American Society of Nephrology **3**(6): 1599-1605.

Annema, W., A. von Eckardstein and P. T. Kovanen (2015). "HDL and atherothrombotic vascular disease." Handb Exp Pharmacol **224**: 369-403.

Azad, M. A. K., A. K. Jain, G. Pandey, K. Singh and M. Prasad (2015). Processes for the preparation of darapladib and its intermediates, Google Patents.

Banciu, M., J. M. Metselaar, R. M. Schiffelers and G. Storm (2008). "Antitumor Activity of Liposomal Prednisolone Phosphate Depends on the Presence of Functional Tumor-Associated Macrophages in Tumor Tissue." Neoplasia **10**(2): 108-117.

Banks, R. E., S. N. Mohialdin-Khaffaf, G. S. Lal, I. Sharif and R. G. Syvret (1992). "1-Alkyl-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane salts: a novel family of electrophilic fluorinating agents." Journal of the Chemical Society, Chemical Communications(8): 595-596.

Barcat, D., A. Amadio, A. Palos-Pinto, D. Daret, P. Benlian, M. Darmon and A. M. Berard (2006). "Combined hyperlipidemia/hyperalphalipoproteinemia associated with premature spontaneous atherosclerosis in mice lacking hepatic lipase and low density lipoprotein receptor." Atherosclerosis **188**(2): 347-355.

Bartel, S., M. Hahn, W. A. Moradi, K. Münter, T. Rölle, J. P. Stasch, K. H. Schlemmer and F. Wunder (2009). Heterocyclic compounds with carboxyl isostere groups and their use for the treatment of cardiovascular diseases, Google Patents.

Bauriedel, G., R. Hutter, U. Welsch, R. Bach, H. Sievert and B. Luderitz (1999). "Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability." Cardiovasc Res **41**(2): 480-488.

- Benn, M., M. C. Stene, B. G. Nordestgaard, G. B. Jensen, R. Steffensen and A. Tybjaerg-Hansen (2008). "Common and rare alleles in apolipoprotein B contribute to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol in the general population." J Clin Endocrinol Metab **93**(3): 1038-1045.
- Blackie, J. A., J. C. Bloomer, M. J. B. Brown, H.-Y. Cheng, B. Hammond, D. M. B. Hickey, R. J. Iffe, C. A. Leach, V. A. Lewis, C. H. Macphee, K. J. Milliner, K. E. Moores, I. L. Pinto, S. A. Smith, I. G. Stansfield, S. J. Stanway, M. A. Taylor and C. J. Theobald (2003). "The identification of clinical candidate SB-480848: a potent inhibitor of lipoprotein-associated phospholipase A2." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **13**(6): 1067-1070.
- Boren, J., M. Gustafsson, K. Skalen, C. Flood and T. L. Innerarity (2000). "Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **11**(5): 451-456.
- Boyd, H. F., S. T. Flynn, D. M. B. Hickey, R. J. Iffe, M. Jones, C. A. Leach, C. H. Macphee, K. J. Milliner, D. A. Rawlings, B. P. Slingsby, S. A. Smith, I. G. Stansfield, D. G. Tew and C. J. Theobald (2000). "2-(Alkylthio)pyrimidin-4-ones as novel, reversible inhibitors of lipoprotein-associated phospholipase A2." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **10**(4): 395-398.
- Brandt, J. R., E. Lee, G. B. Boursalian and T. Ritter (2014). "Mechanism of Electrophilic Fluorination with Pd(IV): Fluoride Capture and Subsequent Oxidative Fluoride Transfer." Chem Sci **5**(1).
- Braunersreuther, V. and F. Mach (2006). "Leukocyte recruitment in atherosclerosis: potential targets for therapeutic approaches?" Cell Mol Life Sci **63**(18): 2079-2088.
- Cacace, F., P. Giacomello and A. P. Wolf (1980). "Substrate selectivity and orientation in aromatic Substitution by molecular fluorine." Journal of the American Chemical Society **102**(10): 3511-3515.
- Cahill, P. A. and E. M. Redmond (2016). "Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health." Atherosclerosis **248**: 97-109.
- Campbell P, B. G. (2006). C-reactive protein and hypertension.
- In C-Reactive Protein and Cardiovascular Disease. R. N. Ridker PM. St-Laurent, Quebec, MediEdition: 141–152.
- Cannon, J. G. (2000). "Inflammatory Cytokines in Nonpathological States." News Physiol Sci **15**: 298-303.
- Cardinale, J. and J. Ermert (2013). "Simplified synthesis of arylodonium ylides by a one-pot procedure." Tetrahedron Letters **54**(16): 2067-2069.
- Cardwell, K. S., C. F. Crawford, S. H. Davies and C. E. Wade (2011). Novel processes, Google Patents.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." Nat Med **9**(6): 653-660.
- Carneiro, V. M. T., D. B. B. Trivella, V. Scorsato, V. L. Beraldo, M. P. Dias, T. J. P. Sobreira, R. Aparicio and R. A. Pilli (2015). "Is RK-682 a promiscuous enzyme inhibitor? Synthesis and in vitro evaluation of protein tyrosine phosphatase inhibition of racemic RK-682 and analogues." European Journal of Medicinal Chemistry **97**: 42-54.
- Carroll, L., H. L. Evans, A. C. Spivey and E. O. Aboagye (2015). "Mn-salen catalysed benzylic C-H activation for the synthesis of aryl [¹⁸F]CF₃-containing PET probes." Chemical Communications **51**(40): 8439-8441.
- Celeng, C., R. A. Takx, M. Ferencik and P. Maurovich-Horvat (2016). "Non-invasive and invasive imaging of vulnerable coronary plaque." Trends Cardiovasc Med **26**(6): 538-547.
- Chandra, K., T. K. Roy, J. N. Naoum, C. Gilon, R. B. Gerber and A. Friedler (2014). "A highly efficient in situ N-acetylation approach for solid phase synthesis." Organic & Biomolecular Chemistry **12**(12): 1879-1884.

- Chen, B., L. Wang and S. Gao (2015). "Recent Advances in Aerobic Oxidation of Alcohols and Amines to Imines." ACS Catalysis **5**(10): 5851-5876.
- Chinetti-Gbaguidi, G., S. Colin and B. Staels (2015). "Macrophage subsets in atherosclerosis." Nat Rev Cardiol **12**(1): 10-17.
- Choi, H., J. Lee, C. G. Lee, N. Ha, S. K. Seo, S. LEE and S. M. Lee (2016). N-acylhydrazone derivatives for selective T cell inhibitor and anti-lymphoid malignancy drug, Google Patents.
- Chun, J. H. and V. W. Pike (2012). "Regiospecific syntheses of functionalized diaryliodonium tosylates via [hydroxy(tosyloxy)iodo]arenes generated in situ from (diacetoxyiodo)arenes." J Org Chem **77**(4): 1931-1938.
- Coenen, H. H. (2007). "Fluorine-18 labeling methods: Features and possibilities of basic reactions." Ernst Schering Res Found Workshop(62): 15-50.
- Coenen, H. H. and S. M. Moerlein (1987). "Regiospecific aromatic fluorodemetalation of group IVb metalloarenes using elemental fluorine or acetyl hypofluorite." Journal of Fluorine Chemistry **36**(1): 63-75.
- Cole, E. L., M. N. Stewart, R. Littich, R. Hoareau and P. J. Scott (2014). "Radiosyntheses using fluorine-18: the art and science of late stage fluorination." Curr Top Med Chem **14**(7): 875-900.
- Cookson, F. B. (1971). "The origin of foam cells in atherosclerosis." Br J Exp Pathol **52**(1): 62-69.
- Corporation, L. (2016). "Positron Emissions Tomography (PET SCAN)." Retrieved 16/05, 2017, from <https://www.slideshare.net/mustafaalbayati923/positron-emissions-tomography-pet-scan>.
- Corti, R. and V. Fuster (2011). "Imaging of atherosclerosis: magnetic resonance imaging." Eur Heart J **32**(14): 1709-1719b.
- Corti, R., V. Fuster, J. J. Badimon, R. Hutter and Z. A. Fayad (2001). "New understanding of atherosclerosis (clinically and experimentally) with evolving MRI technology in vivo." Ann N Y Acad Sci **947**: 181-195; discussion 195-188.
- Dallmeier, D. and W. Koenig (2014). "Strategies for vascular disease prevention: the role of lipids and related markers including apolipoproteins, low-density lipoproteins (LDL)-particle size, high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA(2)) and lipoprotein(a) (Lp(a))." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **28**(3): 281-294.
- Danesh, J., J. G. Wheeler, G. M. Hirschfield, S. Eda, G. Eiriksdottir, A. Rumley, G. D. Lowe, M. B. Pepys and V. Gudnason (2004). "C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease." N Engl J Med **350**(14): 1387-1397.
- Dave, M., M. Nash, G. C. Young, H. Ellens, M. H. Magee, A. D. Roberts, M. A. Taylor, R. W. Greenhill and G. W. Boyle (2014). "Disposition and metabolism of darapladib, a lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor, in humans." Drug Metab Dispos **42**(3): 415-430.
- Davies, J. R., J. H. Rudd and P. L. Weissberg (2004). "Molecular and metabolic imaging of atherosclerosis." J Nucl Med **45**(11): 1898-1907.
- Davignon, J. and P. Ganz (2004). "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." Circulation **109**(23 Suppl 1): III27-32.
- De Backer, G., E. Ambrosioni, K. Borch-Johnsen, C. Brotons, R. Cifkova, J. Dallongeville, S. Ebrahim, O. Faergeman, I. Graham, G. Mancina, V. M. Cats, K. Orth-Gomer, J. Perk, K. Pyorala, J. L. Rodicio, S. Sans, V. Sansoy, U. Sechtem, S. Silber, T. Thomsen, D. Wood and G. European Society of Cardiology Committee for Practice (2003). "European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts)." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **10**(4): S1-S10.

- De Franco, A. C. and S. E. Nissen (2001). "Coronary intravascular ultrasound: implications for understanding the development and potential regression of atherosclerosis." Am J Cardiol **88**(10A): 7M-20M.
- De Keyzer, D., S. A. Karabina, W. Wei, B. Geeraert, D. Stengel, J. Marsillach, J. Camps, P. Holvoet and E. Ninio (2009). "Increased PAFAH and oxidized lipids are associated with inflammation and atherosclerosis in hypercholesterolemic pigs." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(12): 2041-2046.
- De Korte, C. L., S. G. Carlier, F. Mastik, M. M. Doyley, A. F. van der Steen, P. W. Serruys and N. Bom (2002). "Morphological and mechanical information of coronary arteries obtained with intravascular elastography; feasibility study in vivo." Eur Heart J **23**(5): 405-413.
- De Korte, C. L. and A. F. van der Steen (2002). "Intravascular ultrasound elastography: an overview." Ultrasonics **40**(1-8): 859-865.
- Dennis, E. A. (1994). "Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2." J Biol Chem **269**(18): 13057-13060.
- Dennis, E. A., J. Cao, Y. H. Hsu, V. Magrioti and G. Kokotos (2011). "Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention." Chem Rev **111**(10): 6130-6185.
- Dimastromatteo, J. (2010). Evaluation de radiotraceurs spécifiques de la plaque d'athérome vulnérable et de l'angiogenèse myocardique. Thèse, Faculté de médecine de Grenoble – Université Grenoble I.
- Dobrucki, L. W. and A. J. Sinusas (2010). "PET and SPECT in cardiovascular molecular imaging." Nat Rev Cardiol **7**(1): 38-47.
- Doherty, T. M., K. Asotra, L. A. Fitzpatrick, J. H. Qiao, D. J. Wilkin, R. C. Detrano, C. R. Dunstan, P. K. Shah and T. B. Rajavashisth (2003). "Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11201-11206.
- Drexler, H. (1998). "Factors involved in the maintenance of endothelial function." Am J Cardiol **82**(10A): 3S-4S.
- Dweck, M. R., M. W. Chow, N. V. Joshi, M. C. Williams, C. Jones, A. M. Fletcher, H. Richardson, A. White, G. McKillop, E. J. van Beek, N. A. Boon, J. H. Rudd and D. E. Newby (2012). "Coronary arterial 18F-sodium fluoride uptake: a novel marker of plaque biology." J Am Coll Cardiol **59**(17): 1539-1548.
- Dweck, M. R., C. Jones, N. V. Joshi, A. M. Fletcher, H. Richardson, A. White, M. Marsden, R. Pessotto, J. C. Clark, W. A. Wallace, D. M. Salter, G. McKillop, E. J. van Beek, N. A. Boon, J. H. Rudd and D. E. Newby (2012). "Assessment of valvular calcification and inflammation by positron emission tomography in patients with aortic stenosis." Circulation **125**(1): 76-86.
- Eckardstein, A. v. (2014). High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation Springer; 2015 edition.
- Eckert, J., M. Schmidt, A. Magedanz, T. Voigtlander and A. Schmermund (2015). "Coronary CT angiography in managing atherosclerosis." Int J Mol Sci **16**(2): 3740-3756.
- Edwards, L. J. and C. S. Constantinescu (2009). "Platelet activating factor/platelet activating factor receptor pathway as a potential therapeutic target in autoimmune diseases." Inflamm Allergy Drug Targets **8**(3): 182-190.
- Eisen, A., C. P. Cannon, E. Braunwald, D. L. Steen, J. Zhou, E. L. Goodrich, K. Im, A. J. Dalby, J. Spinar, S. Daga, M. A. Lukas and M. L. O'Donoghue (2017). "Predictors of Nonuse of a High-Potency Statin After an Acute Coronary Syndrome: Insights From the Stabilization of Plaques Using Darapladib-Thrombolysis in Myocardial Infarction 52 (SOLID-TIMI 52) Trial." J Am Heart Assoc **6**(1).

- El-Faham, A. and F. Albericio (2008). "Morpholine-Based Immonium and Halogenoamidinium Salts as Coupling Reagents in Peptide Synthesis I." The Journal of Organic Chemistry **73**(7): 2731-2737.
- El-Faham, A., R. S. Funosas, R. Prohens and F. Albericio (2009). "COMU: A Safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents." Chemistry – A European Journal **15**(37): 9404-9416.
- Elgort, D. R. and J. L. Duerk (2005). "A review of technical advances in interventional magnetic resonance imaging." Acad Radiol **12**(9): 1089-1099.
- Emini Veseli, B., P. Perrotta, G. R. A. De Meyer, L. Roth, C. Van der Donckt, W. Martinet and G. R. Y. De Meyer (2017). "Animal models of atherosclerosis." European Journal of Pharmacology.
- Ermert, J. (2014). "18F-Labelled Intermediates for Radiosynthesis by Modular Build-Up Reactions: Newer Developments." BioMed Research International **2014**: 15.
- Farzaneh-Far, A., D. Proudfoot, C. Shanahan and P. L. Weissberg (2001). "Vascular and valvar calcification: recent advances." Heart **85**(1): 13-17.
- Fernandez, M. L. and J. S. Volek (2006). "Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation." Nutr Metab (Lond) **3**: 17.
- Fier, P. S., J. Luo and J. F. Hartwig (2013). "Copper-Mediated Fluorination of Arylboronate Esters. Identification of a Copper(III) Fluoride Complex." Journal of the American Chemical Society **135**(7): 2552-2559.
- Firna, G., R. Chirakal and E. S. Garnett (1984). "Aromatic radiofluorination with [18F]fluorine gas: 6-[18F]fluoro-L-dopa." J Nucl Med **25**(11): 1228-1233.
- Fiz, F., S. Morbelli, A. Piccardo, M. Bauckneht, G. Ferrarazzo, E. Pestarino, M. Cabria, A. Democrito, M. Riondato, G. Villavecchia, C. Marini and G. Sambucetti (2015). "(1)(8)F-NaF Uptake by Atherosclerotic Plaque on PET/CT Imaging: Inverse Correlation Between Calcification Density and Mineral Metabolic Activity." J Nucl Med **56**(7): 1019-1023.
- Folco, E. J., Y. Sheikine, V. Z. Rocha, T. Christen, E. Shvartz, G. K. Sukhova, M. F. Di Carli and P. Libby (2011). "Hypoxia but not inflammation augments glucose uptake in human macrophages: Implications for imaging atherosclerosis with 18fluorine-labeled 2-deoxy-D-glucose positron emission tomography." J Am Coll Cardiol **58**(6): 603-614.
- Franceschi, C. (1979). L'Investigation vasculaire par ultrasonographie Doppler.
- Friedman, P., S. Horkko, D. Steinberg, J. L. Witztum and E. A. Dennis (2002). "Correlation of antiphospholipid antibody recognition with the structure of synthetic oxidized phospholipids. Importance of Schiff base formation and aldol condensation." J Biol Chem **277**(9): 7010-7020.
- Friedrichs, K., S. Baldus and A. Klinke (2012). "Fibrosis in Atrial Fibrillation - Role of Reactive Species and MPO." Front Physiol **3**: 214.
- Fruhirth, G. O., A. Loidl and A. Hermetter (2007). "Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1772**(7): 718-736.
- Fujimoto, J. G., S. A. Boppart, G. J. Tearney, B. E. Bouma, C. Pitris and M. E. Brezinski (1999). "High resolution in vivo intra-arterial imaging with optical coherence tomography." Heart **82**(2): 128-133.
- Furuya, T., A. E. Strom and T. Ritter (2009). "Silver-Mediated Fluorination of Functionalized Aryl Stannanes." Journal of the American Chemical Society **131**(5): 1662-1663.

- Gaemperli, O., J. Shalhoub, D. R. Owen, F. Lamare, S. Johansson, N. Fouladi, A. H. Davies, O. E. Rimoldi and P. G. Camici (2012). "Imaging intraplaque inflammation in carotid atherosclerosis with 11C-PK11195 positron emission tomography/computed tomography." Eur Heart J **33**(15): 1902-1910.
- Gaeta, C., Y. Fernandez, J. Pavia, A. Flotats, C. Artigas, J. Deportos, L. Geraldo and I. Carrio (2011). "Reduced myocardial 18F-FDG uptake after calcium channel blocker administration. Initial observation for a potential new method to improve plaque detection." Eur J Nucl Med Mol Imaging **38**(11): 2018-2024.
- Galkina, E. and K. Ley (2009). "Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*)." Annu Rev Immunol **27**: 165-197.
- Gardner, A. A., E. C. Reichert, M. K. Topham and D. M. Stafforini (2008). "Identification of a domain that mediates association of platelet-activating factor acetylhydrolase with high density lipoprotein." J Biol Chem **283**(25): 17099-17106.
- Gaubatz, J. W., B. K. Gillard, J. B. Massey, R. C. Hoogeveen, M. Huang, E. E. Lloyd, J. L. Raya, C. Y. Yang and H. J. Pownall (2007). "Dynamics of dense electronegative low density lipoproteins and their preferential association with lipoprotein phospholipase A(2)." J Lipid Res **48**(2): 348-357.
- Getz, G. S. and C. A. Reardon (2009). "Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall." J Lipid Res **50 Suppl**: S156-161.
- GK, O. (1996). : Role of alterations in the differentiated state of smooth muscle cell in atherogenesis. Atherosclerosis and coronary artery disease. R. R. Fuster V, Topol EJ Philadelphia - New York, Lippincott-Raven. **1**: 401-420.
- Glass, C. K. and J. L. Witztum (2001). "Atherosclerosis. the road ahead." Cell **104**(4): 503-516.
- Glaudemans, A. W., R. H. Slart, A. Bozzao, E. Bonanno, M. Arca, R. A. Dierckx and A. Signore (2010). "Molecular imaging in atherosclerosis." Eur J Nucl Med Mol Imaging **37**(12): 2381-2397.
- Gogas, B. D., V. Farooq, P. W. Serruys and H. M. Garcia-Garcia (2011). "Assessment of coronary atherosclerosis by IVUS and IVUS-based imaging modalities: progression and regression studies, tissue composition and beyond." Int J Cardiovasc Imaging **27**(2): 225-237.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (2001). "Molecular medicine. The cholesterol quartet." Science **292**(5520): 1310-1312.
- Golestani, R., J. J. Jung and M. M. Sadeghi (2016). "Molecular Imaging of Angiogenesis and Vascular Remodeling in Cardiovascular Pathology." J Clin Med **5**(6).
- Grammaticos, P. C. (2014). "Diagnosing atherosclerosis makes Nuclear Medicine a tissue imaging modality." Hell J Nucl Med **17**(1): 12.
- Hadvary, P., H. Lengsfeld and H. Wolfer (1988). "Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin." Biochem J **256**(2): 357-361.
- Hatsukami, T. S., R. Ross, N. L. Polissar and C. Yuan (2000). "Visualization of fibrous cap thickness and rupture in human atherosclerotic carotid plaque in vivo with high-resolution magnetic resonance imaging." Circulation **102**(9): 959-964.
- Hawkins, R. A., Y. Choi, S. C. Huang, C. K. Hoh, M. Dahlbom, C. Schiepers, N. Satyamurthy, J. R. Barrio and M. E. Phelps (1992). "Evaluation of the skeletal kinetics of fluorine-18-fluoride ion with PET." J Nucl Med **33**(5): 633-642.
- He Magee, M., B. Shaddinger, D. Collins, S. Siddiqi and J. Soffer (2015). "The pharmacokinetics and safety of darapladib in subjects with severe renal impairment." Br J Clin Pharmacol **80**(4): 654-661.

Heller, R. F., R. M. Hartley and B. Lewis (1983). "The effect on blood lipids of eating charcoal-grilled meat." Atherosclerosis **48**(2): 185-192.

Hellings, W. E., W. Peeters, F. L. Moll and G. Pasterkamp (2007). "From vulnerable plaque to vulnerable patient: the search for biomarkers of plaque destabilization." Trends Cardiovasc Med **17**(5): 162-171.

Hickey, D. M. B., R. J. Ife, C. A. Leach, I. L. Pinto, S. A. Smith and S. J. Stanway (2016). Compounds, Google Patents.

Ido T, I. T., Kasida Y. (1979). " Isotope exchange with ¹⁸F on superconjugate system." Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals **16**(1): 153-154.

Ido, T., C. N. Wan, V. Casella, J. S. Fowler, A. P. Wolf, M. Reivich and D. E. Kuhl (1978). "Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs. ¹⁸F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and ¹⁴C-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose." Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals **14**(2): 175-183.

International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association, S., G. B. Ehret, P. B. Munroe, K. M. Rice, M. Bochud, A. D. Johnson, D. I. Chasman, A. V. Smith, M. D. Tobin, G. C. Verwoert, S. J. Hwang, V. Pihur, P. Vollenweider, P. F. O'Reilly, N. Amin, J. L. Bragg-Gresham, A. Teumer, N. L. Glazer, L. Launer, J. H. Zhao, Y. Aulchenko, S. Heath, S. Sober, A. Parsa, J. Luan, P. Arora, A. Dehghan, F. Zhang, G. Lucas, A. A. Hicks, A. U. Jackson, J. F. Peden, T. Tanaka, S. H. Wild, I. Rudan, W. Igl, Y. Milanecchi, A. N. Parker, C. Fava, J. C. Chambers, E. R. Fox, M. Kumari, M. J. Go, P. van der Harst, W. H. Kao, M. Sjogren, D. G. Vinay, M. Alexander, Y. Tabara, S. Shaw-Hawkins, P. H. Whincup, Y. Liu, G. Shi, J. Kuusisto, B. Tayo, M. Seielstad, X. Sim, K. D. Nguyen, T. Lehtimaki, G. Matullo, Y. Wu, T. R. Gaunt, N. C. Onland-Moret, M. N. Cooper, C. G. Platou, E. Org, R. Hardy, S. Dahgam, J. Palmen, V. Vitart, P. S. Braund, T. Kuznetsova, C. S. Uiterwaal, A. Adeyemo, W. Palmas, H. Campbell, B. Ludwig, M. Tomaszewski, I. Tzoulaki, N. D. Palmer, C. A. consortium, C. K. Consortium, C. KidneyGen, c. EchoGen, C.-H. consortium, T. Aspelund, M. Garcia, Y. P. Chang, J. R. O'Connell, N. I. Steinle, D. E. Grobbee, D. E. Arking, S. L. Kardia, A. C. Morrison, D. Hernandez, S. Najjar, W. L. McArdle, D. Hadley, M. J. Brown, J. M. Connell, A. D. Hingorani, I. N. Day, D. A. Lawlor, J. P. Beilby, R. W. Lawrence, R. Clarke, J. C. Hopewell, H. Ongen, A. W. Dreisbach, Y. Li, J. H. Young, J. C. Bis, M. Kahonen, J. Viikari, L. S. Adair, N. R. Lee, M. H. Chen, M. Olden, C. Pattaro, J. A. Bolton, A. Kottgen, S. Bergmann, V. Mooser, N. Chaturvedi, T. M. Frayling, M. Islam, T. H. Jafar, J. Erdmann, S. R. Kulkarni, S. R. Bornstein, J. Grassler, L. Groop, B. F. Voight, J. Kettunen, P. Howard, A. Taylor, S. Guarrera, F. Ricceri, V. Emilsson, A. Plump, I. Barroso, K. T. Khaw, A. B. Weder, S. C. Hunt, Y. V. Sun, R. N. Bergman, F. S. Collins, L. L. Bonnycastle, L. J. Scott, H. M. Stringham, L. Peltonen, M. Perola, E. Vartiainen, S. M. Brand, J. A. Staessen, T. J. Wang, P. R. Burton, M. Soler Artigas, Y. Dong, H. Snieder, X. Wang, H. Zhu, K. K. Lohman, M. E. Rudock, S. R. Heckbert, N. L. Smith, K. L. Wiggins, A. Doumatey, D. Shriner, G. Veldre, M. Viigimaa, S. Kinra, D. Prabhakaran, V. Tripathy, C. D. Langefeld, A. Rosengren, D. S. Thelle, A. M. Corsi, A. Singleton, T. Forrester, G. Hilton, C. A. McKenzie, T. Salako, N. Iwai, Y. Kita, T. Ogiwara, T. Ohkubo, T. Okamura, H. Ueshima, S. Umemura, S. Eyheramendy, T. Meitinger, H. E. Wichmann, Y. S. Cho, H. L. Kim, J. Y. Lee, J. Scott, J. S. Sehmi, W. Zhang, B. Hedblad, P. Nilsson, G. D. Smith, A. Wong, N. Narisu, A. Stancakova, L. J. Raffel, J. Yao, S. Kathiresan, C. J. O'Donnell, S. M. Schwartz, M. A. Ikram, W. T. Longstreth, Jr., T. H. Mosley, S. Seshadri, N. R. Shrine, L. V. Wain, M. A. Morken, A. J. Swift, J. Laitinen, I. Prokopenko, P. Zitting, J. A. Cooper, S. E. Humphries, J. Danesh, A. Rasheed, A. Goel, A. Hamsten, H. Watkins, S. J. Bakker, W. H. van Gilst, C. S. Janipalli, K. R. Mani, C. S. Yajnik, A. Hofman, F. U. Mattace-Raso, B. A. Oostra, A. Demirkan, A. Isaacs, F. Rivadeneira, E. G. Lakatta, M. Orru, A. Scuteri, M. Ala-Korpela, A. J. Kangas, L. P. Lyytikainen, P. Soininen, T. Tukiainen, P. Wurtz, R. T. Ong, M. Dorr, H. K. Kroemer, U. Volker, H. Volzke, P. Galan, S. Herberg, M. Lathrop, D. Zelenika, P. Deloukas, M. Mangino, T. D. Spector, G. Zhai, J. F. Meschia, M. A. Nalls, P. Sharma, J. Terzic, M. V. Kumar, M. Denniff, E. Zukowska-Szczechowska, L. E. Wagenknecht, F. G. Fowkes, F. J. Charchar, P. E. Schwarz, C. Hayward, X. Guo, C. Rotimi, M. L. Bots, E. Brand, N. J. Samani, O. Polasek, P. J. Talmud, F. Nyberg, D. Kuh, M. Laan, K. Hveem, L. J. Palmer, Y. T. van der Schouw, J. P. Casas, K. L. Mohlke, P. Vineis, O. Raitakari, S. K. Ganesh, T. Y. Wong, E. S. Tai, R. S. Cooper, M. Laakso, D. C. Rao, T. B. Harris, R. W. Morris, A. F. Dominiczak, M. Kivimaki, M. G. Marmot, T. Miki, D. Saleheen, G. R. Chandak, J. Coresh, G. Navis, V. Salomaa, B. G. Han, X. Zhu, J. S. Kooner, O. Melander, P. M. Ridker, S. Bandinelli, U. B. Gyllensten, A. F. Wright, J. F. Wilson, L. Ferrucci, M. Farrall, J. Tuomilehto, P. P. Pramstaller, R. Elosua, N. Soranzo, E. J. Sijbrands, D. Altshuler, R. J. Loos, A. R. Shuldiner, C. Gieger, P. Meneton, A. G. Uitterlinden, N. J. Wareham, V. Gudnason, J. I. Rotter, R. Rettig, M. Uda, D. P. Strachan, J. C. Witteman, A. L. Hartikainen, J. S. Beckmann, E. Boerwinkle, R. S. Vasan, M. Boehnke, M. G. Larson, M. R. Jarvelin, B. M.

Psaty, G. R. Abecasis, A. Chakravarti, P. Elliott, C. M. van Duijn, C. Newton-Cheh, D. Levy, M. J. Caulfield and T. Johnson (2011). "Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk." Nature **478**(7367): 103-109.

Investigators, S., H. D. White, C. Held, R. Stewart, E. Tarka, R. Brown, R. Y. Davies, A. Budaj, R. A. Harrington, P. G. Steg, D. Ardissino, P. W. Armstrong, A. Avezum, P. E. Aylward, A. Bryce, H. Chen, M. F. Chen, R. Corbalan, A. J. Dalby, N. Danchin, R. J. De Winter, S. Denchev, R. Diaz, M. Elisaf, M. D. Flather, A. R. Goudev, C. B. Granger, L. Grinfeld, J. S. Hochman, S. Husted, H. S. Kim, W. Koenig, A. Linhart, E. Lonn, J. Lopez-Sendon, A. J. Manolis, E. R. Mohler, 3rd, J. C. Nicolau, P. Pais, A. Parkhomenko, T. R. Pedersen, D. Pella, M. A. Ramos-Corralles, M. Ruda, M. Sereg, S. Siddique, P. Sinnaeve, P. Smith, P. Sritara, H. P. Swart, R. G. Sy, T. Teramoto, H. F. Tse, D. Watson, W. D. Weaver, R. Weiss, M. Viigimaa, D. Vinereanu, J. Zhu, C. P. Cannon and L. Wallentin (2014). "Darapladib for preventing ischemic events in stable coronary heart disease." N Engl J Med **370**(18): 1702-1711.

Irie, T., K. Fukushi, T. Ido, T. Nozaki and Y. Kasida (1982). "18F-Fluorination by crown ether—metal fluoride: (I) On labeling 18F-21-fluoroprogesterone." The International Journal of Applied Radiation and Isotopes **33**(12): 1449-1452.

Irkle, A., A. T. Vesey, D. Y. Lewis, J. N. Skepper, J. L. E. Bird, M. R. Dweck, F. R. Joshi, F. A. Gallagher, E. A. Warburton, M. R. Bennett, K. M. Brindle, D. E. Newby, J. H. Rudd and A. P. Davenport (2015). "Identifying active vascular microcalcification by 18F-sodium fluoride positron emission tomography." Nature Communications **6**: 7495.

Itabe, H., E. Takeshima, H. Iwasaki, J. Kimura, Y. Yoshida, T. Imanaka and T. Takano (1994). "A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes foam cells in atherosclerotic lesions. Complex formation of oxidized phosphatidylcholines and polypeptides." J Biol Chem **269**(21): 15274-15279.

Itskovich, V. V., R. P. Choudhury, J. G. S. Aguinaldo, J. T. Fallon, S. Omerhodzic, E. A. Fisher and Z. A. Fayad (2003). "Characterization of aortic root atherosclerosis in ApoE knockout mice: High-resolution in vivo and ex vivo MRM with histological correlation." Magnetic Resonance in Medicine **49**(2): 381-385.

Jansen, C. H., D. Perera, M. R. Makowski, A. J. Wiethoff, A. Phinikaridou, R. M. Razavi, M. S. Marber, G. F. Greil, E. Nagel, D. Maintz, S. Redwood and R. M. Botnar (2011). "Detection of intracoronary thrombus by magnetic resonance imaging in patients with acute myocardial infarction." Circulation **124**(4): 416-424.

Jeney, V., G. Balla and J. Balla (2014). "Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression of atherosclerosis." Front Physiol **5**: 379.

Jensen, H. A. and J. L. Mehta (2016). "Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis." Expert Rev Cardiovasc Ther **14**(9): 1021-1033.

Jha, D. K. (2004). Radioactivity and Radioactive Decay.

Johnström, P. S. and S. Stone-Elander (1996). "Strategies for reducing isotopic dilution in the synthesis of 18F-labeled polyfluorinated ethyl groups." Applied Radiation and Isotopes **47**(4): 401-407.

Joshi, N. V., A. T. Vesey, M. C. Williams, A. S. V. Shah, P. A. Calvert, F. H. M. Craighead, S. E. Yeoh, W. Wallace, D. Salter, A. M. Fletcher, E. J. R. van Beek, A. D. Flapan, N. G. Uren, M. W. H. Behan, N. L. M. Cruden, N. L. Mills, K. A. A. Fox, J. H. F. Rudd, M. R. Dweck and D. E. Newby (2014). "18F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: a prospective clinical trial." The Lancet **383**(9918): 705-713.

Karabina, S. and E. Ninio (2015). "Plasma PFAH/PLA2G7 Genetic Variability, Cardiovascular Disease, and Clinical Trials." Enzymes **38**: 145-155.

Kasprzak, J. D., M. Klosinska and J. Drozd (2006). "Clinical aspects of assessment of endothelial function." Pharmacol Rep **58 Suppl**: 33-40.

Kenneth, M. J. and E. I. Cespedes (2003). Methods and apparatus for the identification and stabilization of vulnerable plaque, Google Patents.

Kiesewetter, D. O., O. Jacobson, L. Lang and X. Chen (2011). "Automated radiochemical synthesis of [18F]FBEM: a thiol reactive synthon for radiofluorination of peptides and proteins." Appl Radiat Isot **69**(2): 410-414.

Kietselaer, B. L., C. P. Reutelingsperger, G. A. Heidendal, M. J. Daemen, W. H. Mess, L. Hofstra and J. Narula (2004). "Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis." N Engl J Med **350**(14): 1472-1473.

Kilbourn, M. R. and R. Subramanian (1990). "Synthesis of fluorine-18 labeled 1,1-difluoro-2,2-dichloroethyl aryl ethers by 18F-for-19F exchange." Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals **28**(12): 1355-1361.

Kimura, B. J., V. Bhargava and A. N. DeMaria (1995). "Value and limitations of intravascular ultrasound imaging in characterizing coronary atherosclerotic plaque." Am Heart J **130**(2): 386-396.

Kinlay, S., D. Behrendt, M. Wainstein, J. Beltrame, J. C. Fang, M. A. Creager, A. P. Selwyn and P. Ganz (2001). "Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries." Circulation **104**(10): 1114-1118.

Kockx, M. M., G. R. De Meyer, J. Muhring, W. Jacob, H. Bult and A. G. Herman (1998). "Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques." Circulation **97**(23): 2307-2315.

Koenig, W. and N. Khuseynova (2007). "Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(1): 15-26.

Koenig, W., D. Twardella, H. Brenner and D. Rothenbacher (2006). "Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function, and hemodynamic stress." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(7): 1586-1593.

Kolodgie, F. D., A. P. Burke, K. S. Skorija, E. Ladich, R. Kutys, A. T. Makuria and R. Virmani (2006). "Lipoprotein-associated phospholipase A2 protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(11): 2523-2529.

Kontush, A., S. Chantepie and M. J. Chapman (2003). "Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(10): 1881-1888.

Kramer, R. M., C. Hession, B. Johansen, G. Hayes, P. McGray, E. P. Chow, R. Tizard and R. B. Pepinsky (1989). "Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2." J Biol Chem **264**(10): 5768-5775.

Laitinen, I., P. Marjamaki, K. Nagren, V. J. Laine, I. Wilson, P. Leppanen, S. Yla-Herttuala, A. Roivainen and J. Knuuti (2009). "Uptake of inflammatory cell marker [11C]PK11195 into mouse atherosclerotic plaques." Eur J Nucl Med Mol Imaging **36**(1): 73-80.

Lakshman, M. K., F. A. Tine, T. A. Khandaker, V. Basava, N. B. Agyemang, M. S. A. Benavidez, M. Gaši, L. Guerrero and B. Zajc (2017). "KHF2: A Mild and Selective Desilylating Agent for Phenol tert-Butyldimethylsilyl (TBDMS) Ethers." Synlett **13**(03): 381-385.

Lange, Y., C. M. Cohen and M. J. Poznansky (1977). "Transmembrane movement of cholesterol in human erythrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(4): 1538-1542.

Lange, Y., J. Ye and T. L. Steck (2004). "How cholesterol homeostasis is regulated by plasma membrane cholesterol in excess of phospholipids." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(32): 11664-11667.

- Leber, A. W., A. Knez, A. Becker, C. Becker, F. von Ziegler, K. Nikolaou, C. Rist, M. Reiser, C. White, G. Steinbeck and P. Boekstegers (2004). "Accuracy of multidetector spiral computed tomography in identifying and differentiating the composition of coronary atherosclerotic plaques: a comparative study with intracoronary ultrasound." J Am Coll Cardiol **43**(7): 1241-1247.
- Le Dall, J., B. Ho-Tin-Noe, L. Louedec, O. Meilhac, C. Roncal, P. Carmeliet, S. Germain, J. B. Michel and X. Houard (2010). "Immaturity of microvessels in haemorrhagic plaques is associated with proteolytic degradation of angiogenic factors." Cardiovasc Res **85**(1): 184-193.
- Lederman, R. J., R. R. Raylman, S. J. Fisher, P. V. Kison, H. San, E. G. Nabel and R. L. Wahl (2001). "Detection of atherosclerosis using a novel positron-sensitive probe and 18-fluorodeoxyglucose (FDG)." Nucl Med Commun **22**(7): 747-753.
- Lee, J. S., J. D. Morrisett and C. H. Tung (2012). "Detection of hydroxyapatite in calcified cardiovascular tissues." Atherosclerosis **224**(2): 340-347.
- Lee, S., K. G. Birukov, C. E. Romanoski, J. R. Springstead, A. J. Lusis and J. A. Berliner (2012). "The Role of Phospholipid Oxidation Products in Atherosclerosis." Circ Res **111**(6): 778-799.
- Lee, S. J. and J. C. Paeng (2015). "Nuclear Molecular Imaging for Vulnerable Atherosclerotic Plaques." Korean J Radiol **16**(5): 955-966.
- Levin, V. V., A. A. Zemtsov, M. I. Struchkova and A. D. Dilman (2013). "Reactions of Difluorocarbene with Organozinc Reagents." Organic Letters **15**(4): 917-919.
- Ley, O. and T. Kim (2007). "Calculation of arterial wall temperature in atherosclerotic arteries: effect of pulsatile flow, arterial geometry, and plaque structure." Biomed Eng Online **6**: 8.
- Li, Z., C. Gelbaum, W. L. Heaner, J. Fisk, A. Jaganathan, B. Holden, P. Pollet and C. L. Liotta (2016). "Palladium-Catalyzed Suzuki Reactions in Water with No Added Ligand: Effects of Reaction Scale, Temperature, pH of Aqueous Phase, and Substrate Structure." Organic Process Research & Development **20**(8): 1489-1499.
- Libby, P. (2008). "The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis." J Intern Med **263**(5): 517-527.
- Libby, P. (2012). "Inflammation in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(9): 2045-2051.
- Lien, V. T. and P. J. Riss (2014). "Radiosynthesis of [¹⁸F]trifluoroalkyl groups: scope and limitations." Biomed Res Int **2014**: 380124.
- Linton, M. F., P. G. Yancey, S. S. Davies, W. G. J. Jerome, E. F. Linton and K. C. Vickers (2000). The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. Endotext. L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan *et al.* South Dartmouth (MA).
- Liu, Q., X. Chen, W. Chen, X. Yuan, H. Su, J. Shen and Y. Xu (2016). "Structural and Thermodynamic Characterization of Protein-Ligand Interactions Formed between Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Inhibitors." J Med Chem **59**(10): 5115-5120.
- Luscher, T. F. and M. Barton (1997). "Biology of the endothelium." Clin Cardiol **20**(11 Suppl 2): II-3-10.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.
- MacNeill, B. D., H. C. Lowe, M. Takano, V. Fuster and I. K. Jang (2003). "Intravascular modalities for detection of vulnerable plaque: current status." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(8): 1333-1342.
- Macphee, C. H., K. E. Moores, H. F. Boyd, D. Dhanak, R. J. Iffe, C. A. Leach, D. S. Leake, K. J. Milliner, R. A. Patterson, K. E. Suckling, D. G. Tew and D. M. B. Hickey (1999). "Lipoprotein-associated phospholipase A2,

platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor." Biochemical Journal **338**(2): 479-487.

Maddux, J. T., O. Wink, J. C. Messenger, B. M. Groves, R. Liao, J. Strzelczyk, S. Y. Chen and J. D. Carroll (2004). "Randomized study of the safety and clinical utility of rotational angiography versus standard angiography in the diagnosis of coronary artery disease." Catheter Cardiovasc Interv **62**(2): 167-174.

Maisey, D. L. B. D. W. T. P. E. V. M. N. (2005). Positron Emission Tomography, Springer-Verlag London.

Marathe, G. K., C. Pandit, C. L. Lakshmikanth, V. H. Chaithra, S. P. Jacob and C. J. D'Souza (2014). "To hydrolyze or not to hydrolyze: the dilemma of platelet-activating factor acetylhydrolase." J Lipid Res **55**(9): 1847-1854.

Marathe, G. K., S. M. Prescott, G. A. Zimmerman and T. M. McIntyre (2001). "Oxidized LDL contains inflammatory PAF-like phospholipids." Trends Cardiovasc Med **11**(3-4): 139-142.

Marian, A. J. (2012). "The enigma of genetics etiology of atherosclerosis in the post-GWAS era." Curr Atheroscler Rep **14**(4): 295-299.

Martin, R. and S. L. Buchwald (2008). "Palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions employing dialkylbiaryl phosphine ligands." Acc Chem Res **41**(11): 1461-1473.

Masteling, M. G., C. J. Zeebregts, R. A. Tio, J. C. Breek, U. J. Tietge, J. F. de Boer, A. W. Glaudemans, R. A. Dierckx, H. H. Boersma and R. H. Slart (2011). "High-resolution imaging of human atherosclerotic carotid plaques with micro 18F-FDG PET scanning exploring plaque vulnerability." J Nucl Cardiol **18**(6): 1066-1075.

Matsumoto, K., S. Ehara, T. Hasegawa, M. Sakaguchi, K. Otsuka, J. Yoshikawa and K. Shimada (2015). "Localization of Coronary High-Intensity Signals on T1-Weighted MR Imaging: Relation to Plaque Morphology and Clinical Severity of Angina Pectoris." JACC Cardiovasc Imaging **8**(10): 1143-1152.

Matsuura, E., K. Kobayashi, M. Tabuchi and L. R. Lopez (2006). "Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis." Prog Lipid Res **45**(6): 466-486.

McCarthy, M. J., I. M. Loftus, M. M. Thompson, L. Jones, N. J. London, P. R. Bell, A. R. Naylor and N. P. Brindle (1999). "Angiogenesis and the atherosclerotic carotid plaque: an association between symptomatology and plaque morphology." J Vasc Surg **30**(2): 261-268.

McIntyre, T. M., S. M. Prescott and D. M. Stafforini (2009). "The emerging roles of PAF acetylhydrolase." J Lipid Res **50** Suppl: S255-259.

Menezes, L. J., I. Kayani, S. Ben-Haim, B. Hutton, P. J. Ell and A. M. Groves (2010). "What is the natural history of 18F-FDG uptake in arterial atheroma on PET/CT? Implications for imaging the vulnerable plaque." Atherosclerosis **211**(1): 136-140.

Menezes, L. J., C. W. Kotze, O. Agu, T. Richards, J. Brookes, V. J. Goh, M. Rodriguez-Justo, R. Endozo, R. Harvey, S. W. Yusuf, P. J. Ell and A. M. Groves (2011). "Investigating vulnerable atheroma using combined (18)F-FDG PET/CT angiography of carotid plaque with immunohistochemical validation." J Nucl Med **52**(11): 1698-1703.

Michel, J. B., R. Virmani, E. Arbustini and G. Pasterkamp (2011). "Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability." Eur Heart J **32**(16): 1977-1985, 1985a, 1985b, 1985c.

Miller, M., M. Zhan and S. Havas (2005). "High attributable risk of elevated C-reactive protein level to conventional coronary heart disease risk factors: the Third National Health and Nutrition Examination Survey." Arch Intern Med **165**(18): 2063-2068.

- Mojtahedi, A., A. Alavi, S. Thamake, R. Amerinia, D. Ranganathan, I. Tworowska and E. S. Delpassand (2015). "Assessment of vulnerable atherosclerotic and fibrotic plaques in coronary arteries using (68)Ga-DOTATATE PET/CT." Am J Nucl Med Mol Imaging **5**(1): 65-71.
- Montecucco, F. and F. Mach (2008). "New evidences for C-reactive protein (CRP) deposits in the arterial intima as a cardiovascular risk factor." Clin Interv Aging **3**(2): 341-349.
- Moreno, P. R., R. A. Lodder, K. R. Purushothaman, W. E. Charash, W. N. O'Connor and J. E. Muller (2002). "Detection of lipid pool, thin fibrous cap, and inflammatory cells in human aortic atherosclerotic plaques by near-infrared spectroscopy." Circulation **105**(8): 923-927.
- Moreno, P. R., K. R. Purushothaman, V. Fuster, D. Echeverri, H. Trusczyńska, S. K. Sharma, J. J. Badimon and W. N. O'Connor (2004). "Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability." Circulation **110**(14): 2032-2038.
- Moreno, P. R., K. R. Purushothaman, E. Zias, J. Sanz and V. Fuster (2006). "Neovascularization in human atherosclerosis." Curr Mol Med **6**(5): 457-477.
- Mossine, A. V., A. F. Brooks, K. J. Makaravage, J. M. Miller, N. Ichiishi, M. S. Sanford and P. J. H. Scott (2015). "Synthesis of [18F]Arenes via the Copper-Mediated [18F]Fluorination of Boronic Acids." Organic Letters **17**(23): 5780-5783.
- Moulian, N., F. Truffault, Y. M. Gaudry-Talarmain, A. Serraf and S. Berrih-Aknin (2001). "In vivo and in vitro apoptosis of human thymocytes are associated with nitrotyrosine formation." Blood **97**(11): 3521-3530.
- Mulholland, K. R., A. R. Ross, G. R. Slater and G. E. Smith (2007). Process to prepare (1-carboxymethyl)-pyrimidinone compounds, Google Patents.
- Muller, H. F., A. Viacoz, L. Fisch, C. Bonvin, K. O. Lovblad, O. Ratib, P. Lalive, S. Pagano, N. Vuilleumier, J. P. Willi and R. Sztajzel (2014). "18FDG-PET-CT: an imaging biomarker of high-risk carotid plaques. Correlation to symptoms and microembolic signals." Stroke **45**(12): 3561-3566.
- Myers, K. S., J. H. F. Rudd, E. P. Hailman, J. A. Bolognese, J. Burke, C. A. Pinto, M. Klimas, R. Hargreaves, H. M. Dansky and Z. A. Fayad (2012). "Correlation Between Arterial FDG Uptake and Biomarkers in Peripheral Artery Disease." JACC Cardiovasc Imaging **5**(1): 38-45.
- Nagano, J. M., K. L. Hsu, L. R. Whitby, M. J. Niphakis, A. E. Speers, S. J. Brown, T. Spicer, V. Fernandez-Vega, J. Ferguson, P. Hodder, P. Srinivasan, T. D. Gonzalez, H. Rosen, B. J. Bahnson and B. F. Cravatt (2013). "Selective inhibitors and tailored activity probes for lipoprotein-associated phospholipase A(2)." Bioorg Med Chem Lett **23**(3): 839-843.
- Nagib, D. A. and D. W. MacMillan (2011). "Trifluoromethylation of arenes and heteroarenes by means of photoredox catalysis." Nature **480**(7376): 224-228.
- Nakashima, Y., T. N. Wight and K. Sueishi (2008). "Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans." Cardiovasc Res **79**(1): 14-23.
- Nambi, V. (2005). "The use of myeloperoxidase as a risk marker for atherosclerosis." Curr Atheroscler Rep **7**(2): 127-131.
- Newby, A. C. (2007). "Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques." Trends Cardiovasc Med **17**(8): 253-258.
- Nowak, W. N., J. Deng, X. Z. Ruan and Q. Xu (2017). "Reactive Oxygen Species Generation and Atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **37**(5): e41-e52.
- Nozaki, T. T., Y. (1967). "The Preparation of F18-labelled Aryl Fluorides." Int. J. Appl. Radiat. Isot. **18**: 111-119.

O'Donoghue, M., D. A. Morrow, M. S. Sabatine, S. A. Murphy, C. H. McCabe, C. P. Cannon and E. Braunwald (2006). "Lipoprotein-associated phospholipase A2 and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes in the PROVE IT-TIMI 22 (PRavastatin Or atorVastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction) trial." Circulation **113**(14): 1745-1752.

O'Donoghue, M. L., E. Braunwald, H. D. White, M. A. Lukas, E. Tarka, P. G. Steg, J. S. Hochman, C. Bode, A. P. Maggioni, K. Im, J. B. Shannon, R. Y. Davies, S. A. Murphy, S. E. Crugnale, S. D. Wiviott, M. P. Bonaca, D. F. Watson, W. D. Weaver, P. W. Serruys, C. P. Cannon, S.-T. Investigators and D. L. Steen (2014). "Effect of darapladib on major coronary events after an acute coronary syndrome: the SOLID-TIMI 52 randomized clinical trial." JAMA **312**(10): 1006-1015.

Ohsfeldt, R. L., S. K. Gandhi, K. M. Fox, M. F. Bullano and M. Davidson (2010). "Medical and cost burden of atherosclerosis among patients treated in routine clinical practice." J Med Econ **13**(3): 500-507.

Orbay, H., H. Hong, Y. Zhang and W. Cai (2013). "Positron emission tomography imaging of atherosclerosis." Theranostics **3**(11): 894-902.

ORS. (2015, 29/06/2015). "Indicateurs sur les maladies cardiovasculaires à La Réunion." 12/05/2017, from <https://www.ors-ocean-indien.org/-Lettres-d-information->.

Overwijk, W. W. and N. P. Restifo (2001). "B16 as a Mouse Model for Human Melanoma." Curr Protoc Immunol **Chapter**: Unit-20.21.

Owens, G. K., M. S. Kumar and B. R. Wamhoff (2004). "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease." Physiol Rev **84**(3): 767-801.

Palinski, W., T. Koschinsky, S. W. Butler, E. Miller, H. Vlassara, A. Cerami and J. L. Witztum (1995). "Immunological evidence for the presence of advanced glycosylation end products in atherosclerotic lesions of euglycemic rabbits." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(5): 571-582.

Phelps, M. E. (2000). "Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 9226-9233.

Pichler, B. J., H. F. Wehrl and M. S. Judenhofer (2008). "Latest Advances in Molecular Imaging Instrumentation." Journal of Nuclear Medicine **49**(Suppl 2): 5S-23S.

Pike, V. W. and F. I. Aigbirhio (1995). "Reactions of cyclotron-produced [18F]fluoride with diaryliodonium salts-a novel single-step route to no-carrier-added [18]fluoroarenes." Journal of the Chemical Society, Chemical Communications(21): 2215-2216.

Podrez, E. A., M. Febbraio, N. Sheibani, D. Schmitt, R. L. Silverstein, D. P. Hajjar, P. A. Cohen, W. A. Frazier, H. F. Hoff and S. L. Hazen (2000). "Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species." J Clin Invest **105**(8): 1095-1108.

Prescott, S. M., G. A. Zimmerman and T. M. McIntyre (1990). "Platelet-activating factor." J Biol Chem **265**(29): 17381-17384.

Preshlock, S., S. Calderwood, S. Verhoog, M. Tredwell, M. Huiban, A. Hienzsch, S. Gruber, T. C. Wilson, N. J. Taylor, T. Cailly, M. Schedler, T. L. Collier, J. Passchier, R. Smits, J. Mollitor, A. Hoepfing, M. Mueller, C. Genicot, J. Mercier and V. Gouverneur (2016). "Enhanced copper-mediated 18F-fluorination of aryl boronic esters provides eight radiotracers for PET applications." Chemical Communications **52**(54): 8361-8364.

Preshlock, S., M. Tredwell and V. Gouverneur (2016). "(18)F-Labeling of Arenes and Heteroarenes for Applications in Positron Emission Tomography." Chem Rev **116**(2): 719-766.

Pretze, M., F. Wuest, T. Poppel, M. Köckerling and C. Mamat (2010). "The traceless Staudinger ligation with fluorine-18: a novel and versatile labeling technique for the synthesis of PET-radiotracers." Tetrahedron Letters **51**(49): 6410-6414.

- Rao, R. M., L. Yang, G. Garcia-Cardena and F. W. Luscinikas (2007). "Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall." *Circ Res* **101**(3): 234-247.
- Reed, C. D., G. G. Launay and M. A. Carroll (2012). "Evaluation of tetraethylammonium bicarbonate as a phase-transfer agent in the formation of [¹⁸F]fluoroarenes." *Journal of Fluorine Chemistry* **143**: 231-237.
- Ren, H., H.-Y. Wey, M. Strebl, R. Neelamegam, T. Ritter and J. M. Hooker (2014). "Synthesis and Imaging Validation of [¹⁸F]MDL100907 Enabled by Ni-Mediated Fluorination." *ACS Chemical Neuroscience* **5**(7): 611-615.
- Ridker, P. M. (2003). "Cardiology Patient Page. C-reactive protein: a simple test to help predict risk of heart attack and stroke." *Circulation* **108**(12): e81-85.
- Ridker, P. M. (2007). "C-reactive protein and the prediction of cardiovascular events among those at intermediate risk: moving an inflammatory hypothesis toward consensus." *J Am Coll Cardiol* **49**(21): 2129-2138.
- Riesen, W. F. (2008, 2008). "Quels marqueurs biologiques de l'athérosclérose et du risque cardiovasculaire conseiller ?" Retrieved 15/05/2017, from <https://www.revmed.ch/RMS/2008/RMS-148/Quels-marqueurs-biologiques-de-l-atherosclerose-et-du-risque-cardiovasculaire-conseiller>.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." *Nature* **386**(6626): 671-674.
- Rodriguez-Granillo, G. A., E. Regar, J. A. Schaar and P. W. Serruys (2005). "[New insights towards catheter-based identification of vulnerable plaque]." *Rev Esp Cardiol* **58**(10): 1197-1206.
- Rogers, I. S. and A. Tawakol (2011). "Imaging of coronary inflammation with FDG-PET: feasibility and clinical hurdles." *Curr Cardiol Rep* **13**(2): 138-144.
- Rogers, W. J., J. W. Prichard, Y. L. Hu, P. R. Olson, D. H. Benckart, C. M. Kramer, D. A. Vido and N. Reichek (2000). "Characterization of signal properties in atherosclerotic plaque components by intravascular MRI." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(7): 1824-1830.
- Rominger, A., T. Saam, E. Vogl, C. Ubleis, C. la Fougere, S. Forster, A. Haug, P. Cumming, M. F. Reiser, K. Nikolaou, P. Bartenstein and M. Hacker (2010). "In vivo imaging of macrophage activity in the coronary arteries using ⁶⁸Ga-DOTATATE PET/CT: correlation with coronary calcium burden and risk factors." *J Nucl Med* **51**(2): 193-197.
- Rosenson, R. S. and E. Hurt-Camejo (2012). "Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis." *Eur Heart J* **33**(23): 2899-2909.
- Rosenson, R. S. and D. M. Stafforini (2012). "Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2." *J Lipid Res* **53**(9): 1767-1782.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." *Nature* **362**(6423): 801-809.
- Ross, R. (1993). "Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry." *Am J Pathol* **143**(4): 987-1002.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* **340**(2): 115-126.
- Rotstein, B. H., N. A. Stephenson, N. Vasdev and S. H. Liang (2014). "Spirocyclic hypervalent iodine(III)-mediated radiofluorination of non-activated and hindered aromatics." *Nat Commun* **5**: 4365.
- Rudd, J. H., E. A. Warburton, T. D. Fryer, H. A. Jones, J. C. Clark, N. Antoun, P. Johnstrom, A. P. Davenport, P. J. Kirkpatrick, B. N. Arch, J. D. Pickard and P. L. Weissberg (2002). "Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography." *Circulation* **105**(23): 2708-2711.

- Ruhl, T., W. Rafique, V. T. Lien and P. J. Riss (2014). "Cu(I)-mediated (18)F-trifluoromethylation of arenes: rapid synthesis of (18)F-labeled trifluoromethyl arenes." Chem Commun (Camb) **50**(45): 6056-6059.
- Sage, A. P., Y. Tintut and L. L. Demer (2010). "Regulatory mechanisms in vascular calcification." Nat Rev Cardiol **7**(9): 528-536.
- Samanta, U. and B. J. Bahnson (2008). "Crystal structure of human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: structural implication to lipoprotein binding and catalysis." J Biol Chem **283**(46): 31617-31624.
- Sandhu, P. K., S. M. MUSAAD, A. T. Remaley, S. S. Buehler, S. Strider, J. H. Derzon, H. W. Vesper, A. Ranne, C. S. Shaw and R. H. Christenson (2016). "Lipoprotein Biomarkers and Risk of Cardiovascular Disease: A Laboratory Medicine Best Practices (LMBP) Systematic Review." J Appl Lab Med **1**(2): 214-229.
- Satter, M. R., C. C. Martin, T. R. Oakes, B. F. Christian and R. J. Nickles (1994). "Synthesis of the fluorine-18 labeled inhalation anesthetics." Appl Radiat Isot **45**(11): 1093-1100.
- Savastano, L. E., Q. Zhou, A. Smith, K. Vega, C. Murga-Zamalloa, D. Gordon, J. McHugh, L. Zhao, M. M. Wang, A. Pandey, B. G. Thompson, J. Xu, J. Zhang, Y. E. Chen, E. J. Seibel and T. D. Wang (2017). "Multimodal laser-based angioscopy for structural, chemical and biological imaging of atherosclerosis." Nature Biomedical Engineering **1**: 0023.
- Schäfer, S., W. Frey, A. S. K. Hashmi, V. Cmrecki, A. Luquin and M. Laguna (2010). "Synthesis, characterization and solubility studies of four new highly water soluble 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA) salts and their gold(I) complexes." Polyhedron **29**(8): 1925-1932.
- Schuppan, D., M. Ruehl, R. Somasundaram and E. G. Hahn (2001). "Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis." Semin Liver Dis **21**(3): 351-372.
- Seidl, T. L., S. K. Sundalam, B. McCullough and D. R. Stuart (2016). "Unsymmetrical Aryl(2,4,6-trimethoxyphenyl)iodonium Salts: One-Pot Synthesis, Scope, Stability, and Synthetic Studies." The Journal of Organic Chemistry **81**(5): 1998-2009.
- Seilhamer, J. J., W. Pruzanski, P. Vadas, S. Plant, J. A. Miller, J. Kloss and L. K. Johnson (1989). "Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid." J Biol Chem **264**(10): 5335-5338.
- Sergeev, M. E., F. Morgia, M. Lazari, C. Wang, Jr. and R. M. van Dam (2015). "Titania-catalyzed radiofluorination of tosylated precursors in highly aqueous medium." J Am Chem Soc **137**(17): 5686-5694.
- Shao, B., M. N. Oda, J. F. Oram and J. W. Heinecke (2010). "Myeloperoxidase: An oxidative pathway for generating dysfunctional HDL." Chem Res Toxicol **23**(3): 447-454.
- Sharp, J. D., D. L. White, X. G. Chiou, T. Goodson, G. C. Gamboa, D. McClure, S. Burgett, J. Hoskins, P. L. Skatrud, J. R. Sportsman and *et al.* (1991). "Molecular cloning and expression of human Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2." J Biol Chem **266**(23): 14850-14853.
- Shen, J., Y. Wang and K. Wang (2014). Azole heterocyclic compound, preparation method, pharmaceutical composition and use, Google Patents.
- Singh, M. S. (2004). Advanced Organic Chemistry: Reactions And Mechanisms, Dorling Kindersley (RS).
- Sniderman, A. D., K. Williams, J. H. Contois, H. M. Monroe, M. J. McQueen, J. de Graaf and C. D. Furberg (2011). "A meta-analysis of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B as markers of cardiovascular risk." Circ Cardiovasc Qual Outcomes **4**(3): 337-345.

Sorescu, D., D. Weiss, B. Lassegue, R. E. Clempus, K. Szocs, G. P. Sorescu, L. Valppu, M. T. Quinn, J. D. Lambeth, J. D. Vega, W. R. Taylor and K. K. Griendling (2002). "Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis." Circulation **105**(12): 1429-1435.

Sowers, J. R. (2002). "Hypertension, angiotensin II, and oxidative stress." N Engl J Med **346**(25): 1999-2001.

Stafforini, D. M. (2009). "Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2)." Cardiovasc Drugs Ther **23**(1): 73-83.

Staprans, I., X. M. Pan, J. H. Rapp and K. R. Feingold (2005). "The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis." Mol Nutr Food Res **49**(11): 1075-1082.

Sтары, H. C. (2000). "Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1177-1178.

Stary, H. C., A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **89**(5): 2462-2478.

Stefanadis, C., K. Toutouzas, E. Tsiamis, I. Mitropoulos, C. Tsioufis, I. Kallikazaros, C. Pitsavos and P. Toutouzas (2003). "Thermal heterogeneity in stable human coronary atherosclerotic plaques is underestimated in vivo: the "cooling effect" of blood flow." J Am Coll Cardiol **41**(3): 403-408.

Steinberg, D., S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo and J. L. Witztum (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." N Engl J Med **320**(14): 915-924.

Steinberg, D. and J. L. Witztum (1990). "Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts." JAMA **264**(23): 3047-3052.

Suehiro, M., G. Yang, G. Torchon, E. Ackerstaff, J. Humm, J. Koutcher and O. Ouerfelli (2011). "Radiosynthesis of the tumor hypoxia marker [18F]TFMISO via O-[18F]trifluoroethylation reveals a striking difference between trifluoroethyl tosylate and iodide in regiochemical reactivity toward oxygen nucleophiles." Bioorg Med Chem **19**(7): 2287-2297.

Sutcliffe-Goulden, J. L., M. J. O'Doherty, P. K. Marsden, I. R. Hart, J. F. Marshall and S. S. Bansal (2002). "Rapid solid phase synthesis and biodistribution of 18F-labelled linear peptides." Eur J Nucl Med Mol Imaging **29**(6): 754-759.

Tamminen, M., G. Mottino, J. H. Qiao, J. L. Breslow and J. S. Frank (1999). "Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(4): 847-853.

Tarkin, J. M., F. R. Joshi and J. H. Rudd (2014). "PET imaging of inflammation in atherosclerosis." Nat Rev Cardiol **11**(8): 443-457.

Terashima, M., H. Kaneda and T. Suzuki (2012). "The role of optical coherence tomography in coronary intervention." Korean J Intern Med **27**(1): 1-12.

Tew, D. G., H. F. Boyd, S. Ashman, C. Theobald and C. A. Leach (1998). "Mechanism of Inhibition of LDL Phospholipase A2 by Monocyclic- β -lactams. Burst Kinetics and the Effect of Stereochemistry." Biochemistry **37**(28): 10087-10093.

Tewson, T. J. and M. J. Welch (1979). "Preparation of fluorine-18 aryl fluorides: piperidyl triazenes as a source of diazonium salts." Journal of the Chemical Society, Chemical Communications(24): 1149-1150.

Theilmeyer, G., B. De Geest, P. P. Van Veldhoven, D. Stengel, C. Michiels, M. Lox, M. Landeloos, M. J. Chapman, E. Ninio, D. Collen, B. Himpens and P. Holvoet (2000). "HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE^{-/-} mice." FASEB J **14**(13): 2032-2039.

- Tjoelker, L. W., C. Wilder, C. Eberhardt, D. M. Stafforini, G. Dietsch, B. Schimpf, S. Hooper, H. Le Trong, L. S. Cousens, G. A. Zimmerman, Y. Yamada, T. M. McIntyre, S. M. Prescott and P. W. Gray (1995). "Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase." Nature **374**(6522): 549-553.
- Tran-Dinh, A., D. Diallo, S. Delbosc, L. M. Varela-Perez, Q. Dang, B. Lapergue, E. Burillo, J. Michel, A. Levoye, J. Martin-Ventura and O. Meilhac (2013). "HDL and endothelial protection." Br J Pharmacol **169**(3): 493-511.
- Tredwell, M., S. M. Preshlock, N. J. Taylor, S. Gruber, M. Huiban, J. Passchier, J. Mercier, C. Genicot and V. Gouverneur (2014). "A general copper-mediated nucleophilic ¹⁸F fluorination of arenes." Angew Chem Int Ed Engl **53**(30): 7751-7755.
- Tselepis, A. D. and M. John Chapman (2002). "Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase." Atheroscler Suppl **3**(4): 57-68.
- Tsimihodimos, V., A. Kakafika, A. P. Tambaki, E. Bairaktari, M. J. Chapman, M. Elisaf and A. D. Tselepis (2003). "Fenofibrate induces HDL-associated PAF-AH but attenuates enzyme activity associated with apoB-containing lipoproteins." Journal of Lipid Research **44**(5): 927-934.
- Tsimikas, S., L. D. Tsironis and A. D. Tselepis (2007). "New insights into the role of lipoprotein(a)-associated lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and cardiovascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(10): 2094-2099.
- Vaidyanathan, G. and M. R. Zalutsky (1992). "Labeling proteins with fluorine-18 using N-succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate." Int J Rad Appl Instrum B **19**(3): 275-281.
- van de Poll, S. W., K. Kastelijn, T. C. Bakker Schut, C. Strijder, G. Pasterkamp, G. J. Puppels and A. van der Laarse (2003). "On-line detection of cholesterol and calcification by catheter based Raman spectroscopy in human atherosclerotic plaque ex vivo." Heart **89**(9): 1078-1082.
- van der Valk, F. M., J. C. Sluimer, S. A. Voo, H. J. Verberne, A. J. Nederveen, A. D. Windhorst, E. S. Stroes, P. Lambin and M. J. Daemen (2015). "In Vivo Imaging of Hypoxia in Atherosclerotic Plaques in Humans." JACC Cardiovasc Imaging **8**(11): 1340-1341.
- Versteyleen, M. O., B. L. Kietselaer, P. C. Dagnelie, I. A. Joosen, A. Dedic, R. H. Raaijmakers, J. E. Wildberger, K. Nieman, H. J. Crijns, W. J. Niessen, M. J. Daemen and L. Hofstra (2013). "Additive value of semiautomated quantification of coronary artery disease using cardiac computed tomographic angiography to predict future acute coronary syndrome." J Am Coll Cardiol **61**(22): 2296-2305.
- Villanueva, F. S., R. J. Jankowski, S. Klibanov, M. L. Pina, S. M. Alber, S. C. Watkins, G. H. Brandenburger and W. R. Wagner (1998). "Microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1 bind to activated coronary artery endothelial cells." Circulation **98**(1): 1-5.
- Vogelstein, C. R. S. A. L. B. W. S. S. D. V. B. C. K. W. K. B. (2001). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* Chap 115. **McGraw-Hill Medical**: 6338.
- Walldius, G., I. Jungner, I. Holme, A. H. Aastveit, W. Kolar and E. Steiner (2001). "High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study." Lancet **358**(9298): 2026-2033.
- Wang, K., W. Xu, W. Zhang, M. Mo, Y. Wang and J. Shen (2013). "Triazole derivatives: a series of Darapladib analogues as orally active Lp-PLA2 inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **23**(10): 2897-2901.
- Wang, Y., W. Xu, H. Shao, Y. Xie and J. Wang (2011). "Design and Synthesis of Novel Pyrazole-based Lp-PLA2 Inhibitors." Chinese Journal of Chemistry **29**(10): 2039-2048.

- Watts, G. F., E. M. Ooi and D. C. Chan (2013). "Demystifying the management of hypertriglyceridaemia." Nat Rev Cardiol **10**(11): 648-661.
- Webb, N. R. (2008). "Getting to the core of atherosclerosis." Nat Med **14**(10): 1015-1016.
- White, H., C. Held, R. Stewart, D. Watson, R. Harrington, A. Budaj, P. G. Steg, C. P. Cannon, S. Krug-Gourley, J. Wittes, T. Trivedi, E. Tarka and L. Wallentin (2010). "Study design and rationale for the clinical outcomes of the STABILITY Trial (STabilization of Atherosclerotic plaque By Initiation of darapLadIb TherapY) comparing darapladib versus placebo in patients with coronary heart disease." Am Heart J **160**(4): 655-661.
- WHO. (2012, 2016). "Cardiovascular diseases (CVDs)." Fact sheet #317 Retrieved 09/05, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
- Wick, G., H. Perschinka and Q. Xu "Autoimmunity and atherosclerosis." American Heart Journal **138**(5): S444-S449.
- Wight, T. N. and S. Potter-Perigo (2011). "The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis?" Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **301**(6): G950-955.
- Wilensky, R. L., Y. Shi, E. R. Mohler, 3rd, D. Hamamdzcic, M. E. Burgert, J. Li, A. Postle, R. S. Fenning, J. G. Bollinger, B. E. Hoffman, D. J. Pelchovitz, J. Yang, R. C. Mirabile, C. L. Webb, L. Zhang, P. Zhang, M. H. Gelb, M. C. Walker, A. Zalewski and C. H. Macphee (2008). "Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development." Nat Med **14**(10): 1059-1066.
- Wilson, P. W., R. B. D'Agostino, D. Levy, A. M. Belanger, H. Silbershatz and W. B. Kannel (1998). "Prediction of coronary heart disease using risk factor categories." Circulation **97**(18): 1837-1847.
- Woolford, A. J. A., J. E. Pero, S. Aravapalli, V. Berdini, J. E. Coyle, P. J. Day, A. M. Dodson, P. Grondin, F. P. Holding, L. Y. W. Lee, P. Li, E. S. Manas, J. Marino, A. C. L. Martin, B. W. McClelland, R. L. McMEnamin, C. W. Murray, C. E. Neipp, L. W. Page, V. K. Patel, F. Potvain, S. Rich, R. A. Rivero, K. Smith, D. O. Somers, L. Trotter, R. Velagaleti, G. Williams and R. Xie (2016). "Exploitation of a Novel Binding Pocket in Human Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2) Discovered through X-ray Fragment Screening." Journal of Medicinal Chemistry **59**(11): 5356-5367.
- Wu, B., X. Pei and Z. Y. Li (2014). "How does calcification influence plaque vulnerability? Insights from fatigue analysis." ScientificWorldJournal **2014**: 417324.
- Xiangdong, L., L. Yuanwu, Z. Hua, R. Liming, L. Qiuyan and L. Ning (2011). "Animal models for the atherosclerosis research: a review." Protein Cell **2**(3): 189-201.
- Xie, Q., C. Ni, R. Zhang, L. Li, J. Rong and J. Hu (2017). "Efficient Difluoromethylation of Alcohols Using TMSCF2Br as a Unique and Practical Difluorocarbene Reagent under Mild Conditions." Angewandte Chemie International Edition **56**(12): 3206-3210.
- Xu, J., X. Lu and G. P. Shi (2015). "Vasa vasorum in atherosclerosis and clinical significance." Int J Mol Sci **16**(5): 11574-11608.
- Yale, H. L. (1959). "The Trifluoromethyl Group in Medical Chemistry." Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry **1**(2): 121-133.
- Yamamoto, M., K. Okamatsu, S. Inami, M. Takano, S. Yokoyama, T. Ohba, C. Ibuki, N. Hata, Y. Seino and K. Mizuno (2009). "Relationship between neointimal coverage of sirolimus-eluting stents and lesion characteristics: a study with serial coronary angiography." Am Heart J **158**(1): 99-104.
- Yan, S., H. Chai, H. Wang, H. Yang, B. Nan, Q. Yao and C. Chen (2005). "Effects of lysophosphatidylcholine on monolayer cell permeability of human coronary artery endothelial cells." Surgery **138**(3): 464-473.

- Ye, Y. and M. S. Sanford (2013). "Mild Copper-Mediated Fluorination of Aryl Stannanes and Aryl Trifluoroborates." Journal of the American Chemical Society **135**(12): 4648-4651.
- Ye, Y., S. D. Schimler, P. S. Hanley and M. S. Sanford (2013). "Cu(OTf)₂-mediated fluorination of aryltrifluoroborates with potassium fluoride." J Am Chem Soc **135**(44): 16292-16295.
- Ye, Y., S. D. Schimler, P. S. Hanley and M. S. Sanford (2013). "Cu(OTf)₂-Mediated Fluorination of Aryltrifluoroborates with Potassium Fluoride." Journal of the American Chemical Society **135**(44): 16292-16295.
- Yin, C., S. K. Mohanta, P. Srikakulapu, C. Weber and A. J. Habenicht (2016). "Artery Tertiary Lymphoid Organs: Powerhouses of Atherosclerosis Immunity." Front Immunol **7**: 387.
- Yuan, C., L. M. Mitsumori, M. S. Ferguson, N. L. Polissar, D. Echelard, G. Ortiz, R. Small, J. W. Davies, W. S. Kerwin and T. S. Hatsukami (2001). "In vivo accuracy of multispectral magnetic resonance imaging for identifying lipid-rich necrotic cores and intraplaque hemorrhage in advanced human carotid plaques." Circulation **104**(17): 2051-2056.
- Zalewski, A. and C. Macphee (2005). "Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(5): 923-931.
- Zhang, M. R. and K. Suzuki (2007). "[¹⁸F]Fluoroalkyl agents: synthesis, reactivity and application for development of PET ligands in molecular imaging." Curr Top Med Chem **7**(18): 1817-1828.
- Zhou, Y. J., J. Lv, K. Yu, J. P. Ma and D. S. Guo (2014). "Supramolecular structures in three thiouracil derivatives: 5,6-trimethylene-2-sulfanylidene-1,2-dihydropyrimidin-4(3H)-one, 2-(4-fluorobenzylsulfanyl)-5,6-trimethylenepyrimidin-4(3H)-one and methyl 2-([2-(4-fluorobenzylsulfanyl)-5,6-trimethylenepyrimidin-4-yl]oxy)acetate." Acta Crystallogr C Struct Chem **70**(Pt 4): 416-420.
- Zischler, J., N. Kolks, D. Modemann, B. Neumaier and B. D. Zlatopolskiy (2017). "Alcohol-Enhanced Cu-Mediated Radiofluorination." Chemistry **23**(14): 3251-3256.

Regioselectivity of Thiouracile Alkylation: Application to Optimization of Darapladib Synthesis

Florian Guibbal^{1*}, Sébastien Bénard², Jessica Patche¹, Vincent Meneyrol², Joël Couprie¹, Olivier Meilhac^{1,3*}, Emmanuelle Jestin^{1,2*}

(1) Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTROÏ), Saint-Denis de La Réunion, France

(2) Radiochimie et imagerie du petit animal (RIPA), CYclotron Réunion Océan Indien CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde

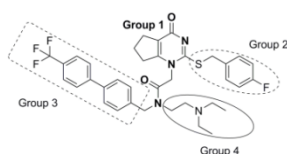
(3) CHU de La Réunion, Saint-Denis de La Réunion, France

ABSTRACT: Darapladib is one of the most potent Lp-PLA₂ (Lipoprotein-associated phospholipase A₂) inhibitor with an IC₅₀ of 0.25 nM. We demonstrate that a crucial step of Darapladib synthesis was not correctly described in the literature, leading to the production of wrong regioisomers. Moreover we show that the inhibitory activity is directly linked to the position on N1 since compounds bearing alkylation on different sites have potentially less interaction within the active site of Lp-PLA₂.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is characterized by an accumulation of lipids and leukocytes within the vascular wall of large arteries, leading to their occlusion and subsequent clinical events such as myocardial infarction and ischemic stroke. In western countries, atherosclerotic complications are responsible for about 50% of death¹. Hydrolysis of oxidized phospholipids in low density lipoproteins (LDL) mediated by lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂)² plays an important role in atheroma plaque development by promoting the recruitment of leukocytes. Clinical studies have shown that plasma Lp-PLA₂ levels were correlated with cardiovascular events³. In situ, the expression of Lp-PLA₂ was higher in carotid atherosclerotic plaques from symptomatic than asymptomatic patients. This enzyme thus became a particularly valuable biomarker candidate for assessment of the cardiovascular risk as well a promising therapeutic target⁴.

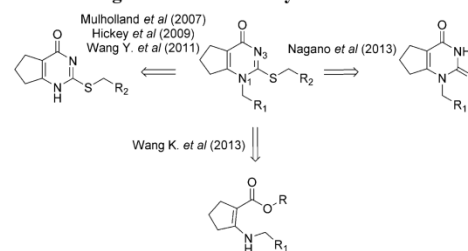
Chart 1. Four moieties of Darapladib involved in Lp-PLA₂ recognition.



GSK was among the first company to design Lp-PLA₂ inhibitors⁵. In 2003, GSK discovered a new and highly potent (IC₅₀ = 0.25 nM) candidate, named Darapladib (**14**)⁶ (Chart 1). After the publication of these results, many groups worked on the synthesis of analogs of **14**, in order to test their Lp-PLA₂ inhibitory effect in biological systems⁷ or even designed new classes of compounds⁸. Unfortunately, in coronary heart disease patients, **14** did not meet Phase III endpoints in clinical trials⁹.

However, recent studies have shown promising results using another Lp-PLA₂ inhibitor on the progression of Alzheimer disease¹⁰ or diabetic macular edema¹¹. Since Lp-PLA₂ inhibitors may be used to thwart the deleterious effect of this enzyme in different pathologies, we have synthesized our own series of inhibitors using the key structure of **14**. There are currently three different synthetic pathways reported to produce **14** (Chart 2). The first one, described in 2003 by Therkelsen *et al.*¹², uses a convergent method, ending with the pyrimidinone ring closure followed by substitution by the sulfur. It was then adapted to **14** in 2013 by Wang K. *et al.*¹³. Two other routes were described using a divergent approach. In 2011, Cardwell *et al.* patented a synthesis that allowed N1-alkylation of the thiouracile ring¹⁴. In 2013, Nagano *et al.* used this method for the synthesis of their analogs⁷, but the reproducibility was lower than that obtained by GSK.

Chart 2. Retrosynthetic pathways leading to alkylated thiouracile ring formation in the synthesis of **14.**



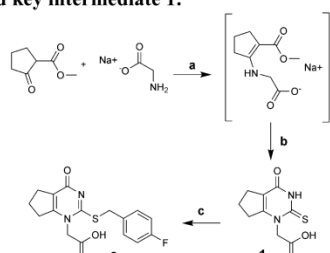
The second process developed by Hickey *et al.* involves thiouracile ring closure followed by the alkylation of the N1 position¹⁵. The literature is not consistent concerning the reaction conditions used to obtain this substitution. Whereas Shen *et al.* worked in refluxing THF¹⁶, Azad *et al.* and Wang Y. *et al.*

performed the alkylation in DMF^{17, 18}. To optimize every step of our synthesis, we looked for the best route as compared to the existing methods, tested in parallel. We demonstrate here that one of these three pathways leads to alkylation on the wrong site of the thiouracile ring.

RESULTS AND DISCUSSION

Divergent synthesis of **14** allows various changes of the original structure on all groups 1, 2, 3 or 4 (**Chart 1**). In this article, focus will be given to the cyclopentapyrimidine ring and fluorobenzyl sulfane moieties since diethylpropan-amine and trifluoromethyl-biphenyl moieties are obtained without ambiguity⁷. The first synthesis proposed is summarized in **Scheme 1**.

Scheme 1. Synthesis of Groups 1 and 2 using N1-substituted key intermediate 1.



Reagents and conditions: (a) NMP, 60°C; (b) NaSCN, TMSCl, 120°C, 58%; (c) 4-fluorobenzyl chloride, KOH, K₂CO₃, H₂O/IPA, 40°C, 60%.

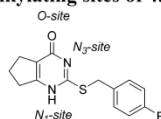
The condensation of the glycine sodium salt on methyl 2-oxocyclopentanecarboxylate leads to the non-isolated enamine that reacts with sodium thiocyanate to yield compound **1** (58%). Intermediate **2** is obtained via substitution on the free sulfur by 4-fluorobenzyl chloride in 60% yield.

However, this yield was not reproducible as also published by Nagano *et al.* that showed only a 10% yield for the first step in their analog synthesis.

The second route involves free N1 on the pyrimidinone ring in the first 2 steps as shown on **Scheme 2**. Thiourea was condensed on methyl 2-oxocyclopentanecarboxylate to give in a 65% yield thiouracile **3** which is reacted with 4-fluorobenzyl chloride in order to obtain the key intermediate **4** (92%).

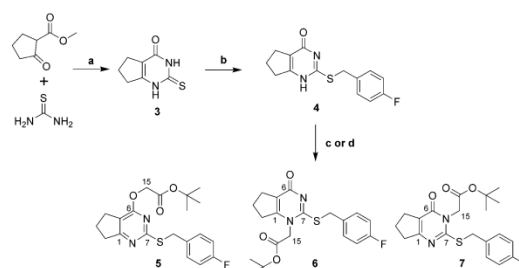
At this step, literature diverges regarding the conditions to perform the substitution on the N1 position (**Chart 3**).

Chart 3. Potential alkylating sites of 4.



Wang Y. *et al.* worked in DMF or MeCN using K₂CO₃ as a base and yielded a single regioisomer which they assigned to be N1-alkylated (≥90% yields for all analogs). Hickey *et al.* used less effective conditions, working in diluted DCM with DiPEA as the base and they assigned their major product as the N1-alkylated compound **6** in 37% yield. Both methods allowed acid **2** recovery via hydrolysis in high yields.

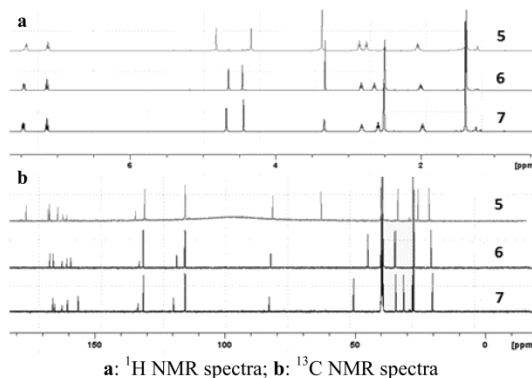
Scheme 2. Synthesis of Groups 1 and 2 involving differences in selectivity of compound (4)



Reagents and conditions: (a) DBU, MeCN, reflux, 65%; (b) K₂CO₃, KI, 4-fluorobenzylchloride, acetone, reflux, 92%; (c) tert-Butyl bromoacetate, K₂CO₃, DMF, 75°C, **5** only 96%; (d) tert-Butyl bromoacetate, DiPEA, DCM, reflux, mixture of **5** (7%), **6** (21%) and **7** (27%).

In order to optimize our synthesis, we compared both Wang and Hickey's methods (**Scheme 2**). Following the exact procedure by Wang Y. *et al.*, we obtained a product supposed to be the ester **6** in 96% yield whereas using Hickey's protocol to obtain the same compound, we recovered another product with 10% yield. Both esters obtained behaved differently on SiO₂ TLC (0.95 and 0.25 in 40/60 Hex/EtOAc for Wang Y. and Hickey's methods respectively). Moreover, ¹³C and ¹H NMR experiments supported the conclusion that both products were different (**Chart 4**). Indeed, in DMF at 75°C, we obtained the O-alkylated compound **5** whereas in DCM, the N1-alkylated desired product **6** was recovered. We then improved Hickey's conditions by working with refluxing DCM instead of room temperature (**Scheme 2**, condition d) and recovered **5**, **6** and **7** after purification (7%, 21% and 27%, respectively), allowing a better yield for compound **6**. Changing the leaving group for an iodine instead of a bromine at either 40°C (DCM) or 80°C (DCE) did not improve yields (12 and 14% respectively).

Chart 4. ¹H and ¹³C spectra in DMSO-d₆ of 5, 6 and 7.



HMBC experiments allowed us to unambiguously assign the 3 isomers **5**, **6**, **7** obtained in Hickey's method. The α-carbon of the ester (C₁₅) was identified in the isomers to be 63 ppm (O-CH₂), 50 ppm (N1-CH₂) and 45 ppm (N3-CH₂) for the isomers **5**, **6**, and **7** respectively. The C₁₅ was observed to couple in the HBMC spectra to C₁ in isomer **5**, C₁ and C₇ in isomer **6**, and C₆ and C₇ in isomer **7** (**Scheme 2**, also see supporting infor-

mation). In DMF at 75°C (Wang's method), since we only obtained compound **5** (but not compound **6**) in 96% yield, we then tried to make various changes on the base and alkylating agents in order to influence the regioselectivity of alkylation (see **Table 1**). However, no displacement of selectivity was observed and only *O*-alkylated compounds **5** and **9** were recovered. When moving from halogens to a tosylate (**10**) or a triflate (**11**), we also observed decreasing yields (entries **4** and **5**). Surprisingly, these results do not follow the general reactivity of leaving groups¹⁹.

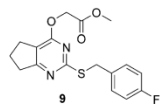
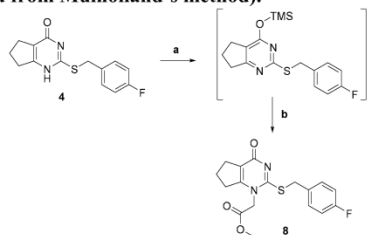


Table 1. Change in alkylating agent and base on substitution yields (via Wang's method).

4 + R-X		Base	DMF	75°C	O, N1 or N3		
Entry	Base	R-X	O	N1	N3		
1	K ₂ CO ₃		96(5)	0	0		
2	DiPEA		95(5)	0	0		
3	NMM		97(5)	0	0		
4	K ₂ CO ₃		21(9)	0	0		
5	K ₂ CO ₃		58(9)	0	0		

The thioaracile ring from compound **4** comprises a keto-enol tautomerism providing three potential alkylation sites. Low polar aprotic solvent (such as DCM) may favor *N*-alkylation whereas polar aprotic (such as DMF) gave exclusively the *O*-alkylated isomer. In 2004, Mulholland *et al.* patented an innovative method leading to selective *N1*-alkylation of the thioaracile ring²⁰. The 2 first steps used in our synthesis are depicted in **Scheme 3**.

Scheme 3. Selective N1-alkylation of the thioaracile ring (adapted from Mulholland's method).



Reagents and conditions: (a) saccharin, HMDS, DCM, reflux; (b) (trifluoromethanesulfonyloxy)-acetic acid methyl ester, DCM, reflux;

This method allows the formation of the silyl ether which protects the *O* and *N3*-alkylation sites. Using these experimental conditions, we obtained the desired compound **8** in 93% yield. However, this approach requires a triflate as a leaving group, which makes the synthesis more tedious since

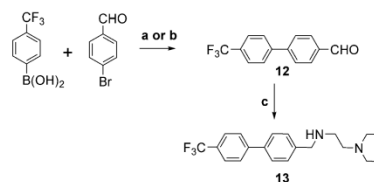
they are unstable. **Table 2** shows our attempts to change the leaving group or the solvent in Mulholland's conditions.

Table 2. Change in alkylating agent and solvent on substitution yields (via Mulholland's method).

4 + R-X		Saccharine	HMDS	O, N1 or N3			
Entry	Solvent/T°C	R-X	Solvent	T°C	O	N1	N3
1	DCM/40°C				0	0	0
2	DCM/40°C				0	0	0
3	DCM/40°C				0	0	0
4	DCM/40°C				0	93(8)	0
5	DMF/75°C				26(7)	0	26(5)

When the silyl ether is formed, if the leaving group was a tosylated alcohol (**11**) or an alkyl halide (entries **1**, **2** and **3**), the *N1*-alkylation product was not formed and only starting material was recovered. In order to obtain groups **3** and **4** of **14**, we synthesized **12** via Suzuki coupling in 89% yield (**Scheme 4**). We then optimized this step in water²¹ which allowed us to increase our yield up to 98% without chromatographic purification.

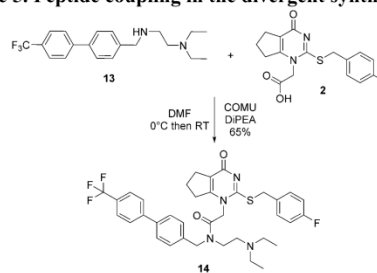
Scheme 4. Optimization of the synthesis of groups 3 and 4.



Reagents and conditions: (a) Pd(OAc)₂, TBAB, K₂CO₃, dioxane/water, 70°C, 89%; (b) Pd(OAc)₂, TBAB, Na₂CO₃, water, 150°C, 98%; (c) NaBH(OAc)₃, *N,N*-Diethylethylenediamine, DCM, 0°C then RT, 80%;

The subsequent reductive amination led to **13** recovery in 70% yield over 3 steps. We were then able to react **2** and **13** in a peptide coupling reaction²² forming **14** in a 65% yield after complete purification (**Scheme 5**).

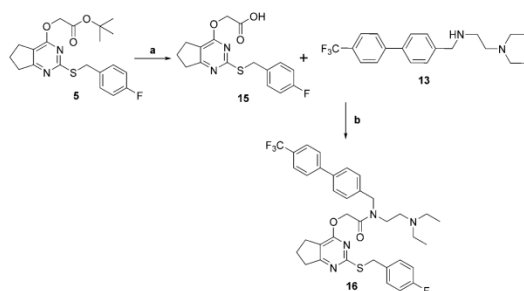
Scheme 5. Peptide coupling in the divergent synthesis of 14



As shown in **Scheme 6**, we also synthesized the *O*-alkylated Darapladib (**16**) in order to test its Lp-PLA₂ inhibitory activity. We were able to hydrolyze efficiently **5** in a 76% yield. The peptide coupling allowed **16** recovery in 80% yield.

Both Woolford *et al* and Liu *et al* showed that the thiouracile moiety and particularly the carbonyl oxygen forms hydrogen bonding with Leu153, Phe274 and Gln352 while the fluoro-phenyl moiety interacts with Leu107, Leu159, Ala355 and Phe357 in the active site of Lp-PLA₂^{23,24}. Group 4 brings lipophilic interactions with Phe125 along with π - π interaction that improve the already strong affinity towards Lp-PLA₂. However, in the case of *O*-alkylated products, the carbonyl oxygen may not be available to interact within the active site of the enzyme.

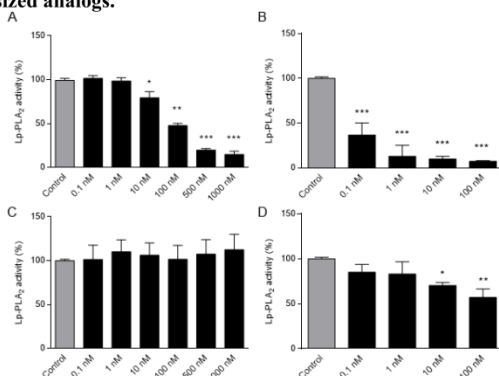
Scheme 6. Synthesis of 16.



Reagents and conditions: (a) TFA, DCM, RT, 76%; (b) COMU, DiPEA, DMF, 0°C then RT, 80%.

To test this hypothesis, we decided to compare the ability of **14**, **16**, and esters **5**, **6** to inhibit Lp-PLA₂ (**Figure 1**) according to the protocol described in the experimental section. **5** did not inhibit Lp-PLA₂ activity whereas **6** showed a dose-dependent inhibitory effect. This underlines the importance of the regioisomer since *O*-alkylated chains block the crucial interaction within the enzyme recognition site. The same effect can be observed with **14** and **16**.

Figure 1. Lp-PLA₂ activity test of **14** compared to 3 synthesized analogs.



A: (**6**), **B:** (**14**), **C:** (**5**), **D:** (**16**). Data are expressed as means \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. Statistical evaluation was performed by using one-way ANOVA and Tukey test (PRISM software). Significant differences were considered for p values inferior to 0.05. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 as compared to control.

CONCLUSIONS

Our work summarizes different methods to synthesize **14** and points out ambiguities in the literature during the alkylation of the thiouracile intermediate. We have shown that, based on our results in DMF, Wang Y. *et al.* and Azad *et al.* have most likely obtained the *O*-alkylated analogs instead of the *N1*-alkylated isomers. We showed that the method developed by GSK (Mulholland's method) is highly substrate-dependent and cannot be used without triflated alcohols.

14, **6** as well as **16** and **5** were tested for their ability to inhibit Lp-PLA₂. *In vitro* experiments demonstrated that the *O*-alkylated molecules did not modify Lp-PLA₂ activity compared to *N1*-alkylated compounds. We have described for the first time **6** as a potential Lp-PLA₂ inhibitor (IC₅₀ = 52 \pm 4 nM). Whereas its inhibitory activity is much lower than **14**, its affinity towards Lp-PLA₂ and biodistribution should be tested *in vivo*.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemistry. All reagents and solvents were purchased from commercial sources (Sigma-Aldrich and ACROS) and used as obtained. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded with a Bruker NMR spectrometer (600 MHz for ¹H and 150 MHz for ¹³C) and referenced to deuterium sulfoxide (DMSO-d₆) or deuterium chloroform (CDCl₃). Chemical shifts are expressed in ppm. The purities of all compounds were determined to be above 95% by HPLC (automate: Ultimate3000 by ThermoScientific, column: Gemini C18, eluent: buffer NH₄OAc 0.1M pH6 / MeCN).

2-(4-Oxo-2-thioxo-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl) acetic acid (1). Methyl 2-oxocyclopentanecarboxylate (1 eq, 17.5 mmol) was added to a suspension of glycine sodium salt (1 eq, 18.0 mmol) in NMP (18 mL). The reaction mixture was stirred for 2 hours at 60°C under argon. After cooling the mixture to room temperature, sodium thiocyanate (1.4 eq, 25 mmol) was added. Chlorotrimethylsilane (3.5 eq, 61.5 mmol) was then added dropwise and the reaction was stirred at 120°C for 3 hours. The reaction was cooled to 90°C and water (35 mL) was added. The suspension was slowly cooled to 4°C overnight and the product was collected by filtration. The product was washed with water (2 x 15 mL) and acetone (15 mL) then dried at 50°C to yield the title compound as an off white solid (1.4 g, 58%). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 12.55 (s, 1H), 4.92 (bs, 2H), 2.85 (m, 2H), 2.58 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H) 1.98 (quint, *J* = 7.8 Hz, 2H).

2-(2-(4-Fluorobenzylthio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta [d]pyrimidin-1-yl)acetic acid (2). Compound **1** (1 eq, 1.62 mmol) was stirred in a mixture of water (3 mL) and isopropyl alcohol (820 μ L). KOH aqueous solution (50% w/v, 1.9 eq, 3.08 mmol) was added followed by K₂CO₃ (0.15 eq, 0.24 mmol) and the reaction was heated to 40°C under stirring. 4-fluorobenzyl chloride (0.95 eq, 1.52 mmol) was then added and the reaction was stirred at 40°C for 3 hours. The reaction was cooled to room temperature and formic acid (0.5 eq, 0.8 mmol) was added to crystallize the product. After 1h, more formic acid (1.7 eq, 2.7 mmol) was slowly added and the reaction was stirred for an hour until crystallization was complete. The product was collected through filtration and washed twice with a 4:1 (v:v) mixture of water and isopropyl alcohol (1 mL) followed by isopropyl alcohol (1 mL). The product was stirred in ether overnight and filtered again. Product was dried at 50°C to obtain the title compound as a colourless solid (300 mg, 60%). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 12.54 (s, 1H), 7.45 (m, 2H), 7.11 (m, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.43 (s, 2H), 2.82 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.59 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.97 (quint, *J* = 7.3 Hz, 2H).

2-Thioxo-1,2,3,5,6,7-hexahydro-4H-cyclopenta[d]pyrimidin-4-one (3). Thiourea (1.5 eq, 21.1 mmol) was stirred in MeCN (40 mL). Methyl 2-cyclopentanone-carboxylate (1 eq, 14.1 mmol) was then added followed by DBU (1.2 eq, 16.9 mmol). The mixture was stirred at reflux (82°C) for 16h. The reaction was cooled to 0°C with an ice bath and water (30 mL) was added. The pH was adjusted to 1 using concentrated HCl and the suspension was stirred for 30 min. The solid thus obtained was filtered and washed thoroughly with water three times and dried at 55°C overnight to obtain the desired compound as a beige solid (1.54 g, 65%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2.67 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.46 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.94 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H).

2-((4-Fluorobenzyl)thio)-1,5,6,7-tetrahydro-4H-cyclopenta[d]pyrimidin-4-one (4) Compound **3** (1 eq, 2.97 mmol), potassium carbonate (1.5 eq, 4.46 mmol) and potassium iodide (0.1 eq, 0.297 mmol) were stirred in acetone (10 mL) at RT. 4-Fluorobenzyl chloride (1.05 eq, 3.12 mmol) was then added and the mixture was refluxed (54°C) for 1h. A portion of potassium carbonate (0.2 eq, 0.59 mmol) was poured into the flask and the reflux was maintained for 2h. After cooling to 0°C, the pH was adjusted to 1 using concentrated HCl. The reaction was stirred for 30min until the precipitation was complete. The solid was then washed three times with water (3 x 10 mL) then dried at 55°C overnight to obtain the desired compound as a colourless solid (758 mg, 92%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.44-7.42 (m, 2H), 7.11 (m, 2H), 4.35 (s, 2H), 2.74 (t, *J* = 7.5, 2H), 2.56 (t, *J* = 7.5, 2H), 1.93 (quint, *J* = 7.5, 2H).

Tert-butyl-2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetate (5):

Wang Y.'s method: Compound **4** (1 eq, 1.40 mmol), potassium carbonate (1.2 eq, 1.27 mmol) and tert-butyl bromoacetate (1.2 eq, 1.27 mmol) were dissolved in dry DMF (14 mL) and stirred at 75°C under argon for 18h. The reaction was monitored by TLC and was then dried under vacuum. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 Hex/EtOAc) to obtain the desired compound (R_f = 0.30) as a colorless oil (477 mg, 96%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.44 (m, 2H), 7.14 (m, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.34 (s, 2H), 2.86 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.06 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 176.2, 167.6, 167.2, 164.0, 161.3 (d, *J*_{CF} = 243 Hz), 134.2, 130.6 (d, *J*_{CF} = 9 Hz), 115.2 (d, *J*_{CF} = 21 Hz), 115.1, 81.5, 62.9, 33.5, 33.4, 27.7, 25.7, 21.5. HRMS (TOF MS ES+) calculated for C₂₀H₂₄FN₂O₃S [MH]⁺ requires 391.1492 found 391.1476.

Hickey's method: Compound **4** (1 eq, 0.73 mmol), DiPEA (1.2 eq, 0.87 mmol) and tert-butyl bromoacetate (1 eq, 0.73 mmol) were dissolved in DCM (6 mL) and stirred at 42°C under argon for 20h. The solution was poured on water and extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined extracts were dried, filtered and evaporated. The compounds were purified using column chromatography (silica gel) as described below:

Tert-butyl-2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetate (5): 98/2 Hex/EtOAc, (R_f = 0.30) as a colourless oil (21 mg, 7%). See NMR description above.

Tert-butyl-2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetate (6): 90/10 EtOAc/Hex, (R_f = 0.20) as a colourless solid (60 mg, 21%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.32 (m, 2H), 7.01 (m, 2H), 4.51 (s, 2H), 4.31 (s, 2H), 2.68 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.88 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.24 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 165.8, 165.1, 161.4 (d, *J*_{CF} = 289 Hz), 160.3, 156.2, 133.2 (d, *J*_{CF} = 4 Hz), 131.1 (d, *J*_{CF} = 9Hz), 119.6, 115.1 (d, *J*_{CF} = 27 Hz), 82.8, 50.4, 34.3, 31.3, 27.9, 27.4, 20.1.

Tert-butyl-2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-3H-cyclopenta[d]pyrimidin-3-yl)acetate (7): 90/10 Hex/EtOAc, (R_f = 0.30) as a colourless solid (76 mg, 27%). ¹H

NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.46 (m, 2H), 7.14 (m, 2H), 4.65 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 2.82 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.02 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.30 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 167.0, 165.8, 161.4 (d, *J*_{CF} = 291 Hz), 160.6, 159.0, 132.7 (d, *J*_{CF} = 4 Hz), 131.2 (d, *J*_{CF} = 10 Hz), 118.4, 115.2 (d, *J*_{CF} = 26 Hz), 82.2, 45.0, 34.7, 34.3, 27.5, 27.2, 20.7. HRMS (TOF MS ES+) calculated for C₂₀H₂₄FN₂O₃S [MH]⁺ requires 391.1492 found 391.1478.

Methyl-2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetate (8) Compound **4** (1 eq, 0.90 mmol), saccharin (0.01 eq, 0.009 mmol) were dissolved in DCM (2 mL) and stirred at 42°C. HMDS (0.6 eq, 0.54 mmol) was added and the mixture was stirred at reflux for 1h 30 min. (trifluoromethanesulfonyloxy)-acetic acid methyl ester (1.5 eq, 1.35 mmol) dissolved in 500 μL of DCM was slowly added over 10 min. The resulting solution was stirred at 42°C for 10h. 5 mL of HCl 1N was added followed by water (5 mL). The aqueous phase was extracted 3 times with EtOAc (3 x 5 mL). The combined organic extracts were washed with saturated NaHCO₃ (10 mL) then brine (10 mL). The organic layer was dried, filtered and solvents were removed. The paste was purified using column chromatography (silica gel, 95/5, EtOAc/MeOH) to obtain the desired compound (R_f = 0.15) as a colourless solid (291 mg, 93%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.46 (m, 2H), 7.14 (m, 2H), 4.80 (s, 2H), 4.42 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.83 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.58 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.97 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H).

Methyl-2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-6,7-dihydro-5H-cyclopenta [d]pyrimidin-4-yl)oxy)acetate (9) Compound **4** (1 eq, 0.18 mmol), potassium carbonate (1.2 eq, 0.22 mmol) and methyl 2-(tosyloxy)acetate (1.2 eq, 0.22 mmol) were dissolved in dry DMF (14 mL) and stirred at 75°C under argon for 18h. The reaction was monitored by TLC and the mixture was then dried under vacuum. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 Hex/EtOAc) to obtain the desired compound (R_f = 0.30) as a colorless oil (48 mg, 58%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.41 (m, 2H), 7.13 (m, 2H), 4.98 (s, 2H), 4.31 (s, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.85 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.01 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H).

Methyl 2-((trifluoromethyl)sulfonyloxy)acetate (10) To a solution of triflic anhydride (1 eq, 20 mmol) in DCM (10 mL) at 5°C under Argon was added over 30 min a solution of methyl glycolate (1 eq, 20 mmol) in DCM (5 mL). The clear solution was stirred at 0°C for 1h 30 min. The mixture was washed 5 times with water (15 mL x 5) and with saturated NaCl (10 mL) then dried filtered and evaporated to yield the desired product as a light brown oil (3.11g, 70%). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.92 (s, 2H), 3.87 (s, 3H).

Methyl 2-(tosyloxy)acetate (11) To a solution of methyl glycolate (1 eq, 5.55 mmol) in Et₂O (4 mL) was added TsCl (1 eq, 5.55 mmol). Et₃N (2 eq, 11.1 mmol) was then added at 0°C dropwise. The mixture was stirred at 0°C for 2h. Water (15 mL) was added and the solution was extracted twice with Et₂O (15 mL x 2). The combined organic extracts were dried, filtered and evaporated. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 Hex/EtOAc) to obtain the desired compound (R_f = 0.35) as a colourless solid (424 mg, 31%). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.84 (d, *J* = 6 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 6 Hz, 2H), 4.60 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.46 (s, 3H).

4'-(Trifluoromethyl)biphenyl-4-carbaldehyde (12) Bromobenzaldehyde (1 eq, 0.95 mmol), 4-(Trifluoromethyl) phenylboronic acid (1.1 eq, 1.05 mmol), palladium (II) acetate, TBAB (1 eq, 0.95 mmol) and K₂CO₃ (2.5 eq, 2.37 mmol) were dissolved in a water/dioxane mixture (1/1, v/v, 1.5/1.5 mL) which was further deoxygenated three times (vacuum/ar). Palladium (II) acetate (0.05 eq, 0.05 mmol) was then added to the solution and the reaction mixture was heated to 70°C under stirring and argon for 3h. Water was added followed by extraction with EtOAc (3 x 10mL).

The organic phases were washed with saturated NaCl then dried and filtered. After removal of the solvent, the remaining paste was purified using column chromatography (silica gel, 95/5 hexane/EtOAc) to obtain the desired compound (Rf = 0.35) as a colourless solid (210 mg, 89%). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 10.09 (s, 1H), 7.99 (m, 2H), 7.77 (m, 2H), 7.74 (m, 4H).

N1,N1-Diethyl-N2-((4'-(trifluoromethyl)biphenyl-4-yl)methyl)ethane-1,2-diamine (13) Compound 12 (1 eq, 1.01 mmol) and *N,N*-diethylethylenediamine (1.05 eq, 1.05 mmol) were dissolved in DCM (5 mL) at RT under argon. The clear solution was stirred during 1h followed by addition of NaBH(OAc)₃ (1.4 eq, 1.40 mmol) at 0°C. The reaction was then stirred at RT for 3h. Quenching with NaOH was followed by extraction using DCM (3 x 15mL). The combined organic phases were washed with brine then dried and filtered. After removal of the solvent, the orange oil was purified using column chromatography (silica gel, 85/15 DCM/MeOH) to obtain the desired compound (Rf = 0.25) as a yellow oil (310 mg, 80%). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.68 (s, 4H), 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 2.74 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.63 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.57 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.05 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

General procedure for the peptide coupling: the appropriate amine (1 eq) and acid (1 eq) were dissolved in DMF (0.1 M) then stirred with DIPEA (2 eq) for 10 min at RT. The reaction was then cooled with an ice bath to 0°C and COMU (1 eq) was added. The mixture was stirred at 0°C for 1h then the bath was removed and the reaction was allowed to reach RT and continued for 5h. The compound was extracted using EtOAc three times. The combined organic layers were then washed several times with saturated NaHCO₃. The resulting organic solution was dried, filtered and evaporated. The product was then purified using column chromatography with appropriate conditions indicated below.

N-(2-(Diethylamino)ethyl)-2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)-N-((4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)acetamide (14) From general procedure for peptide coupling. Purification: DCM/MeOH (90/10) Rf: 0.20 Aspect: pale yellow solid yield: 65%. ¹H NMR (CDCl₃) Mix of rotamers ratio (1/1) δ: 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.37 (m, 1H), 7.31 (m, 2H), 7.27 (m, 1H), 6.96 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.89 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.96 (s, 1H), 4.69 (m, 3H), 4.50 (s, 1H), 4.40 (s, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.30 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 2.88 (m, 1H), 2.82 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.77-2.75 (m, 4H), 2.59 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 2.52 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.10 (quint, *J* = 7.4 Hz, 1H), 2.04 (quint, *J* = 7.4 Hz, 1H), 1.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.98 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

2-(2-((4-Fluorobenzyl)thio)-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[d]pyrimidin-4-yl)oxy)acetic acid (15) Compound 5 (1 eq, 8.11 mmol) was dissolved in DCM (5 mL). TFA (20 eq, 162 mmol) was then added and the reaction mixture was stirred at RT under argon for 18h. The solution was vacuumed to dryness and the paste was then triturated in ether. The product was dried to yield the desired product as an off white solid (2.07 g, 76%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.42 (m, 2H), 7.12 (m, 2H), 4.88 (s, 2H), 4.33 (s, 2H), 2.84 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.05 (quint, *J* = 6.4 Hz, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 176.1, 169.5, 167.6, 164.1, 161.2 (d, *J*_{CF} = 290 Hz), 134.3 (d, *J*_{CF} = 4 Hz), 130.7 (d, *J*_{CF} = 10 Hz), 115.2 (d, *J*_{CF} = 25 Hz), 115.1, 62.3, 33.4, 33.3, 25.7, 21.4. HRMS (TOF MS ES+) calculated for C₁₆H₁₆FN₂O₃S [MH]⁺ requires 335.0866 found 335.0871.

Tert-butyl-2-(2-((4-fluorobenzyl)thio)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetate (16) From general procedure for peptide coupling. Purification: DCM/MeOH (98/2) Rf: 0.20 Aspect: off white solid yield: 80%. ¹H NMR (CDCl₃) Mix of rotamers ratio (1.3/0.7) δ 7.68 (m, 2H), 7.59 (m, 3.3H), 7.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.7H), 7.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 1.3H), 7.38-7.33 (m, 2H), 7.30 (m, 0.7H), 6.96 (t, *J* = 8.6 Hz, 1.3H), 6.91 (t, *J*

= 8.6 Hz, 0.7H), 5.15 (s, 0.7H), 5.08 (s, 1.3H), 4.68 (m, 2H), 4.35 (m, 1.3H), 4.30 (m, 0.7H), 3.63 (m, 1.3H), 3.35 (m, 0.7H), 2.96-2.80 (m, 7H), 2.62 (m, 0.7H), 2.52 (q, *J* = 6.8 Hz, 1.3H), 2.13 (quint, *J* = 7.4 Hz, 1.3H), 2.06 (quint, *J* = 7.4 Hz, 0.7H), 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 175.7, 175.6, 167.6, 167.5, 167.0, 164.4, 164.3, 161.3 (d, *J*_{CF} = 290 Hz), 161.2 (d, *J*_{CF} = 290 Hz), 143.8, 143.6, 138.1, 137.7, 137.3, 134.1 (m, CF), 130.9, 130.8 (d, *J*_{CF} = 11 Hz), 130.7 (d, *J*_{CF} = 11 Hz), 128.2, 127.7, 127.3 (d, *J*_{CF3} = 30 Hz), 127.1 (d, *J*_{CF3} = 30 Hz), 126.7 (d, *J*_{CF3} = 292 Hz), 125.7 (m, CF3), 115.2, 115.1 (d, *J*_{CF} = 26 Hz), 65.9, 63.2, 62.8, 47.9, 47.0, 46.8, 46.7, 33.6, 33.5, 33.4, 29.0, 25.8, 25.7, 21.4, 21.3. HRMS (TOF MS ES+) calculated for C₃₆H₃₉F₄N₄O₂S [MH]⁺ requires 667.2734 found 667.2730.

Biochemical assay for determination of Lp-PLA₂ inhibitory capacity. Low-density lipoproteins (LDL) containing Lp-PLA₂ enzyme were isolated from a pool of human EDTA-plasma from healthy volunteers by ultracentrifugation (Optima™ L-80 XP Ultracentrifuge, Beckman Coulter) as described before (Ortiz-Muñoz et al. 2009). Briefly, plasma density was adjusted to d=1.22 (4 mL) with solid KBr and overlaid with 3 mL KBr saline solution (d=1.063) and water (d=1, 3 mL). Ultracentrifugation was performed at 100 000g for 20 h at 10°C. The LDL fraction (top orange layer) was recovered as a single band, was rinsed with saline and concentrated using a centrifugal concentrating device (cutoff 10 kDa; Vivascience, Stonehouse, UK). KBr was eliminated by dialysis against saline. LDL concentration was estimated by Bradford assay for total protein quantification. Lp-PLA₂ activity was determined with a kit (PAF Acetylhydrolase activity assay Kit by CliniSciences) according to the manufacturer's instruction, using 2-thio platelet-activating factor as a substrate. The free thiols released by hydrolysis were detected using 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (TMB) transformed into 5-thio-2-nitrobenzoic acid, detectable at 412 nm by spectrophotometry. Increasing concentrations of (14) or analogs (0.1, 1, 10, 100, 500 and 1000 nM) were incubated with a 2 g/L LDL solution for 30 min before adding the substrate for 60 minutes and eventually the TMB. Optical density was followed at 412 nm and the inhibition capacity of the molecules tested was expressed as % of control containing LDL without inhibitors. Data are expressed as means ± SEM of three independent experiments performed in triplicate.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Phone: +(262) 262 938 800. E-mail: emmanuelle.jestin@univ-reunion.fr; florian.guibbal@gmail.com; olivier.meilhac@inserm.fr

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding Sources

This work was supported by the ERDF (European Regional development fund) number 33054 as well as a Philancia fund. Florian Guibbal was supported by a CIFRE doctoral grant n°2013/1522.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Fanny Lesage for her work on statistical analysis. This work has benefited from the facilities and expertise of the Small Molecule Mass Spectrometry platform of ICSN and NMR service (Centre de Recherche de Gif-www.icsn.cnrs-gif.fr).

ABBREVIATIONS

DiPEA (*N,N*-Diisopropylethylamine), Hex (Hexane).

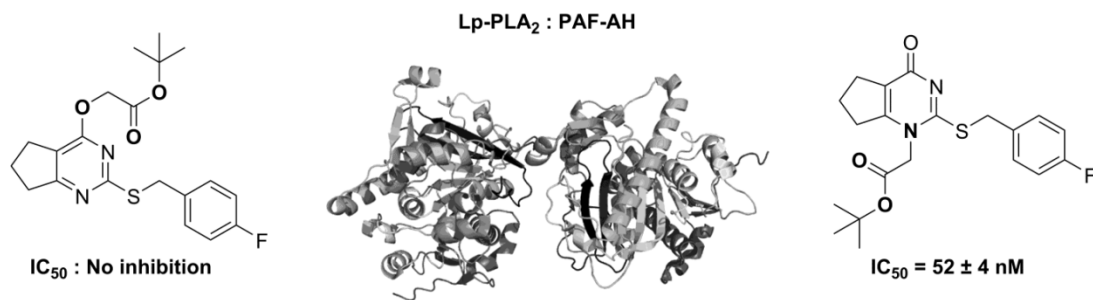
ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information Available: NMR spectra including 1D (^1H and ^{13}C) and 2D (HMBC), NMR attributions.

REFERENCES

- (1) Lusis, A. J. *Atherosclerosis*. *Nature* **2000**, *407*, 233-241.
- (2) Zalewski, A.; Macphee, C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 923-931.
- (3) Madjid, M.; Ali, M.; Willerson, J. T. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a novel risk marker for cardiovascular disease: a systematic review of the literature. *Tex. Heart Inst. J.* **2010**, *37*, 25-39.
- (4) Cai, A.; Zheng, D.; Qiu, R.; Mai, W.; Zhou, Y. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2): a novel and promising biomarker for cardiovascular risks assessment. *Dis. Markers* **2013**, *34*, 323-331.
- (5) Tew, D. G.; Boyd, H. F.; Ashman, S.; Theobald, C.; Leach, C. A. Mechanism of inhibition of LDL phospholipase A2 by monocyclic-beta-lactams. Burst kinetics and the effect of stereochemistry. *Biochemistry* **1998**, *37*, 10087-10093.
- (6) Blackie, J. A.; Bloomer, J. C.; Brown, M. J. B.; Cheng, H.-Y.; Hammond, B.; Hickey, D. M. B.; Ife, R. J.; Leach, C. A.; Lewis, V. A.; Macphee, C. H.; Milliner, K. J.; Moores, K. E.; Pinto, I. L.; Smith, S. A.; Stansfield, I. G.; Stanway, S. J.; Taylor, M. A.; Theobald, C. J. The identification of clinical candidate SB-480848: a potent inhibitor of lipoprotein-associated phospholipase A2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1067-1070.
- (7) Nagano, J. M.; Hsu, K. L.; Whitby, L. R.; Niphakis, M. J.; Speers, A. E.; Brown, S. J.; Spicer, T.; Fernandez-Vega, V.; Ferguson, J.; Hodder, P.; Srinivasan, P.; Gonzalez, T. D.; Rosen, H.; Bahnon, B. J.; Cravatt, B. F. Selective inhibitors and tailored activity probes for lipoprotein-associated phospholipase A2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 839-843.
- (8) Wang, K.; Xu, W.; Liu, Y.; Zhang, W.; Wang, W.; Shen, J.; Wang, Y. Design and synthesis of imidazole and triazole derivatives as Lp-PLA2 inhibitors and the unexpected discovery of highly potent quaternary ammonium salts. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1187-1192.
- (9) White, H.D., Held, C., Stewart, R., Tarka, E., Brown, R., Davies, R.Y., Budaj, A., Harrington, R.A., Steg, P.G., Ardissino, D., Armstrong, P.W., Avezum, A., Aylward, P.E., Bryce, A., Chen, H., Chen, M.F., Corbalan, R., Dalby, A.J., Danchin, N., De Winter, R.J., Denchev, S., Diaz, R., Elisaf, M., Flather, M.D., Goudev, A.R., Granger, C.B., Grinfeld, L., Hochman, J.S., Husted, S., Kim, H.S., Koenig, W., Linhart, A., Lonn, E., López-Sendón, J., Manolis, A.J., Mohler, E.R. 3rd, Nicolau, J.C., Pais, P., Parkhomenko, A., Pedersen, T.R., Pella, D., Ramos-Corrales, M.A., Rudra, M., Sereg, M., Siddique, S., Sinnaeve, P., Smith, P., Sritara, P., Swart, H.P., Sy, R.G., Teramoto, T., Tse, H.F., Watson, D., Weaver, W.D., Weiss, R., Viigimaa, M., Vinereanu, D., Zhu, J., Cannon, C.P., Wallentin, L. Darapladib for preventing ischemic events in stable coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 1702-1711.
- (10) Maher-Edwards, G.; De'Ath, J.; Barnett, C.; Lavrov, A.; Lockhart, A. A 24-week study to evaluate the effect of rilapladib on cognition and cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dementia: Transl. Res. Clin. Interventions.* **2015**, *1*, 131-140.
- (11) Chen, X.; Wang, K.; Xu, W.; Ma, Q.; Chen, M.; Du, L.; Mo, M.; Wang, Y.; Shen, J. Discovery of potent and orally active lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) inhibitors as a potential therapy for diabetic macular edema. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2674-2687.
- (12) Therkelsen, F. D.; Hansen, A. L.; Pedersen, E. B.; Nielsen, C. Multiple pathways in the synthesis of new annelated analogues of 6-benzyl-1-(ethoxymethyl)-5-isopropyluracil (emivirine). *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2908-2918.
- (13) Wang, K.; Xu, W.; Zhang, W.; Mo, M.; Wang, Y.; Shen, J. Triazole derivatives: a series of Darapladib analogues as orally active Lp-PLA2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2897-2901.
- (14) Cardwell, K. S.; Crawford, C. F.; Davies, S. H.; Wade, C. E. Novel processes. WO Patent 146,494, 2011.
- (15) Hickey, D. M. B. H.; Robert J.; Leach, C. A.; Pinto, I. L.; Smith, S. A.; Stanway, S. J. Pyrimidine compounds. US Patent 7,638,520, 2009.
- (16) Shen, J. S.; Wang, Y.; Wang, K. Azole heterocyclic compound, preparation method, pharmaceutical composition and use. US Patent 0,171,431, 2014.
- (17) Azad, M. A. K.; Jain, A. K.; Pandey, G.; Singh, K.; Prasad, M. Processes for the preparation of darapladib and its intermediates. Patent WO 087,239, 2015.
- (18) Wang, Y.; Xu, W. R.; Shao, H.; Xie, Y. F.; Wang, J. W. Design and synthesis of novel pyrazole-based Lp-PLA2 inhibitors. *Chin. J. Chem.* **2011**, *29*, 2039-2048.
- (19) Singh, M. S. *Advanced Organic Chemistry: Reactions And Mechanisms*. Dorling Kindersley (RS) Prentice Hall, **2004**, p 87.
- (20) Mulholland, K. R.; Ross, A. R.; Slater, G. R.; Smith, G. E. Process to prepare (1-carboxymethyl)-pyrimidinone compounds. US Patent 7,232,902, 2007.
- (21) Leadbeater, N. E.; Marco, M. Rapid and amenable Suzuki coupling reaction in water using microwave and conventional heating. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 888-892.
- (22) El-Faham, A.; Albericio, F. COMU: A third generation of uronium-type coupling reagents. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 6-9.
- (23) Woolford A. J.-A., Pero J. E., Aravapalli S., Berdini V., Coyle J. E., Day P. J., Dodson A. M., Grondin P., Holding F. P., Lee L. Y. W., Li P., Manas E. S., Marino J. P., Martin A. C. L., McClelland B. W., McMennamin R. L., Murray C. W., Neipp C. E., Page L. W., Patel V. K., Potvain F., Rich S. J., Rivero R. A., Smith K., Somers D. O., Trotter L., Velagaleti R., Williams G., Xie R. Exploitation of a novel binding pocket in human lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) discovered through X-ray fragment screening. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5356-5367.
- (24) Liu, Q. F.; Chen, X. D.; Chen, W. Y.; Yuan, X. J.; Su, H. X.; Shen, J. H.; Xu, Y. C. Structural and thermodynamic characterization of protein-ligand interactions formed between lipoprotein-associated phospholipase A2 and inhibitors. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5115-512.

TABLE OF CONTENTS GRAPHIC



Supporting Information

Regioselectivity of Thiouracile Alkylation: Application to Optimization of Darapladib Synthesis

Florian Guibbal^{1*}, Sébastien Bénard², Jessica Patche¹, Vincent Meneyrol², Joël Couprie¹, Olivier Meilhac^{1,3*}, Emmanuelle Jestin^{1,2*}

(1) Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTROI), Saint-Denis de La Réunion, France

(2) Radiochimie et imagerie du petit animal (RIPA), CYclotron Réunion Océan Indien CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde

(3) CHU de La Réunion, Saint-Denis de La Réunion, France

Correspondence should be addressed to :

emmanuelle.jestin@univ-reunion.fr ; florian.guibbal@gmail.com ; olivier.meilhac@inserm.fr

Contents

Figure S1. ¹H NMR spectra of compound **5** in DMSO-d₆.

Figure S2. ¹³C NMR spectra of compound **5** in DMSO-d₆.

Figure S3. HMBC NMR spectra of compound **5** in DMSO-d₆.

Figure S4. ¹H NMR spectra of compound **6** in DMSO-d₆.

Figure S5. ¹³C NMR spectra of compound **6** in DMSO-d₆.

Figure S6. HMBC NMR spectra of compound **6** in DMSO-d₆.

Figure S7. ¹H NMR spectra of compound **7** in DMSO-d₆.

Figure S8. ¹³C NMR spectra of compound **7** in DMSO-d₆.

Figure S9. HMBC NMR spectra of compound **7** in DMSO-d₆.

Figure S10. HMBC correlation expected for alkylation sites attribution for **5**, **6** and **7**.

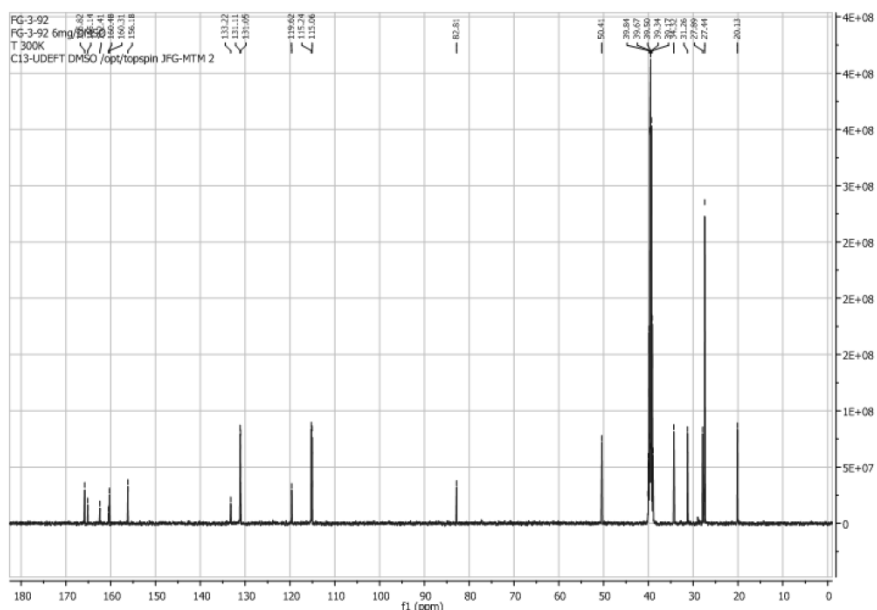


Figure S5. ^{13}C NMR spectra of compound **6** in DMSO-d_6 .

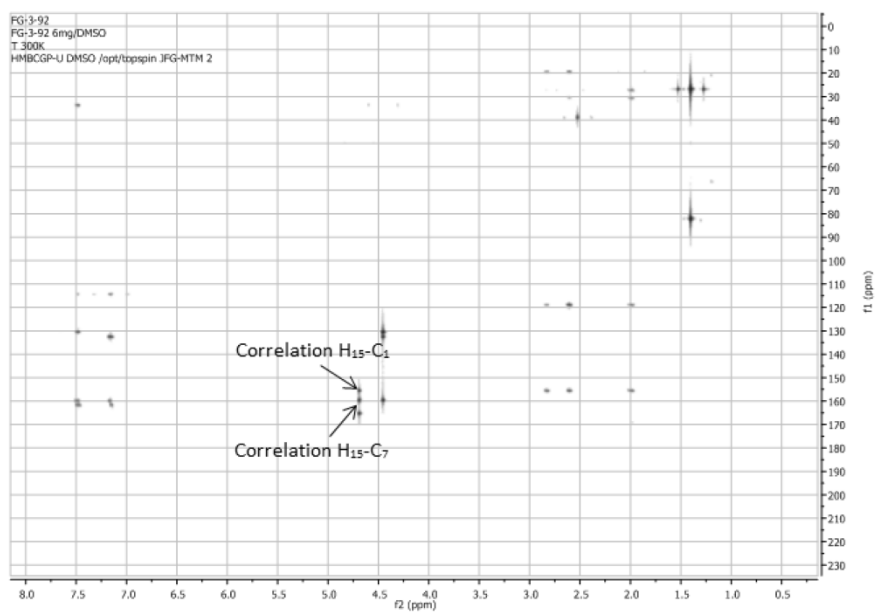


Figure S6. HMBC NMR spectra of compound **6** in DMSO-d_6 .

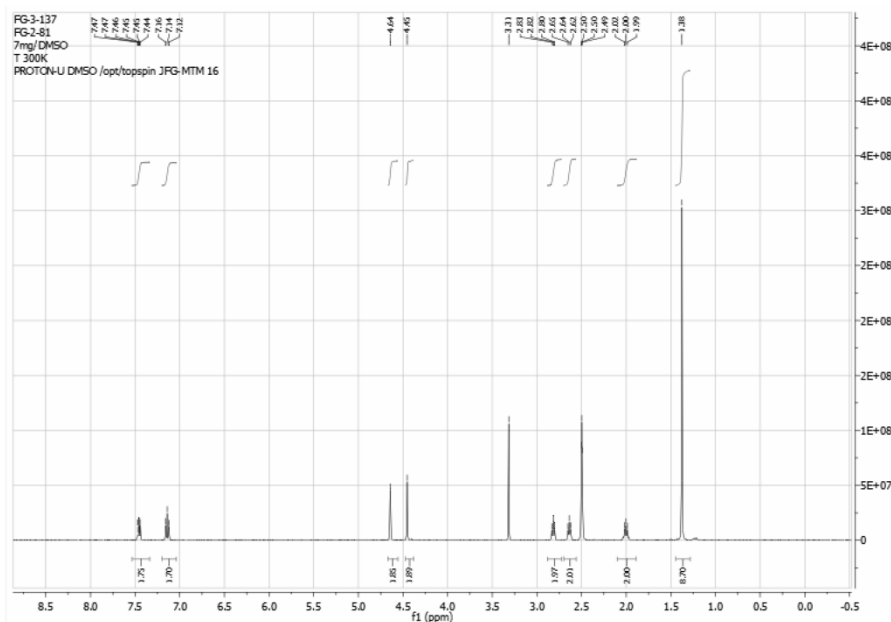


Figure S7. ^1H NMR spectra of compound 7 in DMSO-d_6 .

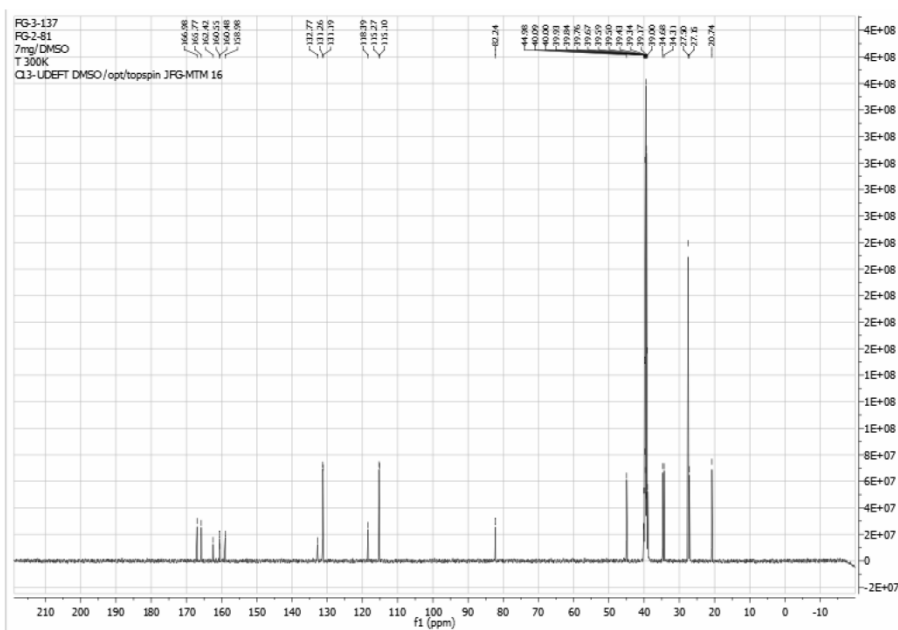


Figure S8. ^{13}C NMR spectra of compound 7 in DMSO-d_6 .

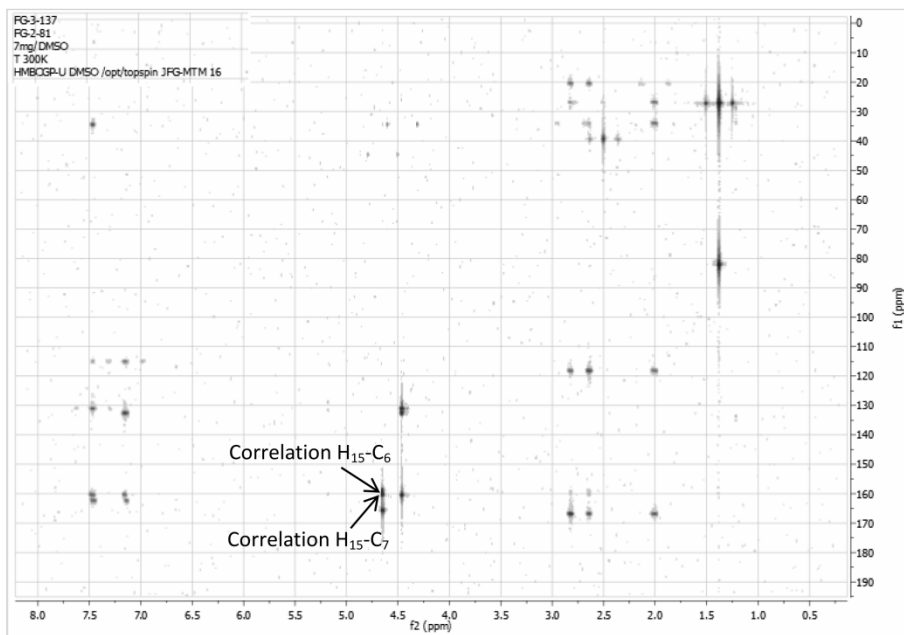
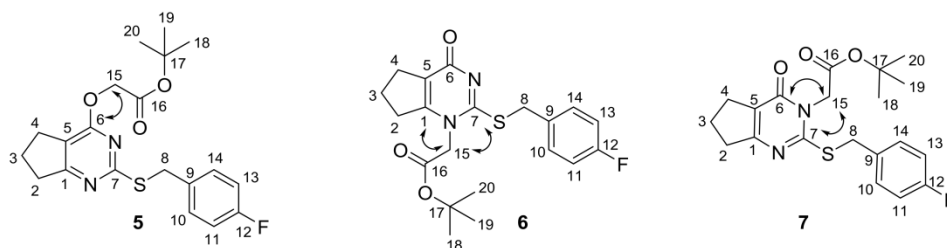


Figure S9. HMBC NMR spectra of compound **7** in DMSO- d_6 .



Compound	H ₁₅	C ₁	C ₅	C ₆	C ₇
5	4.82	167.2	115.1	164.0	167.6
6	4.51	156.2	119.6	165.1	160.3
7	4.65	167.0	118.4	159.0	160.6

Figure S10. HMBC correlation expected for alkylation sites attribution for **5**, **6** and **7**.

Development, Synthesis and ^{18}F -Labeling of an Lp-PLA₂ Ligand for PET Imaging of Atherosclerotic Plaques

Florian Guibbal, Vincent Meneyrol, Imade Ait-Arsa, Sébastien Bénard, Fanny Gimié, Jennyfer Yong-Sang, Ilya Khantalin, Ruben Veerapen, Emmanuelle Jestin and Olivier Meilhac*

Abstract: Atherosclerosis and its complications are a major health issue in industrialized countries. Lp-PLA₂ (Lipoprotein-associated phospholipase A₂) was demonstrated to be a potential risk prediction factor. Darapladib is one of the most potent Lp-PLA₂ (Lipoprotein-associated phospholipase A₂) inhibitor with an IC₅₀ of 0.25 nM. Using its affinity for Lp-PLA₂, we describe herein total synthesis of Darapladib radiolabeling precursor for PET imaging via an arylboronate moiety. The tracer thus obtained was used on mouse model of atherosclerosis (ApoE KO) and compared with the "gold standard" ^{18}F -FDG. ^{18}F -Darapladib showed a significant accumulation within mice aortas dissected out *ex vivo* compared to ^{18}F -FDG. Incubation of the radiotracer with human pathological carotids showed a strong accumulation within the carotids and points out its potential use in PET imaging.

In western countries, cardiovascular diseases and in particular atherosclerotic complications are responsible for about 50% of death.^[1] Atherosclerosis is characterized by an accumulation of lipids and inflammatory cells within the vascular wall of large arteries.^[2] In spite of important therapeutic progresses, fatal events due to atherosclerotic diseases remain a growing public health issue. Increasing efforts are made to find new non-invasive imaging tools to assess plaque localization, composition and vulnerability.^[3] Functional molecular imaging can enable early detection of disease and assessment of therapy efficacy. Positron Emission Tomography (PET) has become a powerful tool to diagnose disorders including cancer,^[4] neurological^[5] or heart disease.^[6] Fluorine-18 is the most widely used radioisotope for PET diagnosis due to its short half-life ($t_{1/2} = 109.8$ min), high resolution imaging and covalent radiolabeling.^[7] In nuclear medicine, ^{18}F -fluorodeoxyglucose

(^{18}F -FDG) is the "gold-standard" for PET diagnosis of cancer based on the increased metabolic demand of tumor cells. However, ^{18}F -FDG use for detection of atherosclerosis presents some limitations due to the heterogeneity of glucose consumption by vascular and inflammatory cells.^[8] There is an important need to be able to identify vulnerable plaques, prone to rupture. In atherosclerotic plaques, lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) is a well-established biomarker associated with the accumulation of both low-density lipoproteins (LDL) and inflammatory cells such as macrophages.^[9] This enzyme has been targeted by pharmaceutical groups that developed a specific and potent Lp-PLA₂ inhibitor: Darapladib (IC₅₀ = 0.25 nM),^[10] which failed to pass phase III clinical trials.^[11] Taking advantage of the strong affinity of Darapladib for Lp-PLA₂ and the fluorine already present in its structure, we used ^{18}F -Darapladib to target atherosclerotic plaques by PET imaging. Since the original structure of Darapladib (Figure 1) is identical, both physico-chemical properties and *in vivo* behavior will be preserved.

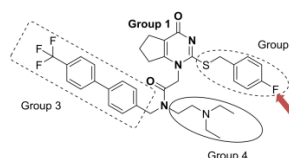


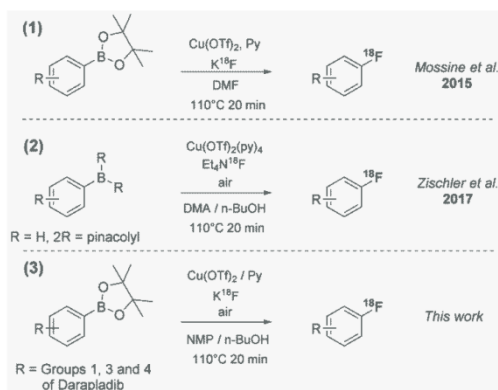
Figure 1. Four moieties of Darapladib involved in Lp-PLA₂ recognition. Groups 1 and 2 are mainly involved in binding to Lp-PLA₂ catalytic site. Red arrow: targeted site for ^{18}F radiolabeling.

As shown in Figure 1, in order to ^{18}F -radiolabel Darapladib on the aryl position of group 2, we aimed at synthesizing an arylboronate precursor. S_NAr reactions are most widely used method to produce ^{18}F -labeled arenes. There are two main strategies available to perform radiofluorination of arenes, devoid of strong electron withdrawing groups.^[12] The first involves the radiofluorination of strong electrophiles such as iodonium ylides^[13] or diaryliodonium salts.^[12] However, with electron neutral arenes, these reactions require high temperature and offer low radiochemical yields (RCY).^[13] To address these limitations, a second strategy was initiated by Gouverneur *et al.*^[14] This route targeted direct nucleophilic ^{18}F -fluorination of a wide range of arylboronate esters with [^{18}F]KF/K222 mediated by the commercially available copper complex [Cu(OTf)₂(Py)₄]. Sanford *et al.* then proposed a new

[*] F. Guibbal, J. Yong-Sang, Dr. E. Jestin, Dr. Olivier Meilhac
INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion
Océan Indien (DéTROI)
2, rue Maxime Rivière 97490 Sainte-Clotilde, Réunion, France
E-mail: olivier.meilhac@inserm.fr
MD. R. Veerapen
Clinique de Sainte-Clotilde
127, Route de Bois de Nèfles, Sainte-Clotilde, Réunion, France
MD. I. Khantalin
Centre hospitalier régional - Site Félix Guyon
Allée des Topazes, Réunion, France
V. Meneyrol, I. Ait-Arsa, Dr. S. Bénard, F. Gimié
GIP-CYROI
2, rue Maxime Rivière, Sainte-Clotilde, Réunion, France

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document

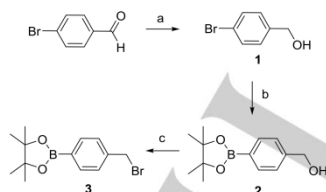
alternative that directly forms, *in situ*, the copper complex.^[15] This method allows more constant yields and radiofluorination of both boronates and boronic acid derivatives. We report herein the synthesis of ¹⁸F-radiolabeled Darapladib via alcohol-enhanced Cu-mediated radiofluorination^[16] (Scheme 1) in order to image atherosclerotic plaques.



Scheme 1. Copper-mediated radiofluorination of aryl boronates.

We used our previously reported Darapladib synthesis method in order to produce the radiofluorination precursor. Darapladib groups 3 and 4 were obtained as described before (ref).

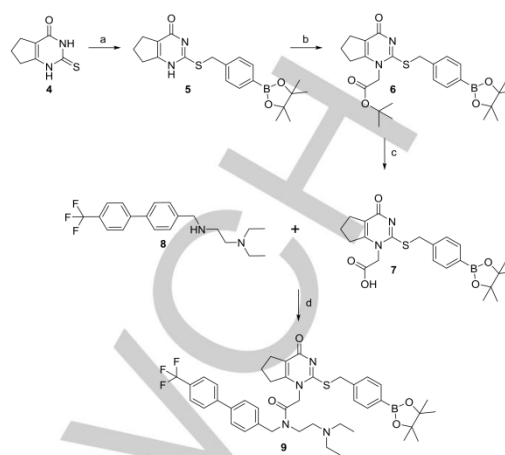
We first synthesized the arylboronate moiety that will allow ¹⁸F-labelling (Scheme 2).



Scheme 2. Synthesis of boronate derivative 3. Reagents and conditions: a) NaBH_4 , THF/MeOH 7/3, 0°C for 30 min; b) KOAc, bis(pinacolato)diboron, Pd(dppf)Cl₂, DMSO, 85°C for 18h; c) CBr₄, PPh₃, THF, rt for 18h.

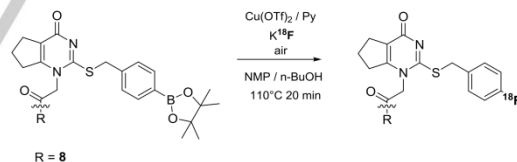
4-bromobenzaldehyde was reduced to the corresponding alcohol 1 in 91% yield. In a palladium-catalyzed coupling, the boronate moiety was inserted in 91% followed by bromination via CBr₄ to obtain 3 in 94% yield.

As shown in Scheme 3, we then synthesized the radiolabeling boronate precursor 9 of Darapladib.



Scheme 3. Synthesis of the radiolabeling precursor 9. Reagents and conditions: a) KI, K₂CO₃, 3, acetone, 54°C for 3h; b) tBu-4-bromoacetate, DIPEA, DCM, 40°C for 20h; c) TFA, TIS, DCM, rt for 20h; d) COMU, DIPEA, DMF, 0°C for 1h then rt for 12h.

Thiouracil 4 was synthesized as described previously (ref) and engaged in a substitution with alkylating agent 3 to afford compound 5 in 98% yield. Non-selective alkylation with tBu-4-bromoacetate, yielded the desired N1-ester 6 (26%) which was then hydrolyzed with TFA using a carbocation scavenger (TIS) to afford acid 7. Peptide coupling of 8 (previously described, ref) and 7 allowed us to obtain Darapladib-arylboronate radiolabelling precursor 9 in 70% yield.



Scheme 4. Radiolabelling of ¹⁸F-Darapladib.

The precursor 9 was then engaged in a copper-mediated aryl-fluorination (Scheme 4). Initially, we worked under Sanford *et al.* conditions in order to produce radiolabeled Darapladib. Elution of ¹⁸F from QMA cartridge was performed using a KOTf/K₂CO₃ aqueous solution (5 mg/50 µg in 550 µl). As described by Sanford *et al.*, the eluted fluorine was azeotropically dried (60°C then 120°C) since copper-mediated labeling is highly water sensitive. Reactions were carried out at 110°C under vacuum for 20 min. Since copper complex needs to be re-oxidized, air was injected 4 times during reaction course. The reaction mixture was then loaded on HPLC for purification and then formulated in water (5% EtOH content needed for

solubilization). As presented in Table 1, radiofluorination in DMF yielded the desired radiotracer in a very low yield (**entry 1**) and NMP did not provide any significant improvement (**entry 2**), both methods leading to a maximum of 1% recovery.

Table 1. Copper-mediated radiofluorination of **9**.

Entry	Solvents	Activity (MBq) ^[a]	RCY ^[b]
1	DMF	257	<1%
2	NMP	379	1%
3	NMP / n-BuOH	2310	6%
4	NMP / n-BuOH	1979	5%

[a] Before formulation process; [b] Decay corrected

In 2017, Zichler *et al.* proposed an alcohol-enhanced copper-mediated radiofluorination that replaced water azeotropic removal by n-BuOH elution of QMA-trapped ¹⁸F. They also showed that the use of NMP offered a better yield than DMF with 30% alcohol charge. In our hands, ¹⁸F- elution using n-BuOH did not offer sufficient yields (less than 20% of the starting activity). We thus kept our eluting conditions which offered a better ¹⁸F- yield (up to 95%). Compound **9** was dissolved in a mixture of NMP/n-BuOH (0.6/0.3) and was added to the reactor containing previously dried ¹⁸F-. This protocol allowed us to increase ¹⁸F-Darapladib radiofluorination up to 6% (**entries 3 and 4**).

¹⁸F-Darapladib purity was assessed by radio-HPLC. As depicted in Figure 2, radiolabeled Darapladib retention time was similar to that of ¹⁹F-Darapladib and no radioactive contaminants were detected. ¹⁸F-Darapladib stability (see supporting information) was evaluated in saline buffer at 0, 30 and 90 min and no degradation was observed.

In order to test the specificity of ¹⁸F-Darapladib, for imaging atherosclerotic plaques, it was tested in two mouse models and in comparison with ¹⁸F-FDG. Radiolabeled Darapladib or ¹⁸F-FDG (from 15 to 20 MBq) were injected via the caudal vein in 10 month-old ApoE KO mice (known to develop atheroma) and in melanoma B16-injected mice that developed tumors.

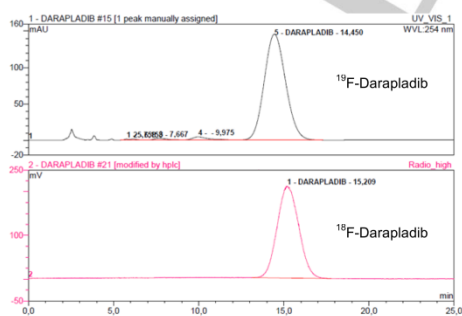


Figure 2. HPLC chromatogram showing ¹⁸F-Darapladib in comparison with ¹⁹F-Darapladib.

As expected, ¹⁸F-FDG provided an intense radiolabeling of tumors whereas ¹⁸F-Darapladib injection led to its accumulation in the liver, kidney and intestines. PET images are shown in Figure 3 and are representative of experiments performed at least in triplicate.

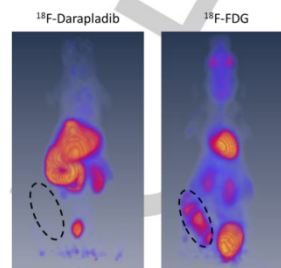


Figure 3. PET imaging of a tumor induced mice model using ¹⁸F-Darapladib or ¹⁸F-FDG.

Whereas ¹⁸F-FDG accumulated strongly within cancer cells, known to have a high rate of glucose uptake, ¹⁸F-Darapladib imaging was negative in tumors. Tumour cells are not reported to express Lp-PLA₂. Darapladib is known to bind to Lp-PLA₂ which is mainly associated with lipoproteins and produced by monocytes/macrophages.

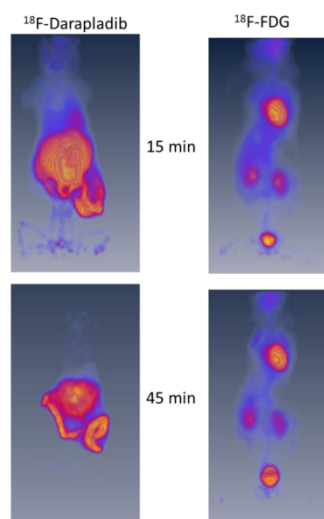


Figure 4. Whole body PET imaging of ¹⁸F-FDG and ¹⁸F-Darapladib in KO ApoE mice.

We then injected ApoE-deficient mice, in order to test ^{18}F -Darapladib ability to target atheromatous plaques, mainly composed of lipoprotein deposits and inflammatory cell accumulation. As shown in Figure 4, whole body imaging did not allow us to observe a potential ^{18}F -Darapladib positivity in the aorta, probably due to the high up-take by other organs, since the aorta follows the course of the spine.

^{18}F -Darapladib accumulated mainly in the liver, kidneys and intestines, suggesting a binding to LDL/HDL-associated Lp-PLA₂. These organs are involved in lipoprotein metabolism^[17]. In comparison, ^{18}F -FDG accumulated in high-glucose consuming organs (brain and heart) whereas kidneys and bladder were also labeled as they are involved in glucose catabolism.

In order to test ^{18}F -Darapladib accumulation within atheromatous vessels, heart and aorta were dissected out and imaged *ex vivo* (15 min PET acquisition). The aortas were then opened longitudinally, split and pinned onto a black wax surface, in order to expose the atheromatous plaques (en face preparation). *Ex vivo* PET images could be compared to macroscopic captures of atheromatous plaques (Figure 5).

As shown in Figure 5, no accumulation was observed in the aorta for either ^{18}F -Darapladib or ^{18}F -FDG in C57BL/6 mice, devoid of plaques. In contrast, a strong labeling of the aorta was observed in ApoE KO mice with ^{18}F -Darapladib but not with ^{18}F -FDG. This suggests that Darapladib may represent a specific radiotracer for detection of atheromatous plaques.

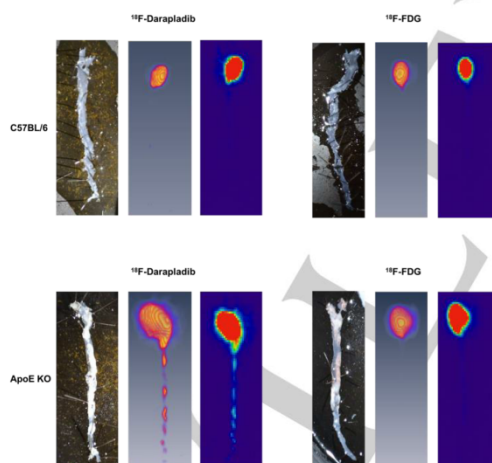


Figure 5. Aorta and heart PET imaging of ^{18}F -Darapladib and ^{18}F -FDG in ApoE^{-/-} and C57BL/6 mice.

In order to consolidate these results, we tested the ability of ^{18}F -Darapladib to label human carotid atherosclerotic samples. Both ^{18}F -Darapladib and ^{18}F -FDG were tested *ex vivo* in freshly obtained carotid endarterectomy samples.

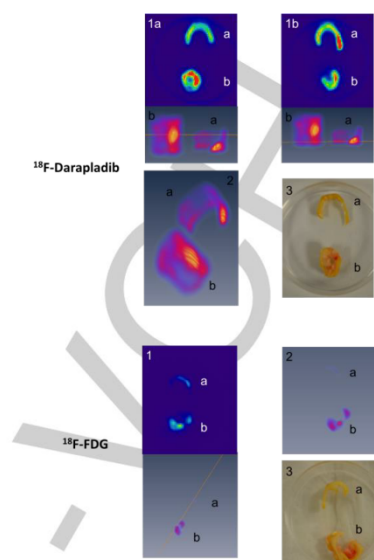


Figure 6. *Ex vivo* accumulation of ^{18}F -Darapladib compared to ^{18}F -FDG in human carotid endarterectomy samples. a) Non-complicated; b) Complicated. 1) Orthoslice associated with 3D view of the slice in orange; 2) 3D complete view; 3) macroscopic view.

As depicted in Figure 6, ^{18}F -FDG-incubated carotid samples displayed a moderate positivity only in the stenosing complicated plaque section. More interestingly, ^{18}F -Darapladib was able to significantly accumulate in both complicated and non-complicated parts of atherosclerotic carotid samples. This highlights the accumulation of Lp-PLA₂ associated with lipoproteins and monocyte/macrophages may represent an interesting target for imaging sub-clinical atherosclerosis.

In conclusion, we have described the synthesis of the radiolabeling precursor of Darapladib. Through aryl-boronate pathway, we were able to perform alcohol-enhanced copper-mediated ^{18}F -labelling of Darapladib and its purity was assessed by radio-HPLC. Moreover, PET studies performed with ^{18}F -FDG and ^{18}F -Darapladib showed the specificity of our labeled Lp-PLA₂ inhibitor for atherosclerotic plaques relative to ^{18}F -FDG that was specific for tumor detection. The suitability of ^{18}F -Darapladib for detection of Lp-PLA₂ within atheromatous plaques was confirmed in human samples. The use of ^{18}F -Darapladib for imaging in clinical settings could be of interest, in particular since phase I and II clinical trials tested its safety.

Acknowledgements

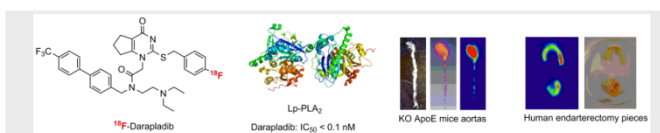
This work was supported by the ERDF (European Regional development fund) number 33054 as well as a Philancia fund. Florian Guibbal was supported by a CIFRE doctoral grant n°2013/1522. This work has benefited from the facilities and expertise of the Small Molecule Mass Spectrometry platform of ICSN and NMR service (Centre de Recherche de Gif-www.icsn.cnrs-gif.fr).

Keywords: atherosclerosis • imaging agents • positron emission tomography • radiochemistry • fluorine-18

- [1] WHO, in *Fact sheet #317*, Vol. 2017, 2012.
- [2] R. Ross, *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 115-126.
- [3] W. A. Zoghbi, *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.* **2014**, *10*, 139-145.
- [4] M. W. Saif, I. Tzannou, N. Makrilia, K. Syrigos, *Yale J. Biol. Med.* **2010**, *83*, 53-65.
- [5] G. Maher-Edwards, J. De'Ath, C. Barnett, A. Lavrov, A. Lockhart, *Alzheimer's Dementia: Transl. Res. Clin. Interventions* **2015**, *1*, 131-140.
- [6] S. Kajander, E. Joutsiniemi, M. Saraste, M. Pietilä, H. Ukkonen, A. Saraste, H. T. Sipilä, M. Teräs, M. Mäki, J. Airaksinen, J. Hartiala, J. Knuuti, *Circulation* **2010**, *122*, 603-613.
- [7] D. Le Bars, *J. Fluorine Chem.* **2006**, *127*, 1488-1493.
- [8] C. Pery, G. Meurette, C. Ansquer, E. Frampas, N. Regenet, *Gastroenterol. Clin. Biol.* **2010**, *34*, 465-474.
- [9] A. Cai, D. Zheng, R. Qiu, W. Mai, Y. Zhou, *Dis. Markers* **2013**, *34*, 323-331.
- [10] J. A. Blackie, J. C. Bloomer, M. J. B. Brown, H.-Y. Cheng, B. Hammond, D. M. B. Hickey, R. J. Iffe, C. A. Leach, V. A. Lewis, C. H. Macphée, K. J. Milliner, K. E. Moores, I. L. Pinto, S. A. Smith, I. G. Stansfield, S. J. Stanway, M. A. Taylor, C. J. Theobald, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1067-1070.
- [11] S. Investigators, H. D. White, C. Held, R. Stewart, E. Tarka, R. Brown, R. Y. Davies, A. Budaj, R. A. Harrington, P. G. Steg, D. Ardissino, P. W. Armstrong, A. Avezum, P. E. Aylward, A. Bryce, H. Chen, M. F. Chen, R. Corbalan, A. J. Dalby, N. Danchin, R. J. De Winter, S. Denchev, R. Diaz, M. Elisaf, M. D. Flather, A. R. Goudev, C. B. Granger, L. Grinfeld, J. S. Hochman, S. Husted, H. S. Kim, W. Koenig, A. Linhart, E. Lonn, J. Lopez-Sendon, A. J. Manolis, E. R. Mohler, 3rd, J. C. Nicolau, P. Pais, A. Parkhomenko, T. R. Pedersen, D. Pella, M. A. Ramos-Corrales, M. Ruda, M. Sereg, S. Siddique, P. Sinnaeve, P. Smith, P. Sirtara, H. P. Swart, R. G. Sy, T. Teramoto, H. F. Tse, D. Watson, W. D. Weaver, R. Weiss, M. Viigimaa, D. Vinereanu, J. Zhu, C. P. Cannon, L. Wallentin, *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 1702-1711.
- [12] E. A. Merritt, B. Olofsson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9052-9070; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9214-9234.
- [13] M. Tredwell, V. Gouverneur, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11426-11437; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11590-11602.
- [14] M. Tredwell, S. M. Preshlock, N. J. Taylor, S. Gruber, M. Huiban, J. Passchier, J. Mercier, C. Genicot, V. Gouverneur, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7751-7755; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7885-7889.
- [15] A. V. Mossine, A. F. Brooks, K. J. Makaravage, J. M. Miller, N. Ichiishi, M. S. Sanford, P. J. H. Scott, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5780-5783.
- [16] J. Zischler, N. Kolks, D. Modemann, B. Neumaier, B. D. Zlatopolskiy, *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 3251-3256.
- [17] M. Dave, M. Nash, G. C. Young, H. Ellens, M. H. Magee, A. D. Roberts, M. A. Taylor, R. W. Greenhill, G. W. Boyle, *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 415-430.

Entry for the Table of Contents

COMMUNICATION



Atherosclerosis is a cardiovascular pathology whose complications require strong imaging tools to prevent fatal events. Lipoprotein Associated Phospholipase A₂ is a risk factor predictor whose presence has been demonstrated in atherosclerosis. Radiofluorination of Darapladib (Lipoprotein Associated Phospholipase A₂ inhibitor) could allow specific targeting and could potentially allow PET imaging of atherosclerotic plaques.

Florian Guibbal, Vincent Menevrol,
Imade Ait-Arsa, Sébastien Bénard,
Fanny Gimie, Jennyfer Yong-Sang, Ilya
Khaltalin, Ruben Veerapen,
Emmanuelle Jestin and Olivier Meilhac*

Page No. – Page No.

Development, Synthesis and ¹⁸F-
Labeling of an Lp-PLA₂ Ligand for
PET Imaging of Atherosclerotic
Plaques

Supporting Information
©Wiley-VCH 2016
69451 Weinheim, Germany

Development, Synthesis and ^{18}F - Labelling of an Lp-PLA₂ Ligand for PET Imaging of Atherosclerotic Plaques

Florian Guibbal, Vincent Meneyrol, Imade Ait-Arsa, Sébastien Bénard, Fanny Gimié, Ruben Veerapen, Jennyfer Yong-Sang, Emmanuelle Jestin and Olivier Meilhac*

Abstract: Atherosclerosis and its complications are a major health issue in industrialized countries. Lp-PLA₂ (Lipoprotein-associated phospholipase A₂) was demonstrated to be a potential risk prediction factor. Darapladib is one of the most potent Lp-PLA₂ (Lipoprotein-associated phospholipase A₂) inhibitor with an IC₅₀ of 0.25 nM. Using its affinity for Lp-PLA₂, we describe herein total synthesis of Darapladib radiolabeling precursor for PET imaging via an arylboronate moiety. The tracer thus obtained was used on a mouse model of atherosclerosis (ApoE KO) and compared with the "gold standart" ^{18}F -FDG. ^{18}F -Darapladib showed a significant accumulation within mice aortas dissected out *ex vivo* compared to ^{18}F -FDG. Incubation of the radiotracer with human pathological carotids showed a strong accumulation within the carotids and points out its potential use in PET imaging.

DOI: 10.1002/anie.2016XXXXX

Supporting Information

Table of Contents

1. Chemical synthesis S2
2. Radiochemistry S5
3. *In vitro*, *in vivo* and *ex vivo* studies S8
4. Spectral analysis S12

Experimental Procedures

1. Chemical synthesis

1.1 General Materials and Methods

^1H , ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Advanced 3 spectrometer at 25 °C (600 MHz for ^1H and 150 MHz for ^{13}C). Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to trimethylsilane (TMS) and calibrated using solvent residual peaks in CDCl_3 ($\delta = 7.26, 77.16$) or $\text{DMSO}-d_6$ (2.50, 39.52). Coupling constant (J) are reported in Hertz (Hz) and refer to apparent and visible multiplicities. ^1H NMR multiplicities are reported as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, bs = broad signal.

Mass spectra were obtained from a MALDI-TOF for the high resolution mass spectra (HRMS) or from ABSciex® 3200 QTRAP model using electrospray infusion (ESI⁺ or ESI⁻). Flowrate of the injection syringe was 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

All HPLC Analysis were performed on a Thermofisher UPLC Ultimate 3000 system equipped with a UV-Vis spectrophotometer with diode array detector ; column: Gemini C18 250 \times 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex), isocratic elution: NH_4OAc 0.1M (pH 6)/MeCN 50/50; flow rate: 1 ml/min; room temperature.

1.2 Chromatography

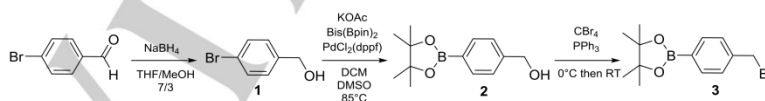
Thin layer chromatography (TLC) was carried out on silica gel coated Aluminium plates (Macherey-Nagel, SiG₆₀/UV₂₅₄) Preparative thin layer chromatography was carried out on 20 x 20 cm silica gel coated glass plates with a layer thickness of 0.5 or 1 mm.

1.3 Reaction conditions and solvents

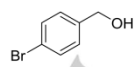
Reactions were carried out under argon atmosphere in air-dried glassware when needed. Sensitive liquids were transferred via syringe.

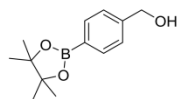
Unless otherwise noted, all reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification (Acros and Sigma-Aldrich). Pyridine and DiPEA were distilled prior to use or stored over KOH. All the solvents were purchased from Carlo-Erba. Solvents used for synthesis were dried on activated molecular sieve. Molecular sieve was activated by heating at 200°C over 12h under vacuum.

1.4 Synthesis of alkylating agent 3

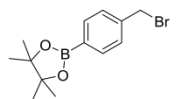


(4-bromophenyl)methanol (1)

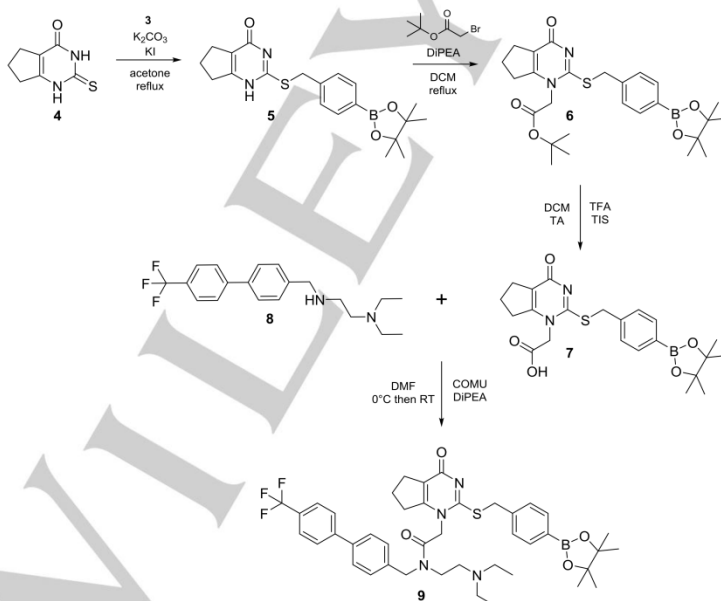
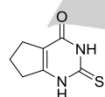
 Bromobenzaldehyde (1 eq, 5.40 mmol) was dissolved in THF/MeOH (7/3 v/v; 32/13 mL). The reaction was cooled to 0°C with an ice bath then sodium borohydride (1.5 eq, 8.10 mmol) was added with caution portion wise. The mixture was then stirred at rt for 30 min. HCl 1N was added to quench unreacted hydride. The reaction was extracted using DCM 3 times (3 x 10 mL) then the combined organic extracts were washed with water (15 mL) and brine (15 mL) followed by drying and filtering. Removal of the solvent under reduced pressure afforded the desired compound as a colourless solid (953 mg, 91%). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.48 (d, $J = 8.2$ Hz), 7.24 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.65 (s, 2H), 1.71 (bs, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 139.9, 131.8, 128.7, 121.6, 64.8.

(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)methanol (2)

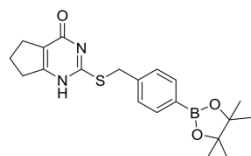
The compound **1** (1 eq, 0.53 mmol) was dissolved in DMSO (2 mL) followed by the addition of potassium acetate (3 eq, 1.59 mmol), bis(pinacolato)diboron (1.1 eq, 0.59 mmol) and Pd(dppf)Cl₂ (0.2 eq, 0.11 mmol). The mixture was deoxygenated by three successive argon bubbling/vacuum cycles. The reaction was then heated at 85°C under argon for 18h. Water (5 mL) was added and the resulting black solution was extracted 3 times with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic extracts were washed with brine (10 mL), dried, filtered and evaporated under vacuum. The resulting paste was purified using column chromatography (silica gel, 70/30 Hex/EtOAc) to afford the desired compound (R_f = 0.3) as a colourless oil (113 mg, 91%). ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 4.71 (s, 2H), 2.17 (bs, 1H), 1.34 (s, 12H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 144.1, 135.2, 126.2, 126.0, 84.0, 65.4, 25.0.

2-(4-(Bromomethyl)phenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane (3)

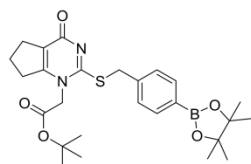
The compound **2** (1 eq, 5.72 mmol) was dissolved in THF (25 mL) followed by the addition of triphenylphosphine (2 eq, 11.4 mmol). The mixture was cooled to 0°C with an ice bath then tetrabromomethane (2 eq, 11.4 mmol) was carefully added portion wise. The reaction was stirred at rt for 18h. The solution was poured into water (30 mL) and extracted 3 times with EtOAc (3 x 30 mL). The combined organic layers were dried, filtered and evaporated under vacuum. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 99/1 Hex/EtOAc) to afford the desired compound (R_f = 0.2) as a colourless solid (1.6 g, 94%). ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.49 (s, 2H), 1.34 (s, 12H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 140.8, 135.4, 128.5, 126.3, 84.1, 33.5, 25.0.

1.5 Synthesis of radiolabelling precursors 9.**2-thioxo-1,2,3,5,6,7-hexahydro-4H-cyclopenta[d]pyrimidin-4-one (4)**

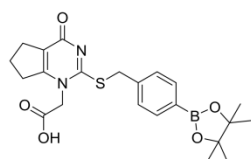
As previously described.

2-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzylthio)-6,7-dihydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-4(5H)-one (5)

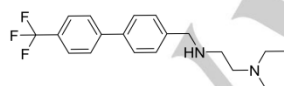
Compound **4** (1 eq, 0.48 mmol), potassium carbonate (1.5 eq, 0.72 mmol) and potassium iodide (0.1 eq, 0.048 mmol) were stirred in acetone (3 mL) at rt. Compound **3** (1.05 eq, 0.50 mmol) was then added and the mixture was refluxed (54°C) for 1h. An additional portion of potassium carbonate (0.2 eq, 0.14 mmol) was poured into the flask and the reflux was maintained for 2h. After cooling with an ice bath to 0°C, the pH was adjusted to 1 using concentrated HCl. The reaction was stirred for 30 min. The solid was then filtered and washed 3 times with water (5 mL x 3) then dried at 55°C to afford the desired compound as a colourless solid (170 mg, 98%). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 7.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.39 (s, 2H), 2.75 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.58 (m, 2H), 1.95 (quint, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.28 (s, 12H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 168.1, 159.1, 140.7, 134.5, 134.2, 128.6, 128.1, 119.9, 83.6, 34.3, 33.5, 26.7, 24.7, 20.5; HRMS (TOF MS ES⁺) calculated for C₂₀H₂₆BN₂O₃S [MH]⁺ requires 385.1757 found 385.1761.

tert-butyl 2-(4-oxo-2-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzylthio)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetate (6)

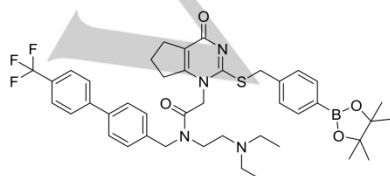
Compound **5** (1 eq, 3.72 mmol), DIPEA (1.2 eq, 4.47 mmol) and tert-butyl bromoacetate (1 eq, 3.72 mmol) were dissolved in dry DCM (21 mL) and stirred at 42°C under argon for 20h. The solution was poured into water (25 mL) and extracted with EtOAc 3 times (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried, filtered and evaporated under vacuum. The compound was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 EtOAc/Hex) to obtain the desired compound (R_f = 0.3) as a colourless solid (490 mg, 26%). ¹H-NMR (600 MHz) δ: 7.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 4.67 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 2.81 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.58 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.97 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.28 (s, 12H); ¹³C-NMR (600 MHz) δ: 165.9, 165.2, 160.3, 156.2, 140.2, 134.5, 128.6, 128.1, 119.7, 83.6, 82.9, 50.4, 35.2, 31.3, 27.9, 27.5, 24.6, 20.2; HRMS (TOF MS ES⁺) calculated for C₂₆H₃₆BN₂O₅S [MH]⁺ requires 499.2438 found 499.2426.

2-(4-oxo-2-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzylthio)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)acetic acid (7)

Compound **6** (1 eq, 0.54 mmol) was dissolved in DCM (10 mL). TFA (40 eq, 21.7 mmol) was then added followed by slow addition of triisopropylsilane (2.5 eq, 1.35 mmol) at 0°C. The reaction mixture was stirred at rt under argon for 20h. The clear solution was vacuumed to dryness and the compound was triturated in diethyl ether and dried to afford the desired compound as an off white solid (152 mg, 64%). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 7.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.68 (s, 2H), 4.45 (s, 2H), 2.82 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.58 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.96 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.28 (s, 12H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ: 168.2, 165.2, 160.3, 156.3, 140.1, 134.5, 128.6, 128.1, 119.6, 83.7, 49.9, 35.3, 31.2, 27.9, 24.6, 20.1; HRMS (TOF MS ES⁺) calculated for C₂₂H₂₈BN₂O₅S [MH]⁺ requires 443.1812 found 443.1815.

N1,N1-diethyl-N2-((4-(trifluoromethyl)biphenyl-4-yl)methyl)ethane-1,2-diamine (8)

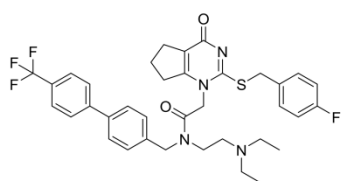
As previously described.

N-(2-(diethylamino)ethyl)-2-(4-oxo-2-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzylthio)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-1-yl)-N-((4-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)acetamide (9)

Compound **7** (1 eq, 0.11 mmol) and **8** (1 eq, 0.11 mmol) were dissolved in DMF (1.5 mL) then stirred with DIPEA (2 eq, 0.22 mmol) for 10 min at rt. The reaction was then cooled with an ice bath to 0°C and COMU (1 eq, 0.11 mmol) was added portionwise. The mixture was stirred at 0°C for 1h then the bath was removed and the reaction was allowed to reach rt and was continued for 12h. The compound was extracted using EtOAc 3 times

(3 x 5 mL). The combined organic layers were then washed several times with saturated NaHCO₃ (10 mL) until the washing solution was colourless. The resulting organic solution was dried, filtered and evaporated under vacuum. The remaining paste was purified using column chromatography (silica gel, 90/10 DCM/MeOH) or preparative chromatography to afford the desired compound (R_f = 0.35) as a light yellow solid (60 mg, 70%). ¹H-NMR (CDCl₃) *Mix of rotamers* ratio (0.85/0.15) δ 7.89-7.72 (m, 5H), 7.69-7.66 (m, 3H), 7.45-7.30 (m, 4H), 5.13 (s, 1.3H), 4.87 (m, 0.7H), 4.73 (s, 0.7H), 4.62 (s, 1.3H), 4.46 (m, 0.7H), 4.44-4.34 (m, 1.3H), 3.48-3.45 (m, 0.3H), 3.44-3.38 (m, 1.7H), 2.79-2.71 (m, 2H), 2.62-2.72 (m, 4H), 2.77-2.75 (m, 4H), 2.45-2.41 (m, 2H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.26 (s, 4H), 1.23 (s, 8H), 0.89 (t, J = 7.1 Hz, 4H), 0.84 (t, J = 7.1 Hz, 2H); ¹³C-NMR (CDCl₃) *Mix of rotamers* ratio (0.85/0.15) δ 167.8, 167.8, 167.6, 167.5, 162.7, 162.5, 145.8, 145.7, 140.0, 139.4, 136.6, 136.3, 130.7, 130.6, 130.3, 130.2, 129.6, 129.3 (m), 129.0, 127.8 (m), 121.5 (m), 118.2, 115.5, 85.6, 71.8, 60.9, 52.4, 52.0, 50.3, 50.1, 48.9, 48.7, 37.4, 31.0, 30.0, 26.6, 22.1, 13.6; HRMS (TOF MS ES⁺) calculated for C₄₂H₅₁BF₃N₄O₄S [MH]⁺ requires 775.3676 found 775.3690.

Darapladib (10)



As previously described.

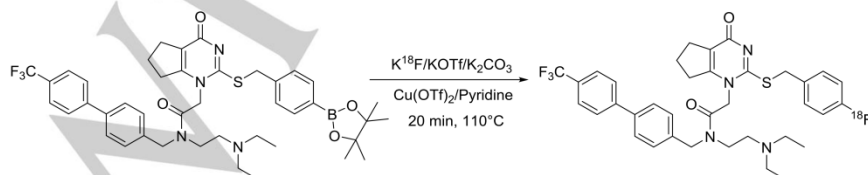
2. Radiochemistry

2.1 General Materials and Methods

All reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification (Acros and Sigma-Aldrich).

Radioisotope production. No-carrier-added fluorine-18 (half-life : 109.8 min) was produced via the [¹⁸O(p,n)¹⁸F] nuclear reaction by irradiation of a 1.5ml [¹⁸O]water (IBA CisBio) target with an 16.5 MeV proton beam on a cyclotron General Electrics PET trace 80 cyclotron (GE Healthcare, Sweden, Uppsala). The aqueous radioactive solution was transferred to an appropriate shielded hot cell (COMECER) using Helium pressure of 2 bars. Typical irradiation times were 60 min with a beam current of 40 μA, which yielded a [¹⁸F]-fluoride amount of about 70 GBq at end of bombardment.

Automated synthesis. All loading operations were conducted under an ambient atmosphere. A remote controlled GE TracerLab FX FN module was used for the automated radiolabeling experiments. Helium was used as a pressurizing gas during sample transfers. All the SEP-Paks cartridges were purchased from Waters Corporation. Prior to use, QMA-light Sep-Paks were flushed with 10 ml of ethanol, followed by 10 ml of 90 mg/ml potassium trifluoromethanesulfonate solution, and 10 ml of sterile water prior to use. Alumina N Sep-Paks were pre-conditioned with 10 ml of sterile water and C18 Sep-paks lights with ethanol (2 ml) and sterile water (10 ml). Preparative HPLC separations were all done on the GE Tracerlab FX FN module with a Gemini C18 5μm 250X10 mm column (Phenomenex), isocratic elution: NH₄OAc 0.1M (pH 6)/MeCN 50/50 (v/v); flow rate: 4.7 ml/min; room temperature; UV detection λ=254 nm. The HPLC Analysis were performed on a Thermofisher UPLC Ultimate 3000 system equipped with a UV spectrophotometer and a Berthold LB509 radioactivity detector, column: Gemini C18 250 × 4.6 mm, 5μm (Phenomenex), isocratic elution: NH₄OAc 0.1M (pH 6)/MeCN 50/50; flow rate: 1 ml/min; room temperature, UV detection λ=254 nm.



Scheme 1. Radiolabelling of ¹⁸F-Darapladib via alcohol enhanced copper mediated radiofluorination

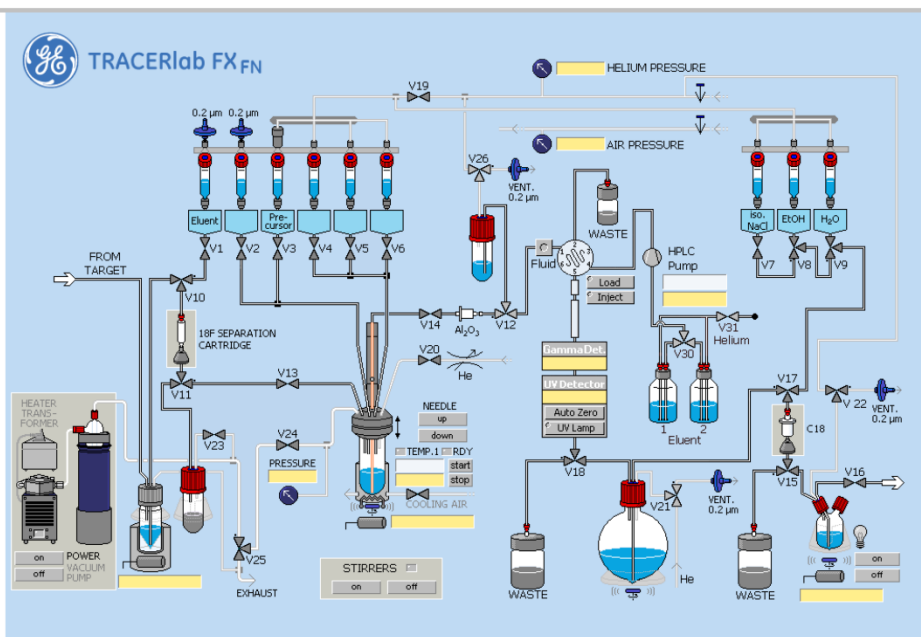


Figure 1. GE Tracerlab FX-FN module for the preparation of ^{18}F -Darapladib. V1: 5 mg KOTf + 50 μg K_2CO_3 in 550 μl water /V2: 1 ml ACN /V3: 4 mg precursor in 660 μl NMP + 330 μl n-BuOH + 9 mg $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ + 52 μl Pyridine /V4: 1.5 ml HPLC eluent/V5: 1.5 ml HPLC eluent /V6: empty /V7: 10 ml H_2O /V8: 0.7 ml EtOH/V9 : 9.3 ml H_2O / Dilution Flask: 60 ml H_2O .

2.2 Synthesis of K^{18}F

The 1.5 ml bolus of [^{18}O]water containing 70 GBq of [^{18}F] Fluoride was delivered to the synthesis module and trapped in a QMA-light Sep-Pak cartridge to remove the excess of [^{18}O]water and others impurities. The activity was released from the cartridge into the reaction vessel by the aqueous solution of $\text{KOTf}/\text{K}_2\text{CO}_3$. The 1 ml of acetonitrile from V2 was poured into the reaction vessel and the resulting solution was dried by azeotropic distillation to provide K^{18}F . This step was achieved by heating the reaction vessel to 120°C under vacuum during 6 min. Overall, around 70% of activity remained after this first step.

2.3 Automated synthesis of ^{18}F -Darapladib

During this second step of the automated program, the reactive mixture contained in vial 3 [precursor **9** (4 mg, 5 μmol , 0.005 M), $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (9 mg, 25 μmol , 0.02 M), Pyridine (52 μl , 644 μmol , 0.62 M) in a solution of NMP and n-BuOH] was poured into the reaction vessel with the dried K^{18}F by applying helium pressure. Before starting the radiolabeling of the precursor **9**, vial 2 was opened to bring some air into the reaction vessel. After shutting the valve of vial 2, the mixture was then stirred for 20 min at 120°C . The reaction vessel was cooled to 50°C with compressed air cooling before adding 1.5 ml of HPLC eluent from V4. The solution was sucked into the HPLC vial. The reaction vessel was finally cleaned by adding another portion of 1.5 ml of HPLC eluent and immediately transferred into the HPLC vial. The whole volume contained in the HPLC vial was sent into the preparative HPLC. The ^{18}F -Darapladib was collected into the dilution flask. At the end of the collection, the formulation step was started by passing through a Sep-Pak Plus C18 cartridge (Waters). The final activities were measured into a shielded glove box with dose calibrator SCINTIDOSE (Lerner Pax, Carquefou, France).

2.4 Quality control of ^{18}F -Darapladib

Quality controls were carried out before administration of the tracers. The batches were expected to be clear, colorless and free of particulates. pH were measured using pH paper strips. The pH values were expected to range between 4.5 and 8.5 due to the mice injection specifications. The radiochemical purities (RCP) and the specific activities (SA) were measured with the analytical HPLC system RCP were $94.5 \pm 0.7\%$ ($n = 10$) and SA were 10.1 ± 2.3 GBq/ μmol .

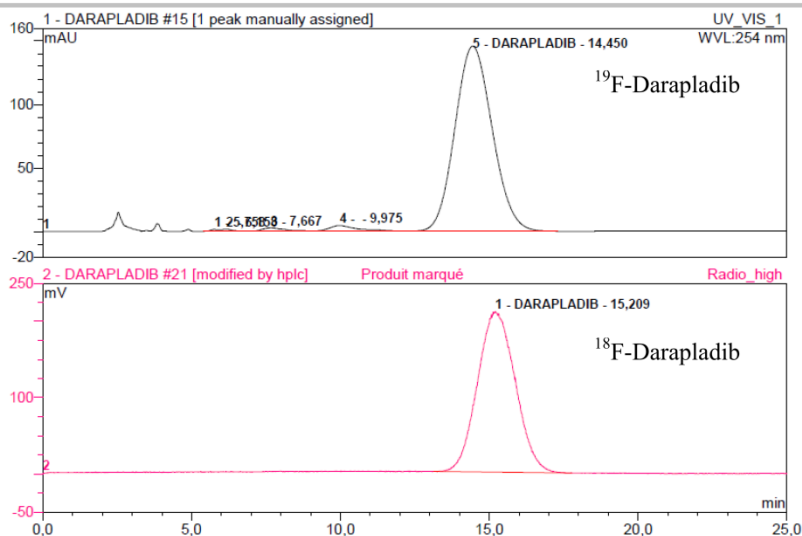


Figure 2. HPLC chromatogram of Darapladib compared with ^{18}F -Darapladib.

3. *In vitro*, *in vivo* and *ex vivo* studies

3.1 General Materials and Methods

All reagents and solvent were purchased from commercial suppliers and used without further purification (Acros and Sigma-Aldrich).

***In vitro* studies.** The stabilities in PBS buffer were analyzed by analytical HPLC [ThermoFisher UPLC Ultimate 3000 system equipped with a UV-Vis spectrophotometer with diode array detector; column: Gemini C18 250 × 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex), isocratic elution: NH_4OAc 0.1M (pH 6)/MeCN 50/50; flow rate: 1 ml/min; room temperature].

***In vivo* studies.** Apolipoprotein E-deficient mice (ApoE (-/-) or ApoE KO) and C57Bl6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Germain-sur-L'Arbresles). All the animals were maintained at a constant temperature (24 \pm 1 $^\circ\text{C}$) and a hygrometry between 55 to 65% under a 12 hour light/dark cycle, and permitted free access to food and water. Mice were handled and cared in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (national Research Council, 1996), the European Council Directive 2010/63/EU and approved by the Ethics Committee n $^\circ$ 114 for Animal Experimentation under the reference APAFIS#6271-201605021622180v2, under the supervision of authorized investigators.

PET imaging studies. Animals were scanned on a small-animal multimodal scanner (Triumph II, PET/SPECT/CT, Trifoil Imaging, Chatsworth, CA, USA) under anesthesia (isoflurane, 3% induction and 1.5% maintenance in air). Beforehand, mice were anesthetized with isoflurane (3%) and injected with the radiotracers in the caudal lateral vein using a 30-gauge catheter. ^{18}F -FDG doses were supplied by GIP CYROI (Sainte-Clotilde, Reunion Island). PET images were reconstructed using OSEM 3D method with the following parameters: field of view of 80 mm, 4 subsets, number of iterations: 20, first iteration to save: 20, iteration save step: 20.

3.2 Stabilities in buffer of ^{18}F -Darapladib

The stabilities of the labeled peptides in Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X pH 7.0 were performed at different time points (0, 30 min, 1h30) post synthesis at a temperature of 37 $^\circ\text{C}$.

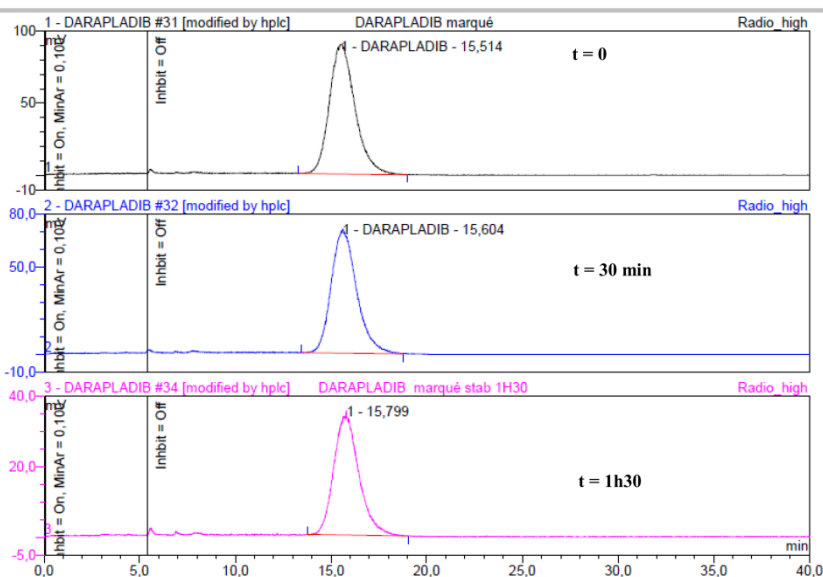


Figure 3. Phosphate buffer saline stability of ^{18}F -Darapladib at 0, 30 min and 1h 30 min.

3.2 *In vitro*, *in vivo* and *ex vivo* studies

3.2.1 Tumor model studies.

Cell culture

The tumor cell line B16 was purchased from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). This cell line was cultivated in RPMI1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 units/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin and 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone. Cells were maintained in a 5% CO_2 humidified atmosphere at 37°C. Cell viability was over 90%, as determined by trypan-blue staining. Immediately before implantation in mice, cells were centrifuged and adjusted to a concentration of 25×10^6 cells per ml in PBS 1X for subcutaneous injection.

Tumor Models. Six to eight weeks old mice C57Bl6 mice were used for implantation of B16 cells. A B16 tumor cell suspension containing 1×10^6 cells in a volume of 0.2 ml of a medium without serum solution was injected subcutaneously into right flank using a 27-gauge needle. The experiments were performed when tumors were 500 mm^3 (tumor volume measurement was performed by digital caliper).

PET Imaging. Injected doses of radiotracers ^{18}F -FDG or ^{18}F -Darapladib were 15 ± 5 MBq. The PET imaging distributions of mice were assessed at time intervals from 0 to 1h post-injection with four images of 15 minutes each.

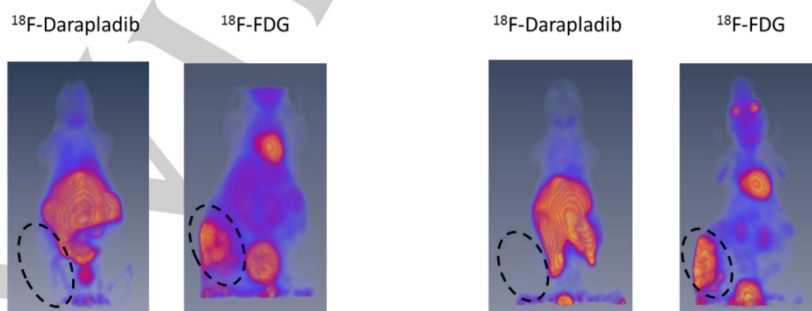


Figure 4. ^{18}F -Darapladib and ^{18}F -FDG injection in tumor induced mouse model (mouse B16 melanoma)

3.2.2 Atherosclerosis models studies.

Atherosclerosis Models. Apolipoprotein E-deficient mice (ApoE $-/-$) or ApoE KO) were chosen as models for atherosclerosis studies. Mice were bred in the animal facility until the age of 18-20 months for the study. 5 ApoE KO mice were used for each radiotracer. To compare with normal mice, 5 C57BL6 mice were used for each radiotracer.

PET Imaging. Injected doses of radiotracers ^{18}F -FDG or ^{18}F -Darapladib were 15 ± 5 MBq. The PET imaging distributions of mice were assessed at time intervals from 0 to 1h post-injection with four images of 15 minutes each.

Biodistributions. At the end of the PET imaging acquisitions, the animals were sacrificed by cardiac puncture under anesthesia (isoflurane, 3% induction and 1.5% maintenance in air). The heart and aorta were removed and isolated, blood-flushed and placed under the multimodal imager. A PET *ex vivo* acquisition of 15 minutes was performed specifically on these tissues to measure the activity associated to the atherosclerosis plaques. At the end of this acquisition, all the organs were collected and placed into glass tubes for the γ -counter measurements.

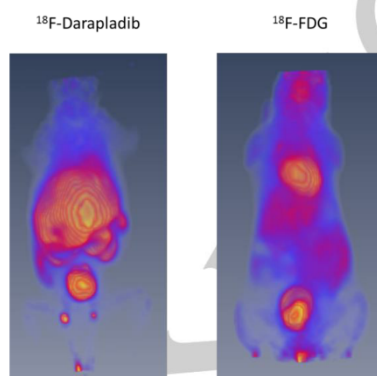


Figure 5. ^{18}F -Darapladib and ^{18}F -FDG injection in C57BL/6 mice.

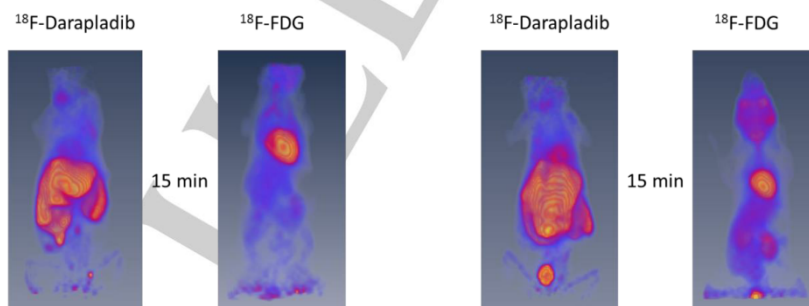


Figure 6. ^{18}F -Darapladib and ^{18}F -FDG injection in KO ApoE mice. Images at 15 min are representative of 30, 45 and 1h acquisitions images.

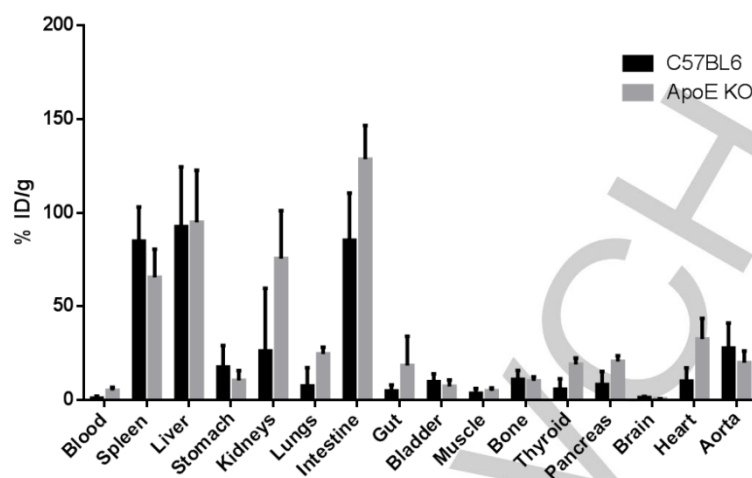


Figure 7. ¹⁸F-Darapladib biodistribution in KO ApoE and C57BL/6 mice. Data are expressed as means \pm SEM of three independent experiments. Statistical evaluation was performed by using one-way ANOVA and Tukey test (PRISM software). No significant differences were observed.

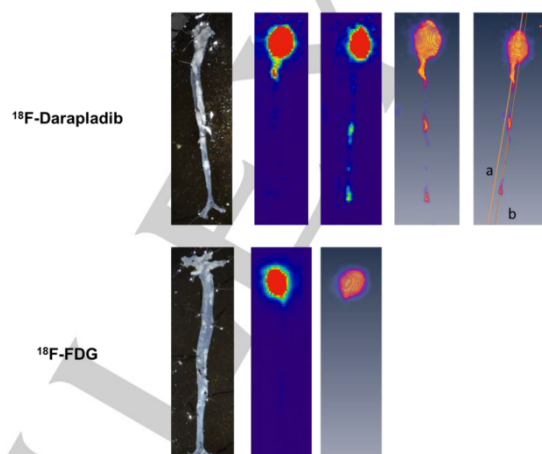


Figure 7. ¹⁸F-Darapladib and ¹⁸F-FDG in KO ApoE mice aortas and heart. Results are representative of experiments performed at least in triplicate.

3.2.3 Human endarterectomy pieces studies.

Endarterectomy samples. Freshly obtained carotid samples were incubated with 30 ± 5 MBq of ¹⁸F-Darapladib or ¹⁸F-FDG for 1h at 37°C. Samples were washed consecutively with saline 3 times then were dried before performing imaging studies.

PET Imaging. Incubated doses of radiotracers ¹⁸F-FDG or ¹⁸F-Darapladib were 30 ± 5 MBq. The PET imaging acquisitions carotids were assessed at 1h post-incubation with a 15 minutes acquisition.

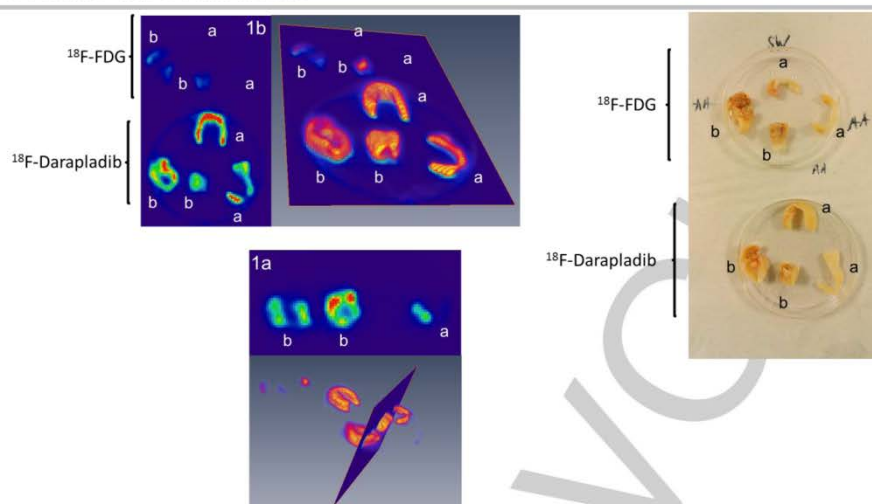
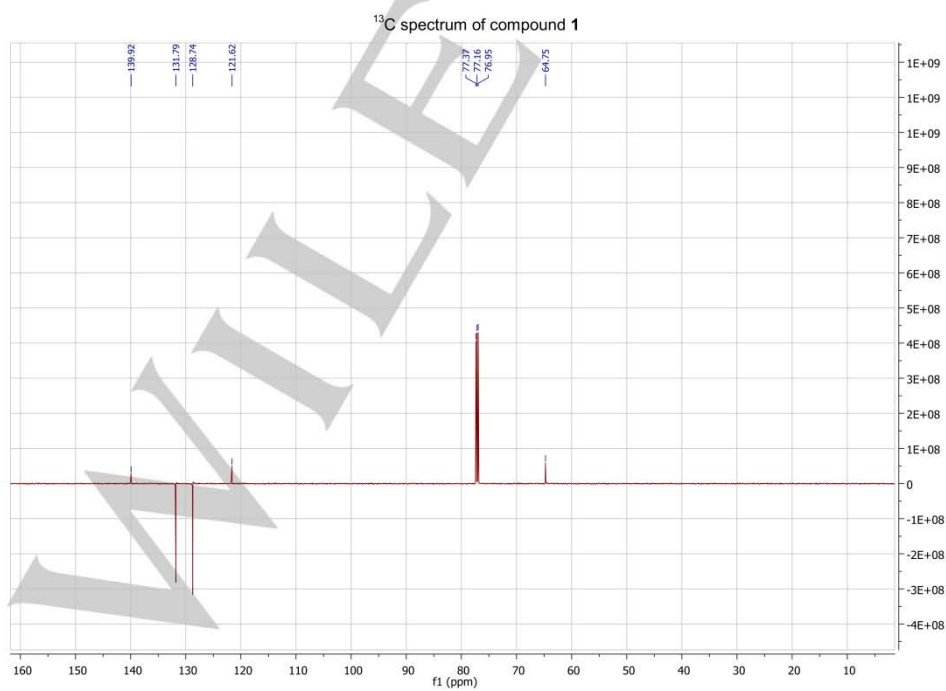
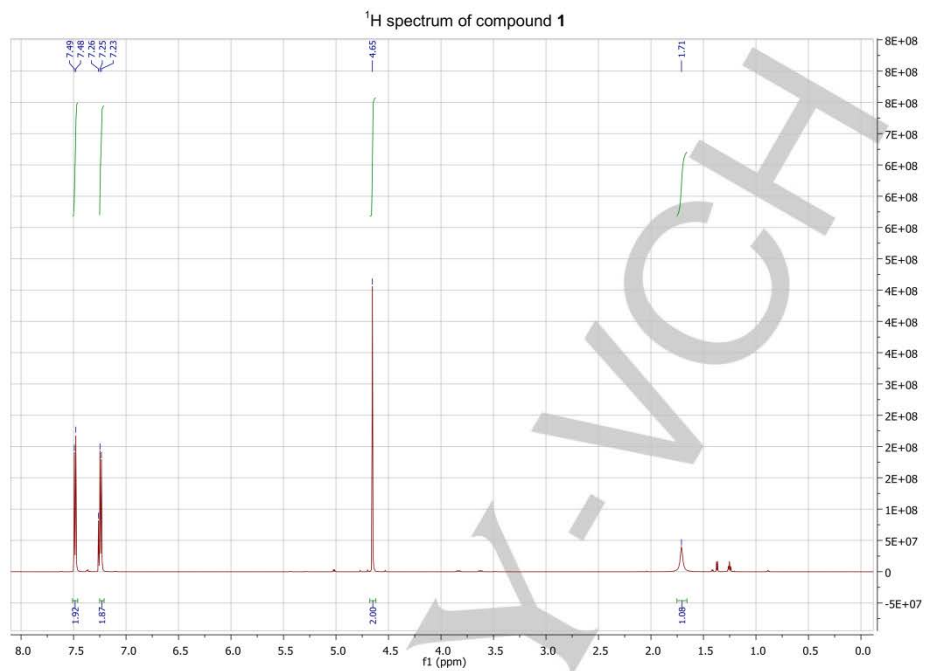
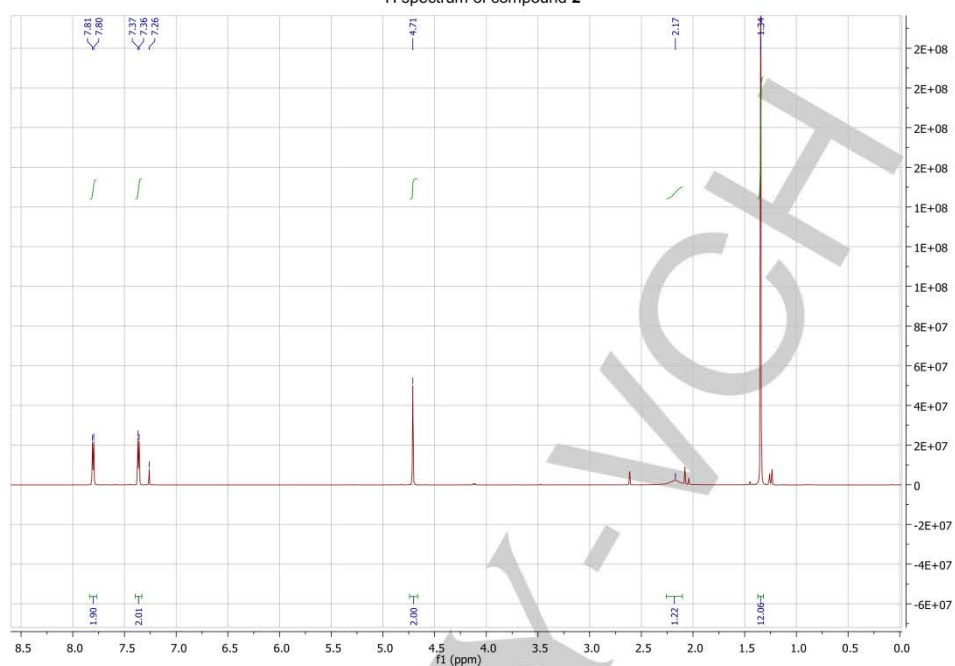
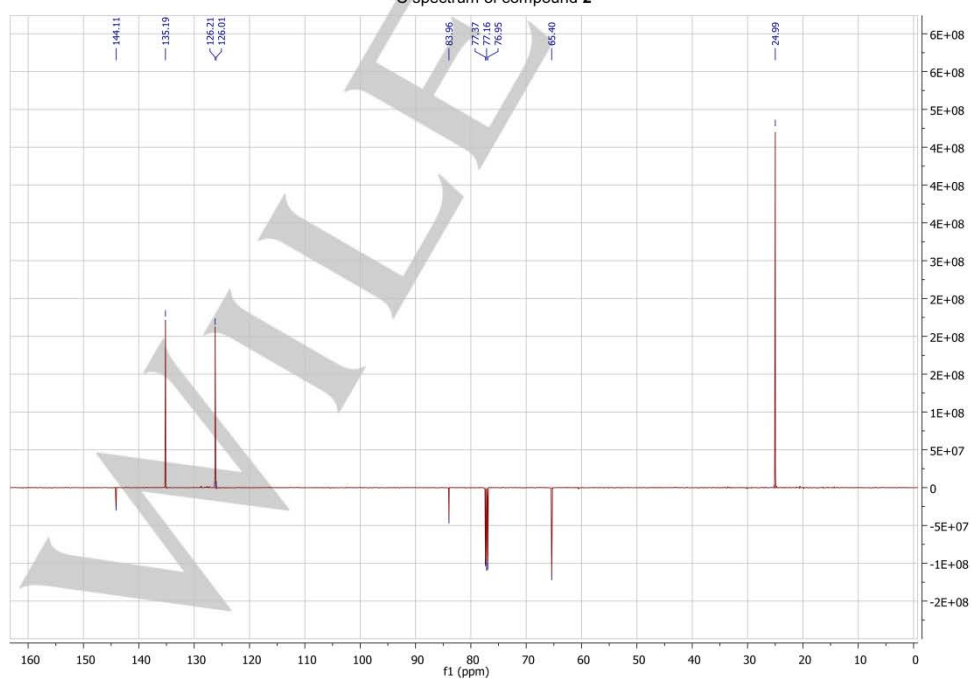


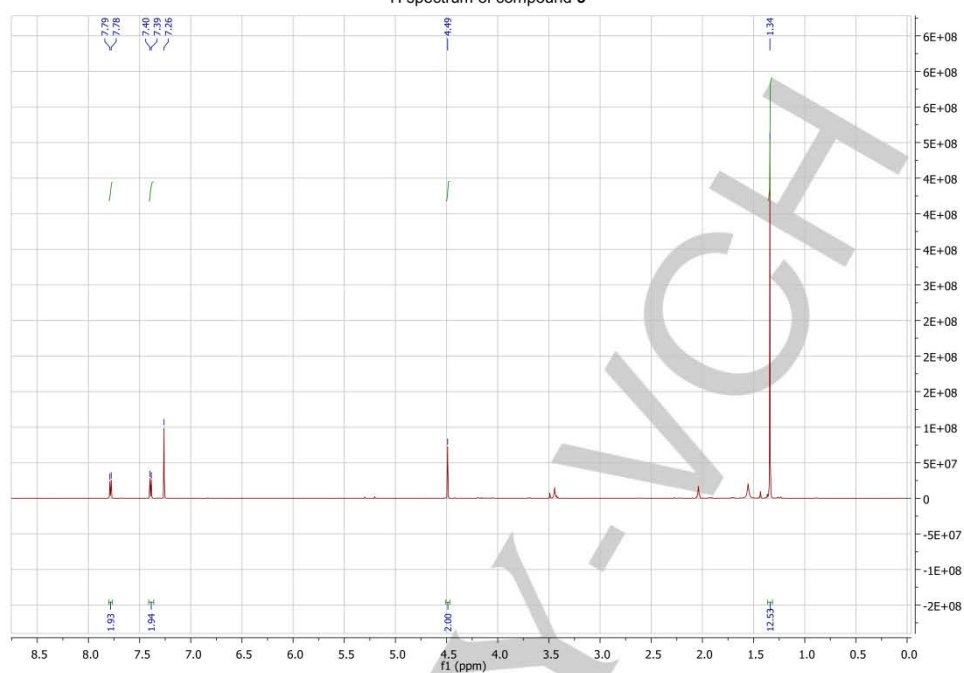
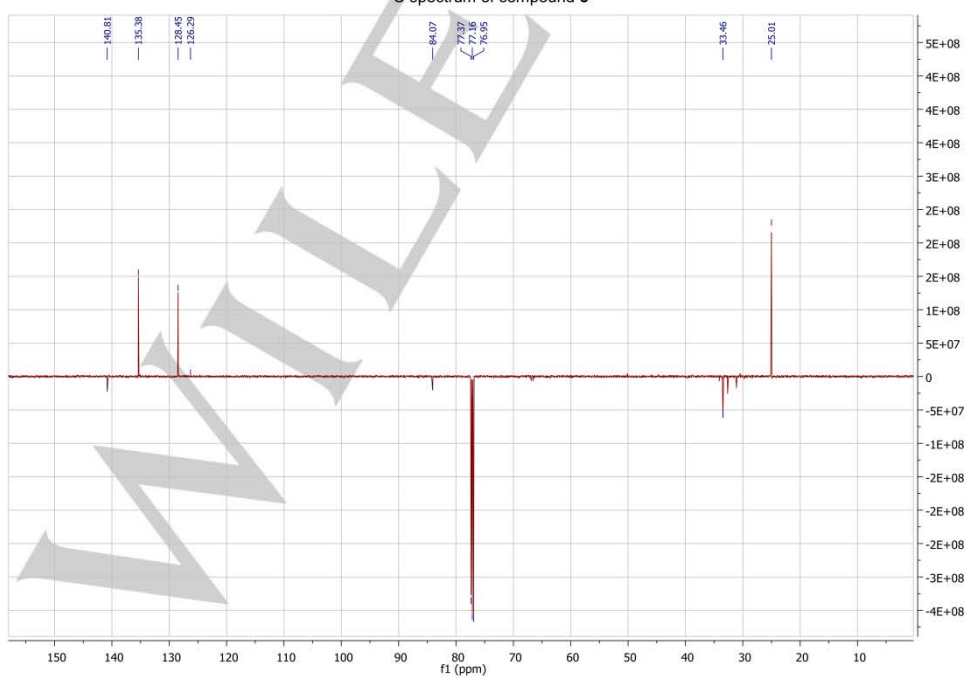
Figure 8. Ex vivo accumulation of ^{18}F -Darapladib compared to ^{18}F -FDG in human carotid endarterectomy samples. a) Non-complicated; b) Complicated. (left) Orthoslice associated with 3D view of the slice; (right) macroscopic view.

5. Spectral analysis

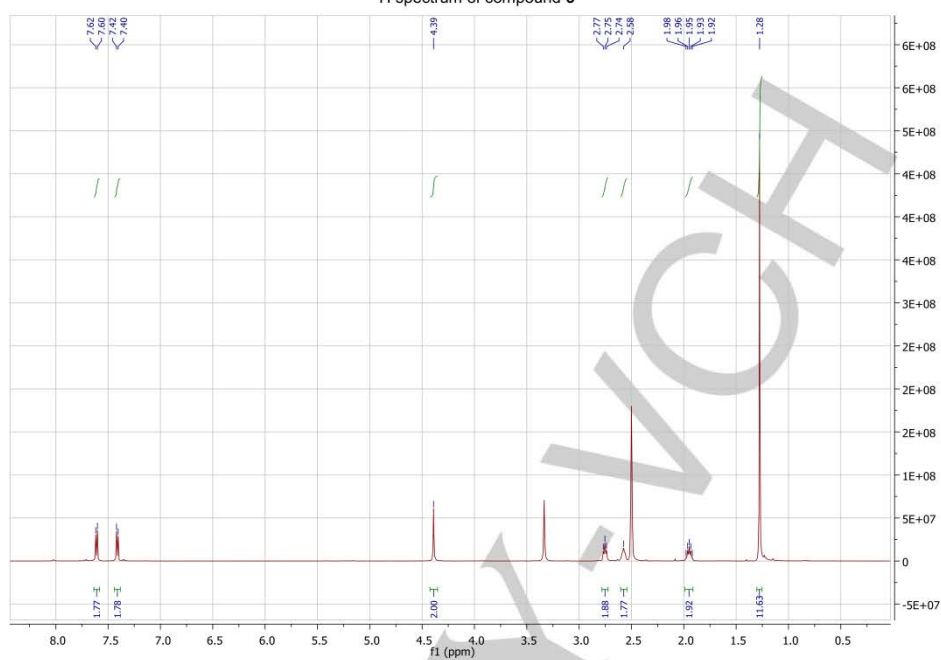
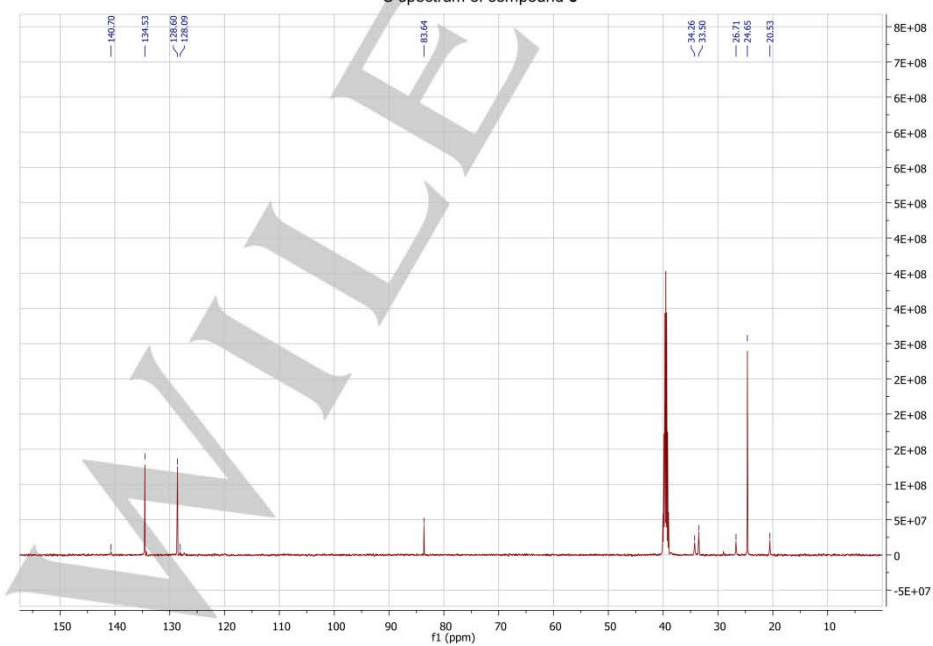


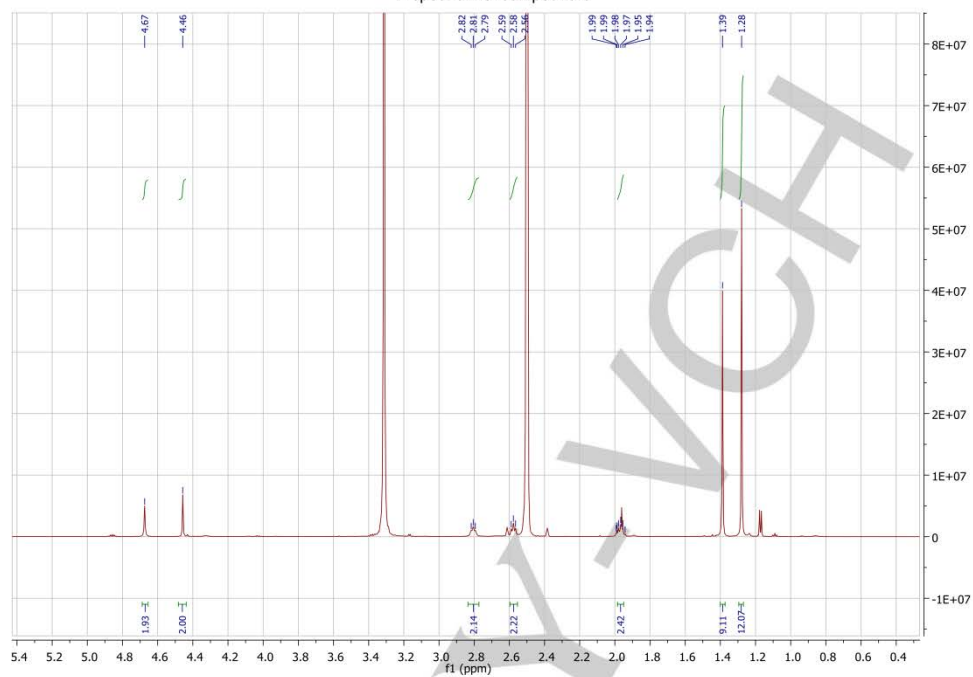
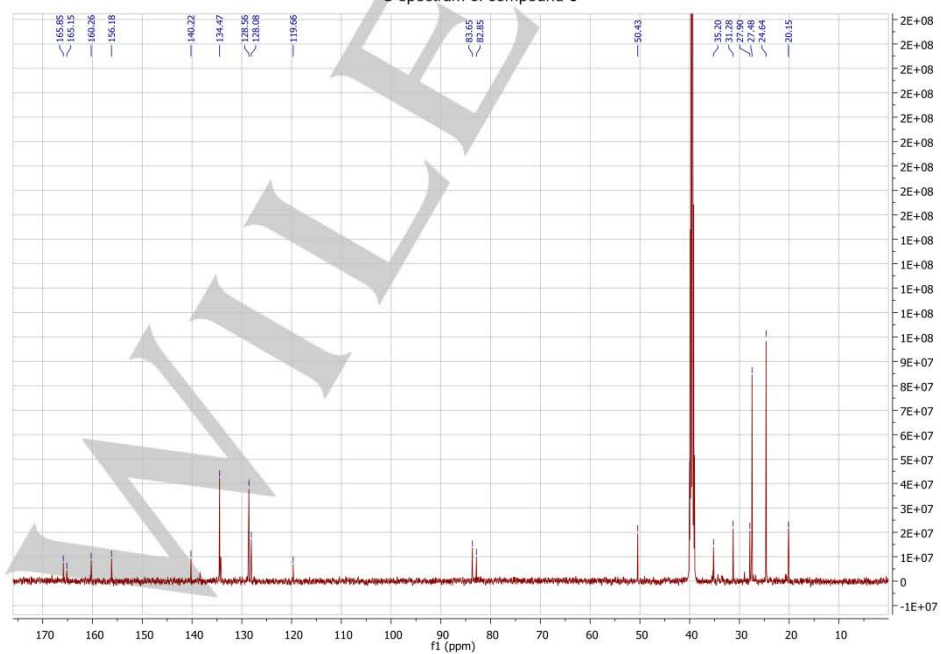
S12

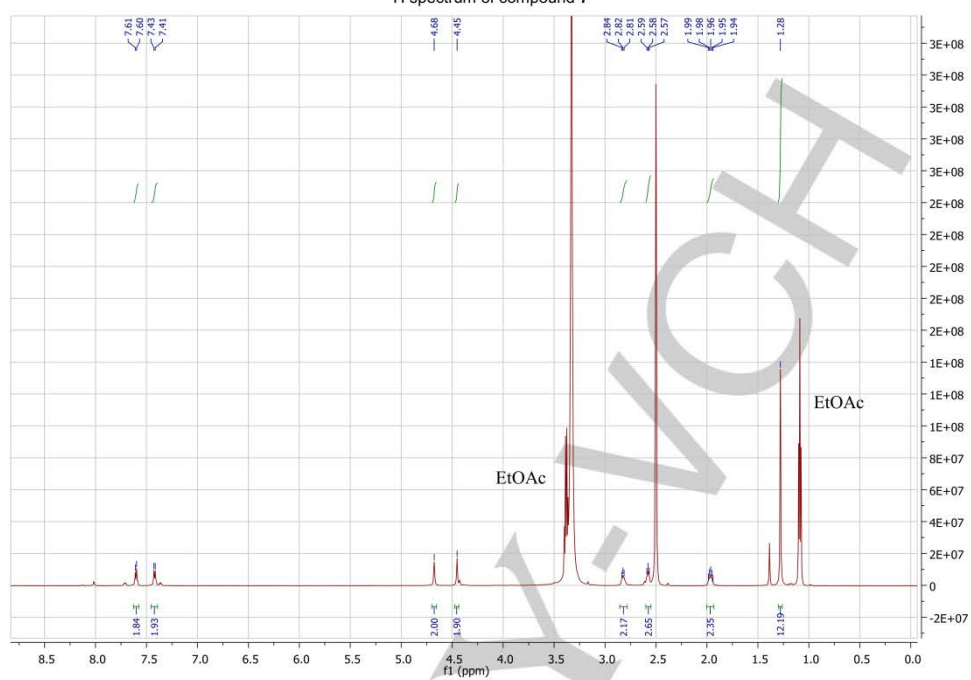
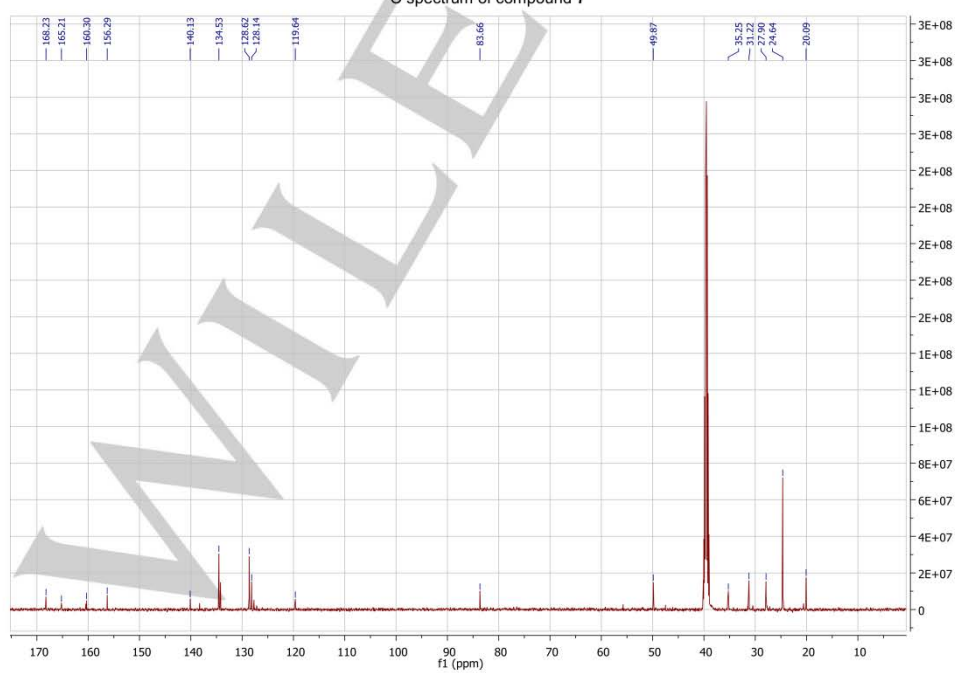
¹H spectrum of compound 2¹³C spectrum of compound 2

^1H spectrum of compound 3 ^{13}C spectrum of compound 3

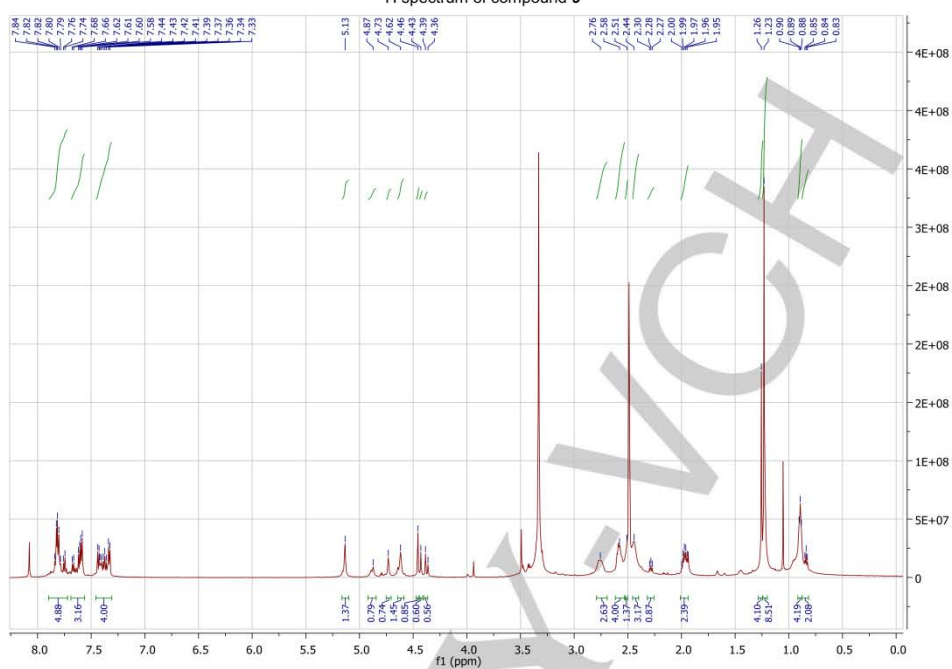
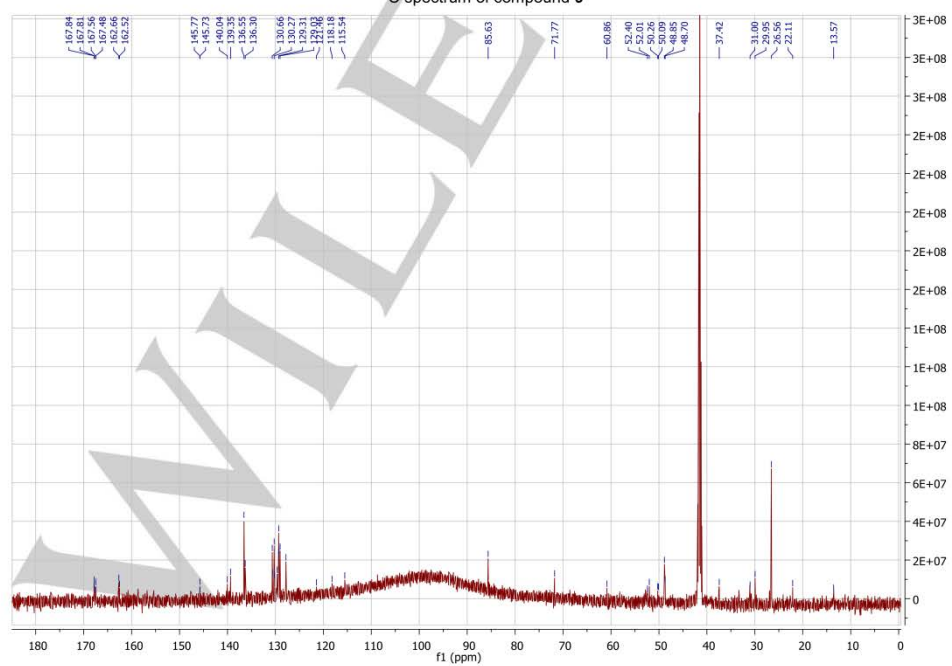
S14

^1H spectrum of compound 5 ^{13}C spectrum of compound 5

^1H spectrum of compound 6 ^{13}C spectrum of compound 6

¹H spectrum of compound 7¹³C spectrum of compound 7

S17

¹H spectrum of compound 9¹³C spectrum of compound 9



LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) M. Guibbal Florian....., en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Sainte-Clotilde....., le (date) 26/08/2017.....

Signature :

Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tels droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.